รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ประเมินสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของกระดูกเทียมที่เตรียมจากพอลิคาโปรแลคโตนและสารอนินทรีย์ฟอสเฟต

(Physical and Biological Properties Evaluation of Artificial Bones Prepared from Polycaprolactone and Inorganic Phosphate)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลือพงศ์ แก้วศรีจันทร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎี แก้วศรีจันทร์

ครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2554

คำนำ

รายงานวิจัยฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อรวบรวมผลวิจัยจากโครงการวิจัยเรื่อง "ประเมินสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของกระดูกเทียมที่เตรียมจากพอลิคาโปรแลคโตนและสารอนินทรีย์ฟอสเฟต" ซึ่งได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554 ภายในรายงานประกอบด้วยบทนำและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง ซึ่งอธิบายถึงหลักการ ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย เครื่องมือและวิธีดำเนินการวิจัย ผลวิจัยในหลายรูปแบบ เช่น ภาพถ่าย กราฟ และตาราง เพื่อให้เข้าใจได้ง่าย และวิจารณ์ผลการทดลองซึ่งรวมแนวคิดของผู้วิจัยเข้าไปด้วย ผู้วิจัยหวังว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้สนใจไม่มากก็น้อย และหากผู้อ่านต้องการรายละเอียดในหัวข้อใดเพิ่มเติมก็สามารถใช้เอกสารอ้างอิงที่เขียนไว้อ่านเพิ่มเติมได้ ผู้วิจัยต้องขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วยหากมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นในรายงานฉบับนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
คำนำ	i
สารบัญ	ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iv
บทนำ	1
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	10
เครื่องมือวิทยาศาสตร์	11
วิธีดำเนินการวิจัย	12
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	59

บทคัดย่อ

ความสำเร็จของการรักษาด้วยเทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกทางคลินิก สัมพันธ์อย่างมากกับสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ด้านความสามารถในการบรรจุเซลล์ต้นกำเนิดกระดูก และการกระตุ้นเซลล์ดังกล่าวให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก ในการศึกษานี้โครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์และพอลิคาโปรแลคโตนถูกเตรียมขึ้นโดยเทคนิคอิมัลชันและ/หรือการเคลือบ ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รวมทั้งทดสอบสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

อนุภาคของไฮดรอกซีอะพาไทต์มีขนาดประมาณ 4 ไมครอน กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในเมตริกซ์ของพอลิคาโปรแลคโตน โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จึงทนต่อแรงดัดโค้งได้ดี แต่มีค่าแรงตึงลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าเซลล์มีรูปร่างปกติ มีการสะสมของเกลือแร่บนโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งตรวจสอบได้โดยเทคนิคการย้อมสี alizarin red S และแอคทิวิตีของเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทสที่เซลล์สร้างขึ้น ยืนยันผลดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์ธาตุ Ca และ P ด้วยเทคนิค Energy dispersive X-ray การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกไปเป็นกระดูกเกิดขึ้นภายในเวลา 14 วันเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม โดยเฉพาะกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ คาดว่าจะสามารถนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ไปใช้ประโยชน์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

คำสำคัญ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก เซลล์ต้นกำเนิดกระดูก โครงเลี้ยงเซลล์ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ พอลิคาโปรแลคโตน สมบัติเชิงกล แอลคาไลด์ฟอสฟาเทส การสะสมของเกลือแร่

Abstract

It is of high clinical relevance in bone tissue engineering that scaffolds promote a high seeding efficiency of cells capable of osteogenic differentiation, such as human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). In this study, composite scaffolds of hydroxyapatite (HA) dispersed in PCL were prepared by either emulsion or coating technique and studied for growth and osteogenic differentiation of hMSCs, focusing on analyses for their physicochemical properties by Scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and mechanical testing. HA particles (~4 μm diameter) embedded in PCL fibers increased the scaffold's flexural stress and modulus, while decreased the strain at failure. When cultured under osteogenic stimulation conditions on the scaffolds, hMSCs showed normal phenotypic cell morphology, and time-dependent mineralization and osteogenic differentiation from SEM observations, alkaline phosphatase activity assay, and alizarin red S staining. The scaffolds could support the growth of cells without compromising their osteogenic differentiation capability up to 14 days and the enhancement of cell differentiation by HA is positively correlated with its concentration in the scaffolds. Energy dispersive X-ray analysis of Ca and P elements indicated mineral deposits on the scaffold surfaces after soaking in a physiological solution *in vitro*. The mineralization extent was significantly raised with 50% HA where a Ca/P ratio similar to that of bone mineral was found. The present study indicated that the composite PCL/HA scaffolds are suitable for mineralization of hMSCs intended for bone tissue engineering.

Keywords:

Bone tissue engineering, mesenchymal stromal cell, scaffold, hydroxyapatite, polycaprolactone, mechanical property, alkaline phosphatase, mineralization

บทนำ

เนื่องจากความปรารถนาของคนเราคือการดำรงชีวิตด้วยสุขภาพที่แข็งแรง แต่ด้วยอายุ วัย เพศ อาหารการกิน และลักษณะการดำเนินชีวิต อาจนำไปสู่การทำหน้าที่ของอวัยวะที่ผิดปกติได้ กระดูกเป็นอวัยวะที่สำคัญอวัยวะหนึ่งของร่างกาย หากได้รับความเสียหายไม่ว่าจะเกิดจากอุบัติเหตุ จากความพิการตั้งแต่กำเนิด หรือโรคของกระดูก ในทางการแพทย์ย่อมต้องหาวิธีที่เหมาะสมในการรักษา เพื่อให้กระดูกที่เสียหายกลับเข้าสู่สภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพเดิมมากที่สุด ผู้ป่วยสามารถกลับมาดำเนินชีวิตตามปกติได้เร็วที่สุด และเกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุด

การรักษาอาจแบ่งได้ 2 วิธีหลักๆคือ การรักษาโดยไม่ต้องผ่าตัด และการรักษาโดยการผ่าตัด [1] ในปัจจุบันมีการนำความรู้เกี่ยวกับวัสดุชีวภาพ (biomaterials) มาช่วยในการรักษาโดยการผ่าตัด โดยนำวัสดุชีวภาพมาเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูก (bone scaffold) และใช้ทดแทนกระดูกส่วนที่สูญหายไป ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ในการรักษาผู้ป่วยที่กระดูกได้รับความเสียหายเกินกว่าที่ร่างกายจะสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมาทดแทนเองได้ การฝังโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกลงไปแทนที่ส่วนกระดูกที่สูญเสียไปดังกล่าว ช่วยให้ร่างกายสามารถสร้างกระดูกใหม่ได้เร็วขึ้น และจะสลายได้เองในสภาวะปกติของร่างกายโดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงใดๆ โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจึงทำหน้าที่เสมือนบ้านของเซลล์ [2] ให้เซลล์ต่างๆมาเกาะ และเจริญเติบโตเกิดเป็นเนื้อเยื่อใหม่ได้ แต่ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกอยู่ในร่างกายต้องเผชิญกับสภาพความเป็นกรด และต้องรับน้ำหนักจากการทำงานของร่างกาย ดังนั้น คุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่สำคัญหลักๆคือ เข้ากันได้ดีทางชีวภาพ (biocompatible) ดูดซึมได้ทางชีวภาพเพื่อสร้างรูปแบบกระดูกของแต่ละอวัยวะ (bioresorbable and remodeled) ย่อยสลายได้ (biodegradable) มีความพรุน มีขนาดรูพรุนที่เหมาะสม และรูพรุนเชื่อมต่อกันอย่างต่อเนื่อง (highly interconnected porous) มีพื้นผิวที่เหมาะสมให้เซลล์มายึดเกาะ (surface conductive for cell attachment) มีสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม (appropriate mechanical properties) กระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (encourage the deposition of ECM by promoting cellular functions) และสามารถดำเนินการและนำสัญญาณระหว่างเซลล์ เป็นต้น [3]

การใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกในการรักษามีประโยชน์ต่อทั้งตัวผู้ป่วยและแพทย์ กล่าวคือ ผู้ป่วยไม่ต้องเจ็บปวดซ้ำจากการผ่าตัดเพื่อเอากระดูกส่วนอื่นออกมาและปลูกถ่ายลงในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ และไม่ต้องได้รับการผ่าตัดรอบที่สองเพื่อเอาโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกออกหลังจากบาดแผลหายแล้ว แต่ประโยชน์อีกอย่างที่น่าสนใจคือ เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกสลายตัวไปเรื่อยๆ จะทำให้แรงที่ปกติถูกแบกรับด้วยโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจะค่อยๆถูกเปลี่ยนถ่ายไปยังกระดูกที่เกิดใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทำให้กระดูกในบริเวณดังกล่าวฟื้นสภาพได้ดีกว่าการใช้วัสดุจำพวกโลหะที่มีความแข็งสูง แต่แรงไม่สามารถถ่ายเทไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบได้ กระดูกตรงรอยต่อกับโลหะมีความอ่อนแอ และเมื่อต้องผ่าตัดเอาโลหะนั้นออก จะเกิดการบาดเจ็บซ้ำได้ง่ายเนื่องจากไม่สามารถรับแรงที่เกิดขึ้นตามปกติได้

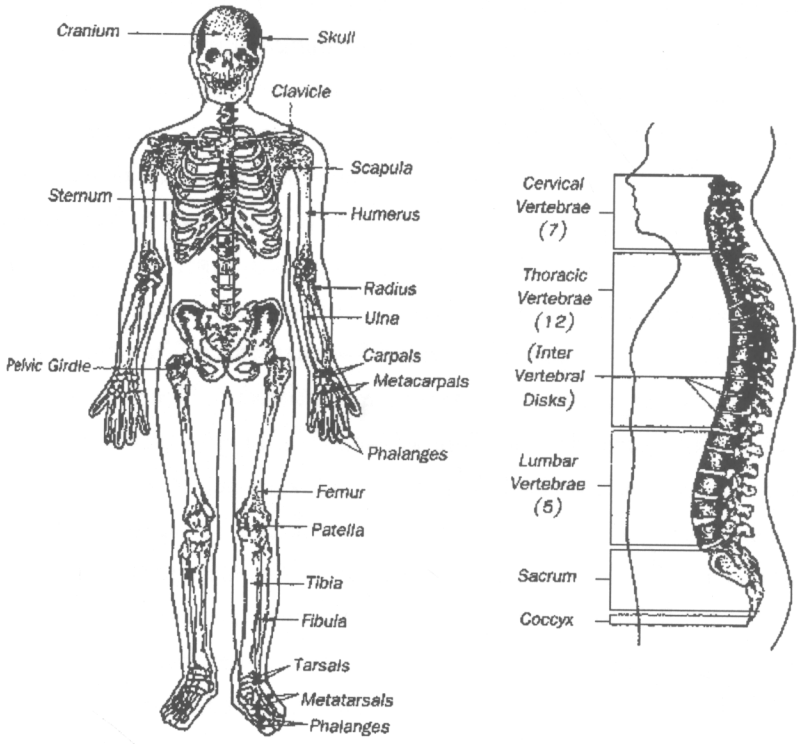
วิวัฒนาการของวัสดุชีวภาพที่ใช้ในทางการแพทย์ ได้เปลี่ยนแปลงไปอย่างมากตลอดระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา ในยุคแรกๆวัสดุที่ใช้คือ เหล็กไร้สนิม (stainless steel) หรือเป็นเพียงวัสดุที่ใช้แล้วไม่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับเนื้อเยื่อของร่างกายเท่านั้น แต่ในปัจจุบันจะต้องดูถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างวัสดุและเนื้อเยื่อรองรับ (interfacial reaction) และควรมีความคงทนในร่างกายไม่ต่ำกว่า 20 ปี การได้มาซึ่งวัสดุใหม่ๆยังต้องผ่านการทดสอบทั้งในแง่กลศาสตร์ทั้งในสัตว์ทดลองและในแบบจำลองเพื่อให้แน่ใจว่าวัสดุนั้นเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อข้างเคียง ศึกษาในร่างกายผู้ที่เสียชีวิตใหม่ๆ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของผิววัสดุที่ใช้หรือระหว่างผิววัสดุและเนื้อเยื่อที่รองรับ ช่วยให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อที่มีต่อวัสดุที่ใช้ และมีความจำเป็นอย่างมากที่ต้องเรียนรู้เคมีพื้นผิว (surface chemistry) การสึกกร่อนของโลหะ (metal corrosion) ปฏิกิริยาของพอลิเมอร์ (polymer reactions) และพฤติกรรมด้านพื้นผิวของเซรามิกและแก้ว ในแต่ละปีปรากฏว่ามีการใช้วัสดุชีวภาพทางการแพทย์ในอเมริกาและยุโรปรวมกันสูงถึง 4-5 ล้านชิ้นจากวัสดุที่แตกต่างกันกว่า 40 ชนิด [4]

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

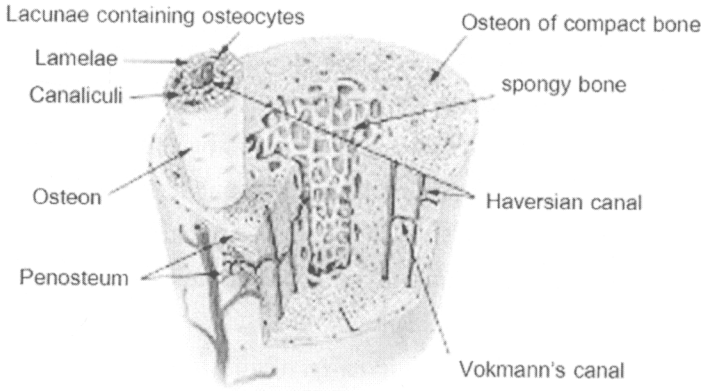
กระดูกเป็นอวัยวะที่สำคัญของร่างกาย โดยทำหน้าที่เป็นที่เกาะของกล้ามเนื้อและเอ็นทำให้ร่างกายสามารถเคลื่อนไหวได้ ป้องกันอวัยวะส่วนอื่นที่มีความสำคัญ เช่น สมองและไขสันหลังซึ่งได้รับการปกป้องโดยกะโหลกศีรษะและกระดูกสันหลัง ตามลำดับ เป็นที่อยู่ของไขกระดูกซึ่งทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด เป็นแหล่งสะสมของเกลือแร่และช่วยรักษาสมดุลแร่ธาตุต่างๆในร่างกาย เป็นต้น กระดูกมีส่วนประกอบหลักคือ คอลลาเจนร้อยละ 20 แคลเซียมและฟอสเฟตร้อยละ 69 และน้ำร้อยละ 9 โดยน้ำหนัก ที่เหลือเป็นสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น โปรตีน น้ำตาล และไขมัน จัดอยู่ในกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ชนิดพิเศษประกอบด้วยเนื้อพื้น (matrix) ที่มีความยืดหยุ่นและเหนียว การเรียงตัวของใยคอลลาเจนมีรูปแบบเฉพาะ มีการยึดเกาะของเกลือแร่ (mineralization) ต่างๆในเนื้อพื้นและการจัดเรียงโครงสร้างในชิ้นกระดูกอย่างเหมาะสม ทำให้กระดูกมีลักษณะพิเศษคือมีน้ำหนักเบา แต่มีความแข็งแรงมากในการรับน้ำหนัก แม้จะดูเหมือนว่ากระดูกเป็นส่วนของร่างกายที่ไม่ค่อยจะมีการเปลี่ยนแปลง แต่จริงๆแล้วกระดูกแต่ละชิ้นมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอยู่ตลอดเวลา การปรับรูป (remodeling) ของกระดูกมีการดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เหมาะสมกับหน้าที่ในแต่ละส่วนของร่างกาย

กระดูกในร่างกายมนุษย์มีทั้งหมด 206 ชิ้น [5] แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กระดูกแกน (axial skeleton) ทำหน้าที่ค้ำจุนและป้องกันอันตรายให้แก่อวัยวะสำคัญภายในร่างกาย มีทั้งหมด 80 ชิ้น ประกอบด้วยกะโหลกศีรษะ 29 ชิ้น กระดูกสันหลัง 26 ชิ้น กระดูกซี่โครง 24 ชิ้น และกระดูกอก 1 ชิ้น และกระดูกระยาง (appendicular skeleton) หน้าที่ค้ำจุนและเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกาย มีทั้งหมด 126 ชิ้น ประกอบด้วย กระดูกแขน 60 ชิ้น กระดูกขา 60 ชิ้น (ข้างละ 30 ชิ้น) กระดูกไหปลาร้า (Clavicle) กระดูกสะบัก (Scapula) และกระดูกเชิงกราน (Pelvic) อย่างละ 2 ชิ้น (รูปที่ 1)

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งโครงกระดูกของมนุษย์ออกเป็น 2 ประเภทคือ กระดูกอ่อน (cartilage) ประกอบด้วยเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และสารระหว่างเซลล์และเส้นใยชนิดต่างๆ ในเนื้อพื้น เซลล์กระดูกอ่อนจะได้รับอาหารจากที่ซึมผ่านเส้นเลือดออกมา (ซึ่งอยู่ไกลออกไป) ผ่านเนื้อพื้นไปถึงเซลล์ เนื่องจากกระดูกอ่อนไม่มีเส้นเลือดฝอยมาหล่อเลี้ยง และกระดูก (bone) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหรือกระดูกอ่อน ประกอบด้วยเซลล์กระดูก (osteocyte) เส้นใยชนิดต่างๆ ในเนื้อพื้นซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite ; $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ทำให้กระดูกมีความแข็งแรงมากกว่ากระดูกอ่อน จากภาพตัดขวางของกระดูก (รูปที่ 2) พบว่าเนื้อกระดูกส่วนนอกจะแน่นทึบ เรียก compact bone บริเวณนี้จะมีเส้นเลือดแทรกเข้าไปทางช่องที่เรียกว่า haversian canal โดยจะทอดไปตามความยาวของกระดูก ส่วนตรงกลางจะมีลักษณะโปร่งเป็นโพรงคล้ายฟองน้ำ เรียก spongy bone เป็นที่อยู่ของไขกระดูกที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดให้แก่ร่างกาย [6]



รูปที่ 1 โครงกระดูกของมนุษย์ [5]



รูปที่ 2 โครงสร้างกระดูกเปลือกนอกและกระดูกโปร่ง [6]

กระดูกมีความแตกต่างจากวัสดุทางด้านวิศวกรรม ในแง่ที่กระดูกสามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและรูปร่างเพื่อตอบสนองการเปลี่ยนแปลงจากแรงที่มากระทำได้ มีความแข็งแรงซึ่งเป็นผลจากการสะสมเกลือแร่ในส่วนคอลลาเจน จึงทำหน้าที่เป็นโครงสร้างที่รับน้ำหนักและป้องกันอวัยวะภายในได้เป็นอย่างดี ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกเพื่อตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมเห็นได้ชัดจากตัวอย่างที่ทันตแพทย์จัดฟัน ซึ่งพยายามจัดให้ฟันซี่ที่เรียงอย่างไม่ถูกต้องให้เคลื่อนที่ไปเรียงอย่างถูกต้อง โดยการรั้งหรือดึงตัวฟันด้วยวัสดุจัดฟัน ทำให้กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) ด้านที่มีฟันกดอยู่จะเกิดการสลายตัว ส่วนด้านตรงข้ามจะมีการสร้างกระดูกขึ้นใหม่ เกิดเบ้ากระดูกฟัน ที่มีขนาดพอเหมาะกับตำแหน่งใหม่ของรากฟันที่ฝังอยู่

ส่วนประกอบของกระดูกที่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งส่วนมากเป็นคอลลาเจน จะมีความเหนียวสูง ค่ามอดูลัสต่ำ และมีสมบัติอื่นๆที่เป็นลักษณะเฉพาะของพอลิเมอร์ และส่วนประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์ซึ่งเป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์เกาะอยู่กับเส้นใยคอลลาเจนที่มีโครงสร้างจุลภาคที่ซับซ้อน ทำให้กระดูกมีความแข็งแรงมาก กระดูกจึงเป็นวัสดุผสมระหว่างเซรามิกส์และสารอินทรีย์ ผลลัพธ์ดังกล่าวทำให้กระดูกมีความเหนียวสูงและค่ามอดูลัสสัมพัทธ์สูงนั่นเอง [7]

การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเกิดได้ตลอดชีวิต แต่อัตราการสร้างกระดูกในผู้ใหญ่เกิดช้ากว่าในเด็ก ผู้สูงอายุจึงมีโอกาสเกิดภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ได้ง่าย ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการสร้างกระดูกลดลง ทำให้ช่องว่างในกระดูกกว้างขึ้นตามอายุ และเนื้อกระดูกบางลง นอกจากนี้ผู้สูงอายุยังมีความสามารถในการสร้างเนื้อพื้นกระดูกลดลงด้วย กระดูกจึงเปราะและหักได้ง่าย เมื่อกระดูกหักและเกิดแผลที่มีความกว้างไม่เกิน 15 เซนติเมตร ร่างกายจะกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมกระดูกที่เสียหายโดยมีขั้นตอนตามลำดับดังนี้ [5] มีเลือดออกเนื่องจากการฉีกขาดของเส้นเลือด จากนั้นเลือดจะแข็งตัว เซลล์ fibroblast, macrophage และ neutrophilic granulocyte จะเข้ามาจับกินเชื้อโรคและช่วยกำจัดเศษเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ Dense connective tissue จะแทรกเข้าไปใน granulation tissue และเจริญเป็น cartilage callus ทำหน้าที่ช่วยเชื่อมปลายกระดูกที่หัก ต่อมาเซลล์ osteoblast ซึ่งเจริญมาจากเซลล์ใน periosteum และ endosteum ทำหน้าที่สร้างกระดูกแทนที่ cartilage ในขณะเดียวกันก็มีเซลล์ osteoclast มาจับกินกระดูกและช่วยปรับรูปร่างของกระดูกให้เหมือนเดิม ประสิทธิภาพการซ่อมแซมกระดูกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ การมีเลือดมาเลี้ยงเซลล์อย่างเพียงพอ การแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อสร้างเซลล์ osteoblast การมีวิตามินและแร่ธาตุเพียงพอ เป็นต้น

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีหลักการสำคัญ 3 ประการดังนี้ [8]

1. เซลล์ที่มีความเหมาะสม จะต้องบ่งบอกได้ว่าเป็นเซลล์ชนิดใด และสามารถแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อได้

2. วัสดุที่นำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ จะต้องสามารถผลิตหรือสังเคราะห์ขึ้นมาได้ สามารถขึ้นรูปให้มีรูปร่างและขนาดตามที่ต้องการได้ และอัตราการย่อยสลายจะต้องมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ จะต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เพิ่มจำนวนหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiate) ในห้องปฏิบัติการ หรืออาจปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเติบโตในจำนวนที่เหมาะสมลงในสิ่งมีชีวิตให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อที่ทำงานได้

ในปัจจุบันงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยทางด้านนี้ที่มีการตีพิมพ์อย่างมากมายในแต่ละปี

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่เป็นวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ [9] และต้องสามารถขึ้นรูปเป็นโครงสร้างสามมิติที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอวัยวะที่จะนำไปใช้ทดแทน [8] และเมื่อเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนจนมีปริมาณมากพอบนโครงเลี้ยงเซลล์แล้วจะทำการฝังเข้าไปแทนที่ในบริเวณที่ต้องการ ปล่อยให้เซลล์ที่อยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์เจริญเติบโตเป็นเนื้อเยื่อใหม่ทดแทนเนื้อเยื่อเดิม ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกย่อยสลายตามกาลเวลา [10] สมบัติที่สำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์คือ ต้องเข้ากันได้กับร่างกาย ไม่

เกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกัน และต้องไม่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนี้ยังต้องมีความแข็งแรงและคงทนต่อแรงที่ได้รับ ไม่เกิดรอยร้าวหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง วัสดุที่นำมาใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จึงต้องมีแรงยึดเหนี่ยวทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลที่มากพอ แต่ต้องสามารถย่อยสลายได้ภายในระยะเวลาที่กำหนด [11] เรื่องของที่ว่างที่ใช้เพื่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ หรือใช้ในกระบวนการต่างๆของเซลล์ เช่น การแลกเปลี่ยนก๊าซและขับถ่ายของเสีย การได้รับอาหาร เป็นต้น ก็ต้องคำนึงถึงด้วย เนื่องจากเซลล์มีขนาดประมาณ 100 ไมครอน [13] ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดของรูพรุนต่ำกว่าค่าดังกล่าวก็อาจจะไม่เหมาะสมในการทำหน้าที่ได้ ปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่ใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีโครงสร้าง รูปร่าง และรูปแบบตามที่ต้องการ รวมถึงสามารถกำหนดคุณสมบัติทางกายภาพของพื้นที่ผิว ความพรุน และขนาดรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เทคโนโลยีที่ใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ [12]

เทคโนโลยี	**ขนาดของรูพรุน (μm)**	**ความพรุน (%)**
การหล่อ (Solvent casting)	30 - 300	20 - 50
เยื่อแผ่นบางแบบซ้อนทับ (Membrane lamination)	30 - 300	< 85
การหลอม (Melt-molding)	50 - 500	< 80
การรีด (Extrusion)	< 100	< 84
การระเหิดแห้ง (Freeze dry)	< 200	< 97
ของไหลเหนือวิกฤติ (Supercritical-fluid)	< 100	10 - 30

สารต่างๆที่นำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์เพื่องานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกในยุคแรกๆ ได้แก่ วัสดุผสมระหว่างคอลลาเจนและไกลโคซามิโนไกลแคน หลังจากนั้นได้พัฒนามาใช้ injectable calcium alginate matrices และ fibrin glue แม้จะเข้ากันได้ทางชีวภาพ แต่วัสดุเหล่านี้ก็มีข้อจำกัดในการใช้งาน กล่าวคือ มีความแข็งแรงน้อยและระยะเวลาในการสลายตัวเร็ว เป็นต้น [9] จึงทำให้ต้องพัฒนาสารทดแทนกระดูกขึ้นมาใหม่ ซึ่งล้วนแต่พยายามที่จะทำให้มีคุณสมบัติที่ดี ดังนี้ [13]

1. Biocompatibility หมายถึงความสามารถที่เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของร่างกาย ทำให้มีการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกเข้าไปภายในวัสดุทดแทนกระดูกจนเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ส่งผลให้มีการสร้างเนื้อเยื่อไฟเบอร์รอบๆวัสดุ
2. Biodegradability หมายถึงความสามารถที่วัสดุค่อยๆ สลายตัวโดยกลไกต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งจะทำให้สารทดแทนกระดูกที่ใช้ค่อยๆถูกกำจัดออกไปจากตำแหน่งที่ใส่ หลังจากที่มีการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกเข้าไปแทนที่แล้ว จนในที่สุดเมื่อหมดหน้าที่แล้วจะถูกร่างกายกำจัดออกไปจนหมด จุดสำคัญที่น่าสนใจคือ อัตราการสลายตัวของสารทดแทนกระดูกจะต้องสอดคล้องกับอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกที่เข้าไปแทนที่ เพราะถ้าหากการสลายตัวเกิดขึ้นเร็วเกินไปจะทำให้บริเวณที่ใส่สารทดแทนกระดูกขาดความแข็งแรงและเกิดการแตกหรือหักได้เมื่อได้รับแรงกระทำ เนื่องจากการเจริญของกระดูกยังเข้าไปไม่มากพอที่จะทำหน้าที่แทน แต่ถ้าการสลายตัวเกิดขึ้นช้าหรือไม่มีการสลายตัวสารทดแทนกระดูกนั้นก็จะเป็นตัวขัดขวางการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูก ทำให้เนื้อเยื่อกระดูกไม่สามารถเจริญเข้าไปแทนที่ได้ ส่งผลต่อชีวกลศาสตร์ของกระดูกส่วนนั้นในระยะยาว

3. ความแข็งแรง เนื่องจากวัสดุทดแทนกระดูกส่วนใหญ่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาส่วนของกระดูกที่บกพร่องไป การใช้วัสดุทดแทนต่างชนิดกันจึงต้องพิจารณาถึงความแข็งแรงของวัสดุที่ใช้ด้วย โดยเฉพาะเมื่อใช้ขนาดใหญ่หรือใช้กับกระดูกที่ต้องรับน้ำหนัก สารทดแทนกระดูกที่มีคุณสมบัติอื่นๆ ดี แต่มีความเปราะก็มีข้อจำกัดในการนำไปใช้เมื่อเทียบกับสารอื่นที่มีความแข็งแรงของโครงสร้างดีกว่า
4. Osteoinductive capabilities หมายถึง ความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อกระดูกโดยรอบตรงตำแหน่งที่รับมีการเจริญเข้าไปในวัสดุทดแทนกระดูกที่ใช้ โดยความสามารถนี้เป็นจุดสำคัญจุดหนึ่งที่เป็นที่ต้องการ และมีความพยายามในการพัฒนาให้วัสดุทดแทนกระดูกให้มีสมบัติข้อนี้ และเป็นสมบัติที่สำคัญที่ทำให้กระดูก autograft ดีกว่าวัสดุทดแทนกระดูกทั้งหลายที่มีอยู่ ความพยายามที่จะทำให้สารทดแทนกระดูกมีความสามารถในการเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อกระดูกยังไม่ประสบผลสำเร็จ จึงเป็นเหตุผลที่ต้องมีการผสมส่วนประกอบอื่นๆเข้ากับวัสดุทดแทนกระดูก เพื่อให้มีความสามารถในข้อนี้ เช่น การใช้ Bone morphogenetic protein (BMP) หรือแม้แต่การใช้ไขกระดูกหรือส่วนประกอบบางส่วนจากไขกระดูกหรือเลือดของผู้รับ เป็นต้น
5. Bioinert คือ เป็นวัสดุที่มีความเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นโดยง่าย คุณสมบัติข้อนี้จะทำให้สามารถผสมสารอื่นที่จำเป็น เช่น ยาปฏิชีวนะเข้ากับสารทดแทนกระดูกที่จะใช้ได้ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน
6. ง่ายต่อการเตรียม สามารถทำรูปแบบหรือขนาดได้ตามความต้องการได้ง่ายและเก็บไว้ใช้ได้นาน เป็นคุณสมบัติปลีกย่อยที่บางครั้งส่งผลต่อการเลือกใช้วัสดุทดแทนกระดูกบางชนิด

จะเห็นได้ว่าความยากของการพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูก นอกจากจะอยู่ที่การค้นหาสารที่มีสมบัติดังกล่าวแล้ว ยังอยู่ที่ขั้นตอนการผลิตหรือสังเคราะห์เพื่อให้ได้โครงสร้างที่เอื้อต่อการเจริญเข้าไปของเนื้อเยื่อกระดูกและมีความแข็งแรงเหมาะสมกับการนำไปใช้งานต่อไป

เซรามิก [14] เป็นวัสดุที่ประกอบด้วยธาตุที่เป็นโลหะและอโลหะ จับกันด้วยพันธะไอออนิก และพันธะโควาเลนซ์ ทำให้ไม่มีอิเล็กตรอนอิสระเหลืออยู่ เซรามิกจึงเป็นวัสดุที่นำไฟฟ้าและความร้อนได้ไม่ดี มีความโปร่งแสง แต่ค่อนข้างจะเปราะ มีความเสถียรสูงกว่าพอลิเมอร์ ปัจจุบันเซรามิกกำลังได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์ เช่น ไพโรคาร์บอนนำมาใช้ผลิตวาล์วปิด-เปิดของลิ้นหัวใจเทียม อะลูมินานำมาใช้ผลิตข้อเทียม ไฮดรอกซีอะพาไทต์นำมาฝังบริเวณที่มีกระดูกหัก เป็นต้น

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [13,14] มีน้ำหนักโมเลกุล 502.31 กรัม/โมล จุดหลอมเหลว 1100 องศาเซลเซียส ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับเกลือแร่ที่เป็นส่วนประกอบหลักของกระดูกและฟัน จึงช่วยทำให้กระดูกใหม่เจริญได้รวดเร็ว สามารถยึดติดกับกระดูกรองรับได้โดยตรง มีความหนาแน่นต่ำ มีความเสถียรทางเคมีสูง ทนต่อการขัดสี มีอัตราการเสื่อมสลายต่ำ ไม่ถูกต่อต้านจากระบบภูมคุ้มกันของร่างกาย ไม่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ แต่มีสมบัติเชิงกลต่ำคือ มีความเปราะ มีความแข็งแรงและความทนต่อความล้าได้ต่ำมาก เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ชนิดเนื้อแน่นมีค่าความทนต่อแรงกดระหว่าง 100-200 MPa และค่าความทนต่อการแตกหัก ไม่เกิน 1 MPa/m ซึ่งแตกต่างจากกระดูกในธรรมชาติเป็นอย่างมาก ดังนั้นการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของไฮดรอกซีอะพาไทต์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะได้วัสดุที่สามารถนำไปใช้งานได้จริง จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ความแข็งแรงเชิงกลและการแตกหักของไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถปรับปรุงโดยใช้เทคนิคการเผา โดยการเพิ่มสารที่มีจุดหลอมเหลวต่ำเข้าไปทำให้เกิดการหลอมติดกันของอนุภาค ความแข็งแรงของเซรามิกส์ผสมจึงเพิ่มขึ้น รูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเชื่อมต่อกันนำไปสู่การยึดเกาะอย่างมั่นคงของวัสดุที่นำมาใช้ เนื้อเยื่อกระดูกใหม่เจริญเติบโตเข้าไปในรูพรุนได้ดี เป็นการเพิ่มความแข็งแรงของรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อใหม่กับวัสดุที่ใช้ นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มสารที่ช่วยรับแรง

กระแทก หรือโดยออกแบบให้มีพื้นที่ผิวหน้าขนาดใหญ่เหมาะสำหรับการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกใหม่ เป็นต้น

ไตรแคลเซียมฟอสเฟต [4] (Tricalcium phosphate, $Ca_3O_8P_2$) มีน้ำหนักโมเลกุล 310.18 กรัม/โมล จุดหลอมเหลว 1670 องศาเซลเซียส มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อของร่างกาย โครงสร้างที่มีรูพรุนจึงเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก ถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อใหม่ และมีการปรับรูปในเวลาต่อมา อัตราการเจริญเติบโตของกระดูกเข้าไปในรูพรุนจะแปรตามตำแหน่งที่ใส่เข้าไปในร่างกาย เนื่องจากกระดูกแต่ละบริเวณมีเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกในปริมาณที่แตกต่างกัน มีจุดเด่นคือสามารถย่อยสลายได้ด้วยตัวเอง อาจเกิดโดยกระบวนการ passive dissolution หรือ osteoclastic resorption แคลเซียมและฟอสเฟตที่เกิดจากการสลายของไตรแคลเซียมฟอสเฟตจะมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกับที่พบในร่างกาย จึงไม่ทำให้เกิดพิษ เนื่องจากอัตราการสลายตัวเกิดขึ้นช้าจึงไม่กระทบต่อระดับแคลเซียมและฟอสเฟตในเลือด การนำไตรแคลเซียมฟอสเฟตใส่แทนกระดูกส่วนที่เสียหาย ทำให้เกิดการสมานของรอยแตก มีการงอกของกระดูกเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ ผลที่ได้เทียบได้กับการใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์แบบรูพรุน แต่ไตรแคลเซียมฟอสเฟตสลายตัวได้ดีกว่า แม้จะเป็นที่ยอมรับถึงประสิทธิภาพจากผลการทดลองในสัตว์และการใช้ทางคลินิก แต่ก็มีปัญหาด้านสมบัติเชิงกลคือ ทนต่อแรงกดหรือแรงอัดได้น้อยโดยมีค่าเฉลี่ยน้อยกว่ากระดูกของร่างกายโดยทั่วไป ทำให้การใช้ตรงบริเวณที่ต้องรับแรงกระทำมากๆ ถูกจำกัด เมื่อนำไตรแคลเซียมฟอสเฟตผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์พบว่าทำให้ไฮดรอกซีอะพาไทต์คงตัวมากขึ้นที่อุณหภูมิสูงๆ [15]

แคลเซียมซิลิเกต [16] (CaO_3Si) ชนิดโวลลาสโทไนต์ (wollastonite) มีน้ำหนักโมเลกุล 116.16 กรัม/โมล จุดหลอมเหลว 1540 องศาเซลเซียส เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของแร่แคลไซต์ (Calcite, $CaCO_3$) รวมกับซิลิกา (Silica, SiO_2) และมีความร้อนและความดันเข้ามาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาเคมี เป็นแร่ธาตุที่ประกอบด้วย CaO 48.28 % และ SiO_2 51.72 % โดยน้ำหนัก และมีไอออนของโลหะอื่นปนอยู่ในปริมาณเล็กน้อย (ตารางที่ 2) สารประกอบประเภทนี้มีการจัดเรียงผลึกในหลายลักษณะ เช่น ไตรคลินิค (triclinic) โมโนคลินิค (monoclinic) และเฮกซะโกนอล (hexagonal) รูปร่างของผลึก เป็นแท่งยาวคล้ายเข็ม (Acicular) ความหนาแน่นของสารบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 2.87-3.09 g/cm^3 ผลึกมีสีค่อนข้างขาว แต่ถ้ามีโลหะอื่นเจือปนสีอาจเปลี่ยนเป็นสีครีม ละลายน้ำได้บ้าง เกิดปฏิกิริยากับกรดอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะกรดไฮโดรคลอริก กรดชนิดอื่นที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ ได้แก่ กรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริก กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดแลกติก และกรดฟอร์มิก เป็นต้น

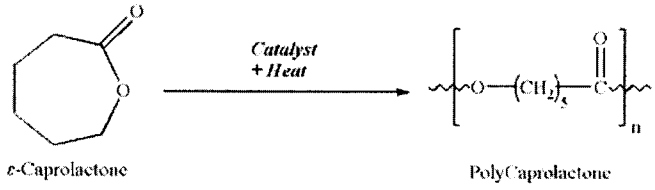
พอลิเมอร์ [14] หมายถึง วัสดุที่เกิดจากการรวมโมเลกุลของหน่วยย่อยหลายๆหน่วยมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนซ์เป็นลูกโซ่ จึงมีองค์ประกอบหลักคือ —C—C— (carbon-to-carbon bond) ยกเว้นบางชนิดเป็นพันธะ ester, amide หรือ —si—o—si— คาร์บอนในพอลิเมอร์จะใช้อิเล็กตรอนร่วมกับอะตอมอื่นๆ ได้แก่ hydrogen (H), nitrogen (N), oxygen (O), fluorine (F), silicone (S) และ chlorine (Cl) เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างพอลิเมอร์กับโลหะหรือเซรามิกส์พบว่าพอลิเมอร์มีข้อได้เปรียบกว่าคือ สามารถผลิตได้หลายรูปแบบเพื่อเหมาะกับการใช้งาน เช่น ทำเป็นแผ่น ฟิล์มของแข็ง เป็นต้น ไม่เกิดการกัดกร่อนในร่างกาย มีความคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อธรรมชาติเช่น คอลลาเจน นำมาใช้เป็นด้ายเย็บแผล ยึดอวัยวะที่ฉีกขาด มีความหนาแน่นใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อธรรมชาติคือประมาณ 1 กรัม/ซม แต่มีข้อเสียคือ มีค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นต่ำ และความหยุ่นตัวน้อย จึงไม่เหมาะสมที่จะรับน้ำหนักมากๆ มีโอกาสเกิด creep and crazing ง่าย อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์สังเคราะห์ก็อาจเป็นพิษกับร่างกายได้หากกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชันที่ใช้ในการสังเคราะห์ไม่ได้เกิดขึ้นสมบูรณ์ 100 % และมีมอนอเมอร์เหลืออยู่

พอลิคาโปรแลคโตน (polycaprolactone) เป็นพอลิเมอร์ชนิด aliphatic มีจุดหลอมเหลว 60 องศาเซลเซียส มีสูตรโมเลกุลดังรูปที่ 3 จัดอยู่ในกลุ่ม polyester ผลิตจากมอนอเมอร์ที่มีชื่อว่า 2-methylene-1,3-dioxepane โดยปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน และมี diethyl-zinc เป็น

ตัวเร่งปฏิกิริยา [14] ที่นำมาใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 25,000-75,000 [12,17] ที่ขนาดมวลโมเลกุล 60,000 มีความหนาแน่น 1.145 กรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อมีโครงสร้างผลึกที่สมบูรณ์จะมีค่าพลังงานหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกประมาณ 135.44-135.56 จูลต่อกรัม แต่ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นรูปที่มีค่าพลังงานหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกที่ 62.2-73.2 จูลต่อกรัม มีความพรุน 55-61% ค่ามอดูลัสแรงดึง 400-600 MPa และค่าของมอดูลัสการอัด 1.58-6.9 MPa [17] มีระยะเวลาในการย่อยสลายที่ 24-36 เดือนในสารละลายที่มีเซลล์ fibroblast อยู่ [12] และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาในการใช้งานด้านการแพทย์ เนื่องจากไม่มีผลจากปัญหาด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ [17]

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของแคลเซียมซิลิเกตชนิดโวลลาสโทไนต์ [16]

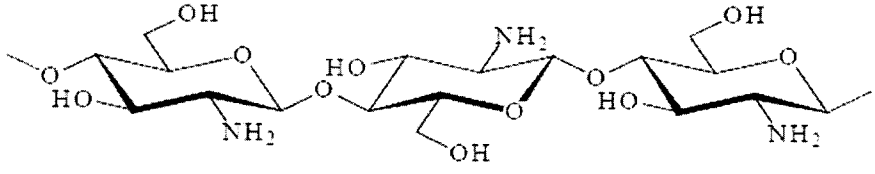
ส่วนประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
CaO	47.00
SiO_2	50.00
Fe_2O_3	1.00
Al_2O_3	0.30
K_2O	0.10
MnO	0.10
MgO	0.30
TiO_2	0.05
P_2O_5	0.04
Moisture	0.20
Loss on ignition	0.20
Undermined	0.71



รูปที่ 3 สูตรโมเลกุลของพอลิคาโปรแลคโตน [18]

การประยุกต์ใช้งานพอลิคาโปรแลคโตนในด้านงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ในช่วงแรก มีการนำมาใช้ในรูปแผ่นฟิล์มบางเพิ่มการยึดติดของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ ต่อมามีการพัฒนาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำที่ผลิตจากพอลิคาโปรแลคโตนผสมกับ Poly-L-lactide โดยเทคนิค microfabricate โครงสร้างที่ได้มีความเป็นระเบียบ มีความแข็งแรง แต่มีต้นทุนในการผลิตสูง [23] พอลิคาโปรแลคโตนมักใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ จึงได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ ใช้ในระบบนำส่งยา ทำไหมละลาย และใช้ในการซ่อมแซมและฟื้นฟูเนื้อเยื่อ การทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย ไฮดรอกซีอะพาไทต์และพอลิคาโปรแลคโตนพบว่า มีความชอบน้ำมากกว่าและเอื้อต่อการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยพอลิคาโปรแลคโตนเพียงอย่างเดียว [19]

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ของ β-1,4-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่มีการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) ออกไปด้วยด่างเข้มข้น โดยหมู่อะซิทาไมด์ ($-NHCOCH_3$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในวงไพราโนสเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) ที่สามารถรับโปรตอนได้ ได้พอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นบวก (รูปที่ 4) [20]



รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (%DAC) เป็นค่าที่ใช้บ่งชี้ความเป็นไคโตซาน เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ของมอนอเมอร์ 2 ชนิดคือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนของมอนอเมอร์แรกมากกว่า จะมี %DAC ต่ำซึ่งจะแสดงคุณสมบัติเด่นของไคติน แต่ถ้ามีสัดส่วนของมอนอเมอร์ที่สองมากกว่า จะมี %DAC สูงซึ่งจะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซาน [21] ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตไคโตซานในระดับที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร (food grade) ที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่า %DAC (Percent of Deacetylated) ระหว่าง 0% ถึง 95% โดยทั่วไปไคโตซานมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 50,000-1,000,000 ดาลตัน ไคโตซานที่มีขนาดโมเลกุลสูงจะส่งผลให้สารละลายไคโตซานมีความหนืดสูงด้วย ละลายได้ในสารละลายกรดที่มี pH น้อยกว่า 6 และไม่ละลายในสารละลายที่มี pH มากกว่า 7 แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการละลายของไคโตซานขึ้นกับค่า pH ของตัวทำละลาย [22] กรดที่นิยมนำมาใช้ละลายไคโตซานได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก ที่อุณหภูมิสูงปานกลาง แต่พบว่าไคโตซานไม่ละลายในกรดซัลฟูริก การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซานโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีระเหิดแห้งแช่แข็ง (freeze dry) ที่อุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง -78 องศาเซลเซียส ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดรูพรุนประมาณ 100–230 ไมครอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไคโตซาน และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำระเหิดแห้ง พบว่าที่อุณหภูมิต่ำรูพรุนจะมีขนาดเล็กลงไปด้วย จากการศึกษาความเข้ากันได้กับร่างกายและกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity) พบว่าไคโตซานมีคุณสมบัติดังกล่าวใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ประเภท glycosaminoglycan ซึ่งพบในกระดูกอ่อนของมนุษย์ ดังนั้นไคโตซานจึงเป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ [23]

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบเนื้อแน่น (คล้าย compact bone)

1.1 ศึกษาอัตราส่วนของพอลิคาโปรแลคโตน ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมซิลิเคตที่เหมาะสม เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีกิจกรรมทางชีวภาพที่ดี

1.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

1.3 ศึกษาสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้โดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก

2. เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบมีรูพรุน (คล้าย spongy bone)

2.1 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิคาโปรแลคโตน ไคโตซาน ไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟต

2.2 หาชนิดและความเข้มข้นของตัวประสานที่เหมาะสม สำหรับเตรียมพอลิคาโปรแลคโตนไมโคร สเฟียร์ เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์

2.3 หาอัตราส่วนของพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ ไคโตซาน ไฮดรอกซีแอพาไทต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

2.4 เปรียบเทียบสมบัติทางชีวภาพเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน และที่เตรียมโดยเทคนิคการระเหิดแห้ง

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) FEI รุ่น Quanta 400 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. เครื่อง Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer (EDX) JEOL รุ่น JSM-5800 LV ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. เครื่องทดสอบแรงอัด LLOYD รุ่น LR30K ภาควิชาบรรจุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
4. เครื่องทดสอบ Contact angle ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
5. เครื่องวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค (Laser Particle Size Analyzer) ของบริษัท Beckman รุ่น Coulter LS 230 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สามารถวัดขนาดอนุภาคในช่วง 0.04-2000 ไมโครเมตร
6. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometry (Spectrum One FT-IR Spectrometer บริษัทPerkin Elmer) ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

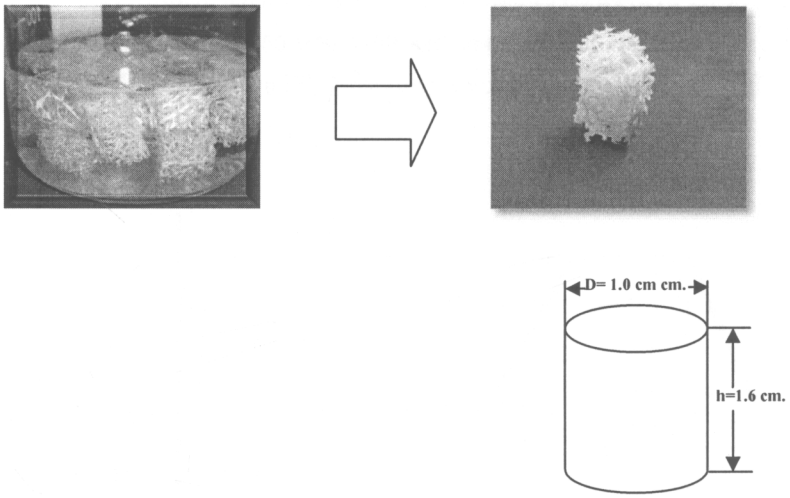
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบเนื้อแน่น

1.1 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในสุดด้วยวิธีการจุ่มเคลือบ

1.1.1 เตรียมใยบวบเป็น template สำหรับจุ่มเคลือบ

แช่ใยบวบในน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมาตัดเป็นรูปทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 1.6 เซนติเมตร (ASTM C773-88(2011) Standard Test Method for Compressive (Crushing) Strength of Fired Whiteware Materials และนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ใยบวบที่ตัดให้ได้ขนาดและรูปทรงตามที่กำหนด

1.1.2 เตรียมน้ำซุบเซรามิก (ceramic slurry) ใน 6% polyvinylalcohol (PVA) เพื่อใช้จุ่มเคลือบ

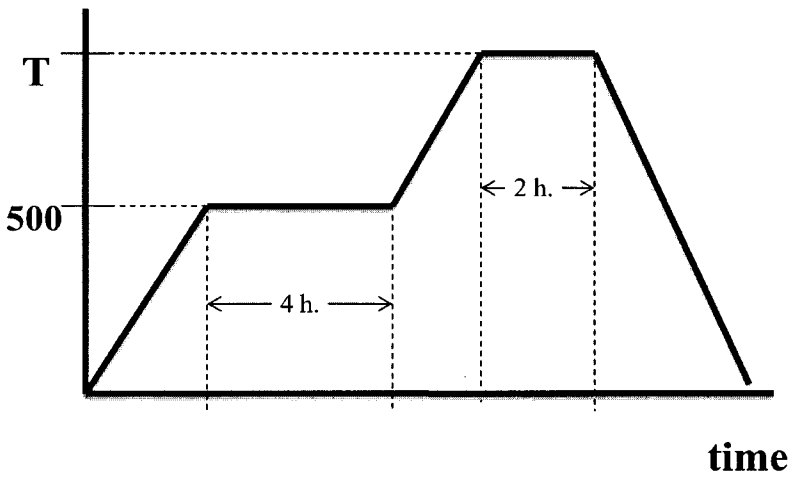
ละลาย PVA 6 กรัม ในน้ำเดือด 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมซิลิเกต (ตามอัตราส่วนในตารางที่ 3) ลงในโกร่งบดยา ใช้ 6% PVA (อัตราส่วน 1 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตร) กระจายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายใส่บีกเกอร์ขนาดเล็ก คนต่อบน magnetic stirrer ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีตลอดเวลาที่ทำการจุ่มเคลือบ

ตารางที่ 3 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารที่ใช้เตรียมน้ำชุบเซรามิกเพื่อใช้จุ่มเคลือบ

สูตร	ไฮดรอกซีอะพาไทต์	ไตรแคลเซียมฟอสเฟต	แคลเซียมซิลิเกต
HTC1	2	1	-
HTC2	2	1	1
HTC3	2	1	2
HTC4	2	1	3

1.1.3 การจุ่มเคลือบใยบวบ

นำใยบวบที่เตรียมไว้จุ่มลงในน้ำชุบเซรามิก (จุ่ม 10 วินาทีแล้วกลับหัวจุ่มอีก 10 วินาที) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เป่า slurry ที่อุดตันอยู่ในรูพรุนด้วยปืนลมใช้แรงดัน 10 บาร์ ตั้งให้หมาดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนข้างต้นจำนวน 25 ครั้ง นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ไปเผาผนึกที่ 1150 หรือ 1250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังรูปที่ 6) เก็บโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ในโถดูดความชื้น (desiccators) จนกว่าจะใช้



รูปที่ 6 โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้เผาผนึกโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อ T=1150 หรือ 1250 องศาเซลเซียส

1.2 เคลือบโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในสุดด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน

1.2.1 เตรียมสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน

ละลายพอลิคาโปรแลคโตนในคลอโรฟอร์ม เติมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมซิลิเกตลงไป (ตามอัตราส่วนในตารางที่ 4) คนผสมบน magnetic stirrer ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีตลอดเวลาที่ทำการจุ่มเคลือบ

1.2.2 เคลือบสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในสุด

นำโครงเลี้ยงเซลล์ข้อ 1.1.3 จุ่มลงในสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน (จุ่ม 10 วินาทีแล้วกลับหัวจุ่มอีก 10 วินาที) ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าวจำนวน 7 ครั้ง

ตารางที่ 4 อัตราส่วนของสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่ใช้จุ่มเคลือบโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในสุด

สูตร	พอลิคาโปรแลคโตน (% wt)	ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (% wt)	ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (% wt)	แคลเซียมซิลิเกต (% wt)
HTCxP30	30	37.33	18.67	14
HTCxP50	50	26.67	13.33	10
HTCxP70	70	16	8	6

x = 1, 2, 3 หรือ 4 คือ โครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในสุดที่เตรียมได้ในข้อ 1.1.3 และกำหนดอัตราส่วนของสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนให้ไฮดรอกซีอะพาไทต์:ไตรแคลเซียมฟอสเฟต = 2:1 และ (ไฮดรอกซีอะพาไทต์+ไตรแคลเซียมฟอสเฟต): แคลเซียมซิลิเกต = 4:1

2. การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบมีรูพรุน

2.1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยวิธีระเหิดแห้งแช่แข็ง

2.1.1 เตรียมพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์

ละลายพอลิคาโปรแลคโตน 1 กรัมในคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตรจะได้ 5% PCL เท สารละลายทั้งหมดลงในสารละลาย 0.5% PVA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องผสมที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (หรือจนกว่าจะหมดกลิ่นคลอโรฟอร์ม) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างไมโครสเฟียร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง นำไประเหิดแห้งแช่แข็งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.2 ทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น

กระจายพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ (เปลี่ยนแปลงน้ำหนักในช่วง 1-5 กรัม) ลงในสารละลายไคโตซาน 1% w/v ในกรดอะซิติกเจือจาง (3% v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน อัดลงแม่พิมพ์พลาสติกเบาๆ นำไประเหิดแห้งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต (0.1% w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วนำไประเหิดแห้งแช่แข็งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงอีกครั้ง

2.1.3 วิเคราะห์ผลเบื้องต้น

วิเคราะห์โครงร่างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และวัดความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์โดยเครื่องวัดมุมสัมผัส (contact angle)

2.1.4 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซรามิกอยู่ด้วย

กระจายพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ และเซรามิกผสม (ประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าไบแคลเซียมฟอสเฟต) ในสารละลายไคโตซาน 1% w/v ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บรรจุในแม่พิมพ์พลาสติกและนำไประเหิดแห้งแช่แข็งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต (0.1% w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วนำไประเหิดแห้งแช่แข็งที่ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อศึกษาโครงสร้างสัณฐาน หาขนาดและการกระจายตัวของไมโครสเฟียร์ด้วยเครื่อง Laser Particle Size Analyzer เปรียบเทียบขนาดและการกระจายตัวของไมโครสเฟียร์เมื่อใช้ 0.5%, 1% หรือ 2% PVA หรือ 1% Tween 80 เป็นตัวประสาน และทดสอบความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้โดยการวัดค่ามุมสัมผัส

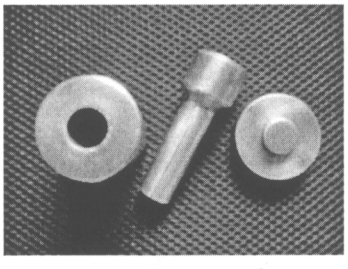
2.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดและมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

2.2.1 เตรียมไคโตซานไมโครสเฟียร์

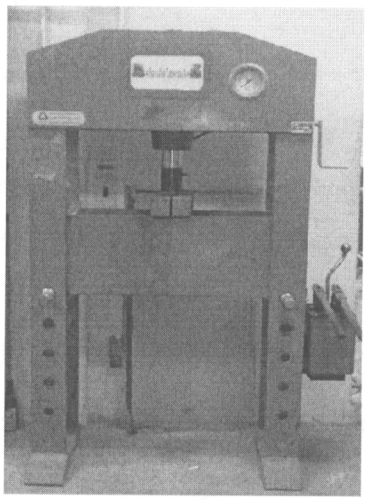
เตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.5% (w/v) ในกรดอะซิติก 0.1 โมลาร์ (pH = 4) ค่อยๆ หยดสารละลายไคโตซานปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟตความเข้มข้น 0.4% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมกวนเบาๆตลอดเวลา กรอง polymer matrix ที่ได้ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บด polymer matrix ให้ละเอียด จะได้ไคโตซานไมโครสเฟียร์เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์

2.2.2 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดและมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

ผสมพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอลให้เข้ากันอย่างดี (อัตราส่วนของแต่ละสารเป็นไปตามตารางที่ 5) ค่อยๆหยดน้ำลงไปเพื่อทำให้สารผสมรวมตัวกันเป็นก้อนแล้วอัดลงแม่พิมพ์พลาสติกเบาๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำไปบรรจุในแม่พิมพ์เหล็กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร (รูปที่ 7) อัดขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิค (รูปที่ 8) ใช้แรง 1 ตันต่อตารางนิ้ว นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อไล่เมนทอลออกไปเกิดเป็นรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทดสอบสมบัติทางกายภาพและ bioactivity



รูปที่ 7 แม่พิมพ์เหล็กที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร



รูปที่ 8 เครื่องอัดไฮดรอลิคสำหรับใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

3. การศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

3.1 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคด้วยเครื่อง SEM

วิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่และหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุกึ่งคุณภาพด้วยเครื่อง SEM-EDX

วิเคราะห์ปริมาณธาตุกึ่งคุณภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ และหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.3 การทดสอบการรับแรงเชิงกล

ทดสอบการรับแรงกด หลังจากการเคลือบเสริมแรงด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์แบบเนื้อแน่น

3.4 การวัดค่ามุมสัมผัส (contact angle)

วัดมุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน (เฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์แบบเนื้อแน่น)

3.5 การวิเคราะห์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity)

วิเคราะห์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยหลักการของ Archimedes มีขั้นตอนดังนี้ ชั่งน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ (m_1) นำโครงเลี้ยงเซลล์จุ่มในน้ำรอจนไม่มีฟองอากาศที่ผิว ชั่งน้ำหนักของ

โครงเลี้ยงเซลล์ในน้ำ (m_2) นำโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นจากน้ำแล้วซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ในอากาศ (m_3) และคำนวณค่าความพรุนตามสมการ

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

3.6 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเครื่อง FTIR

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์โดยหลักการ Fourier Transform Infrared Spectrometry โดยบันทึก IR สเปกตรัมในช่วง 4,000-400 cm^{-1}

4. การทดสอบสมบัติด้านชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเซลล์

4.1 การแยกเซลล์ไขกระดูกและเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกในจานเพาะเลี้ยง

เซลล์ไขกระดูกของคนได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Leong Chooi Fun (ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย Kebangsaan ประเทศมาเลเซีย) แยกให้ได้ primary mesenchymal cells (P_0) ด้วย Ficoll-plaqueTM PLUS (Amersham Biosciences) และเพาะเลี้ยงใน 25 cm^2-flask (Nunc®) ในตู้อบที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อาหารเพาะเลี้ยงเป็นชนิด Dulbecco's modified Eagle medium-F12 (DMEM-F12) ที่เสริมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 2-3 วัน ใช้สภาวะที่เคยรายงานใน [24] เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์กระดูก ดังนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ P_0 จนมีความหนาแน่นประมาณ 60% แล้วให้เปลี่ยนเป็นอาหารชนิดเดียวกันที่เสริมด้วย 1% FBS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ขณะเหนี่ยวนำเซลล์ให้ใช้อาหารที่ไม่มี FBS ให้ FGF2 (Merck Biosciences, Germany) ความเข้มข้น 2.5 ng/ml สัมผัสกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นอาหารที่เสริมด้วย 1% FBS เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นให้เซลล์สัมผัสกับ BMP2 (BioVision, USA) ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงต่อบนโครงเลี้ยงเซลล์

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์

แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างแอลกอฮอล์ที่ติดอยู่ออกให้หมดด้วย PBS วางโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ล้างเซลล์ที่เหนี่ยวนำแล้วในข้อ 4.1 ด้วย PBS 2 ครั้ง ค่อยๆ ขูดเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงด้วย cell scraper กระจายเซลล์ใน PBS ปริมาตรน้อยๆ ให้ได้ความหนาแน่น 10^8/ml ดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 100 µl ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ ทิ้งไว้ในตู้อบที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารที่เสริมด้วย ascorbic acid (50 µg/ml) และ β-glycerophosphate (10 mM) เป็นเวลา 5 วัน

4.3 การหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายหลังเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน

ใช้วิธี MTT ตามรายงานของ Merkline และคณะ [25] ในการหาปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตบนโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนี้ ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง เติมสารทดสอบ MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ใน PBS ในปริมาตรที่มากเกินพอลงไป บ่มในตู้อบ 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดสารทดสอบที่เหลือออกให้หมด ละลาย

ผลิตภัณฑ์ formazan ที่เกิดขึ้นด้วย dimethylsulphoxide (DMSO) วัดความเข้มการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ใช้ DMSO เป็นแบงค์ สร้างกราฟมาตรฐานจากจำนวนเซลล์ที่ทราบแน่นอน และดำเนินการทดลองแบบเดียวกับที่กล่าวข้างต้น คำนวณจำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานดังกล่าว

4.4 การหา alkaline phosphate (ALP) activity เมื่อเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี lysis buffer (BD Biosciences, Milano, Italy) ปริมาตร 300 µl ทำเซลล์ให้แตกที่อุณหภูมิ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 45 นาที วิเคราะห์หาแอคทิวิตีของเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทสตามวิธีของ Greenwald และคณะ [26] ดังนี้ ดูด cell lysate 200 µl ใส่ลงในหลอดที่มี ALP substrate buffer (75 mM p-nitrophenyl phosphate in 0.7 M glycine buffer pH 8.5 and 6.7 mM $MgCl_2$) ปริมาตร 200 µl บรรจุอยู่ เติม glycine buffer ปริมาตร 500 µl ลงไป ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที เติม 0.5 M NaOH ปริมาตร 100 µl ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหารด้วยค่า OD_{570} จากการวิเคราะห์ MTT ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

4.5 การสะสมเกลือแร่ของเซลล์กระดูก ศึกษาโดยเทคนิค Alizarin red S staining

ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ตรึงเซลล์ที่เกาะอยู่โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในแอลกอฮอล์ 70% ที่อุณหภูมิ -48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ย้อมด้วย 2% alizarin red S, pH 4.2 นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นและ PBS ตามลำดับ ชะส่วนที่มีการสะสมของเกลือแร่ด้วย 10% cetylpyridinium chloride และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ใช้สารละลายมาตรฐานแคลเซียมความเข้มข้นช่วง 0-0.2 µM ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน และคำนวณปริมาณเกลือแร่ที่สะสมบนโครงเลี้ยงเซลล์จากกราฟมาตรฐานดังกล่าว หารค่าที่ได้นี้ด้วยค่า OD_{570} จากการวิเคราะห์ MTT ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

4.6 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเลียนแบบของเหลวในร่างกาย

ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ให้มีขนาดกว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 20 mm x 20 mm x 0.15 mm ชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (W_0) แช่ใน PBS ปริมาตร 50 ml วางลงในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าเบาๆ ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ไว้ออกมาตามช่วงเวลาที่กำหนด ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ทำให้แห้งด้วยเทคนิคระเหิดแห้งแช่แข็ง ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W_1) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสลายตัว (The degree of degradation) ตามสูตร $(W_0 - W_1)/W_0 \times 100$

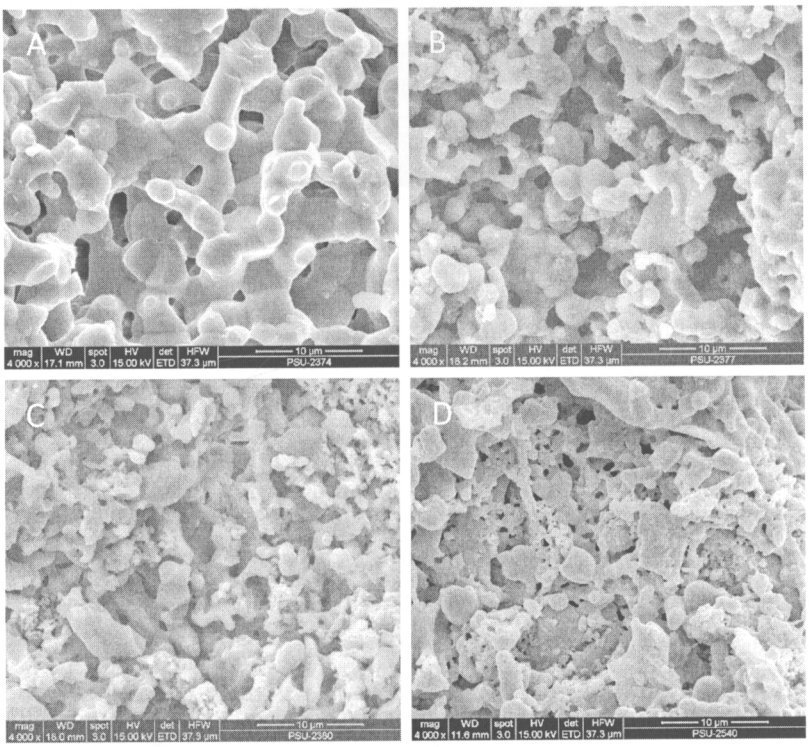
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบเนื้อแน่น

จากการศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อโครงสร้างและสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นใน ที่เตรียมจากสารผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่มี และไม่มีแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ ได้ผลการทดลองตามลำดับ ดังนี้

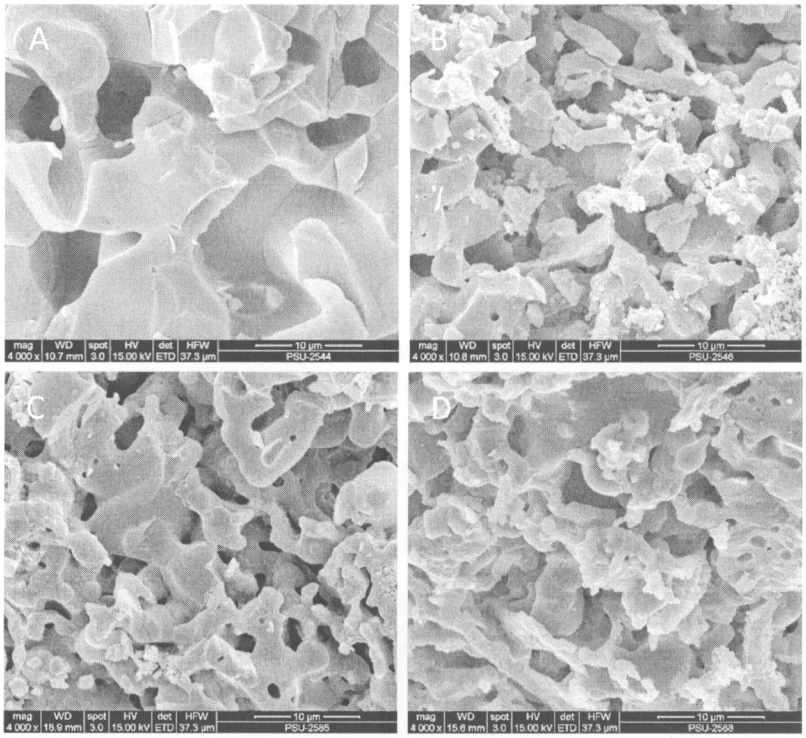
1.1 โครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นใน

เมื่อตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เตรียมได้ ในแต่ละอัตราส่วน และเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1150 หรือ 1250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค SEM ผลแสดงในรูปที่ 9 และ 10



รูปที่ 9 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เตรียมได้ในแต่ละอัตราส่วน และเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1150 องศาเซลเซียส (A) HTC1, (B) HTC2, (C) HTC3 และ (D) HTC4 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

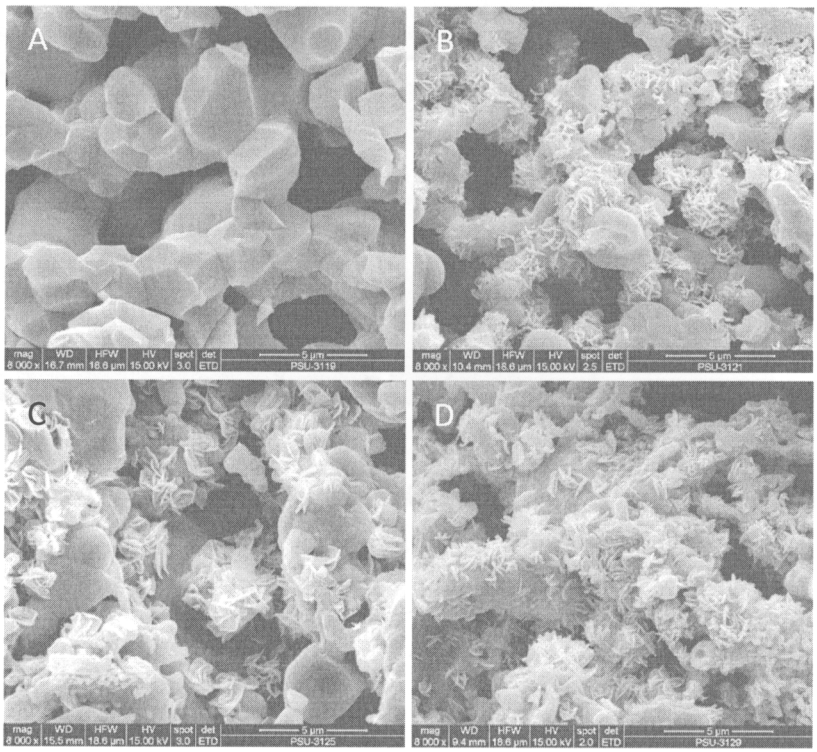


รูปที่ 10 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เตรียมได้ในแต่ละอัตราส่วน และเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส (A) HTC1, (B) HTC2, (C) HTC3 และ (D) HTC4 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM

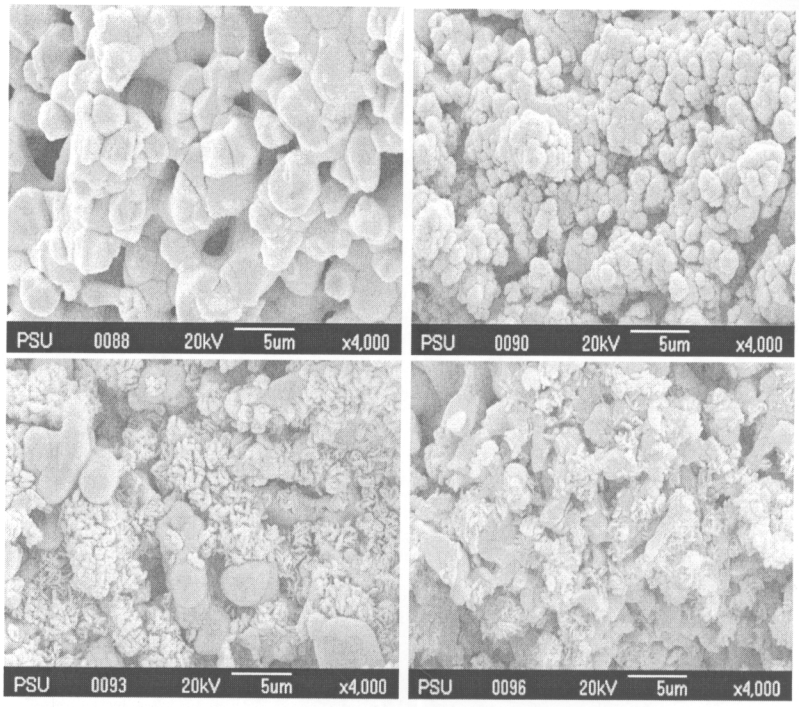
จากรูปที่ 9 และ 10 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรทั้งที่เผาผนึกที่ 1150 และ 1250 องศาเซลเซียส มีรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป โดยสูตร HTC1 มีลักษณะเกรนที่ใหญ่และผิวมันวาวกว่าสูตรอื่นๆอย่างชัดเจนโดยเฉพาะเมื่อเผาผนึกที่ 1250 องศาเซลเซียส สามารถเรียงลำดับขนาดเกรนจากใหญ่ไปเล็กได้ดังนี้ HTC1>HTC2>HTC3>HTC4 จึงสรุปได้ว่าเมื่อปริมาณแคลเซียมซิลิเกตเพิ่มขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์จะมีขนาดรูพรุนเล็กลง แต่ความพรุนเพิ่มขึ้น อนุภาคของแคลเซียมซิลิเกตแทรกตัวอยู่ระหว่างไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟต และมีบางส่วนอยู่ที่บริเวณขอบของเกรนซึ่งไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับสารผสมข้างต้น

1.2 โครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในหลังการแช่ในสารละลาย PBS

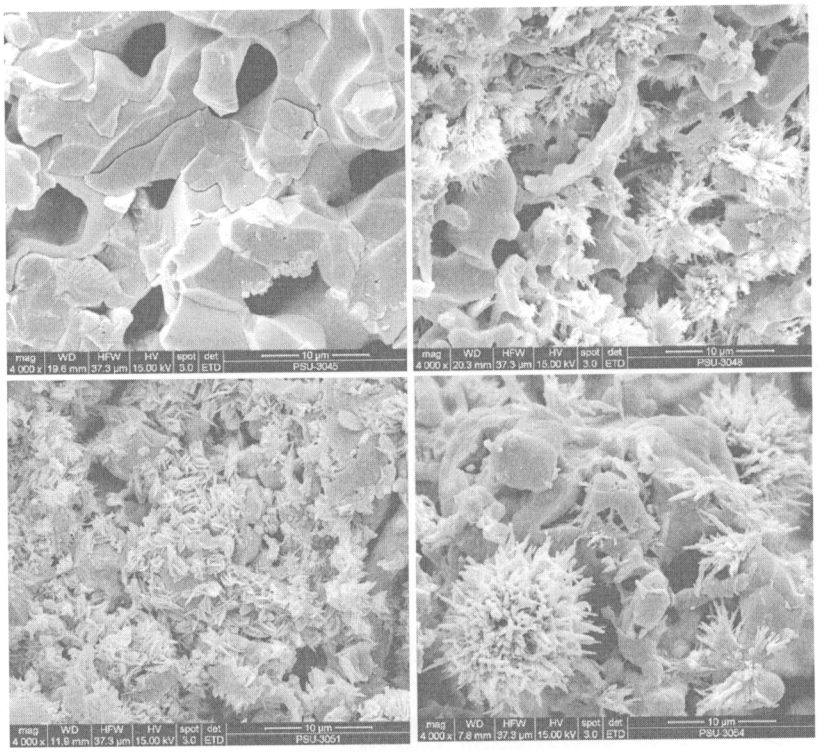
ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ในข้อ 1.1 หลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 11-14



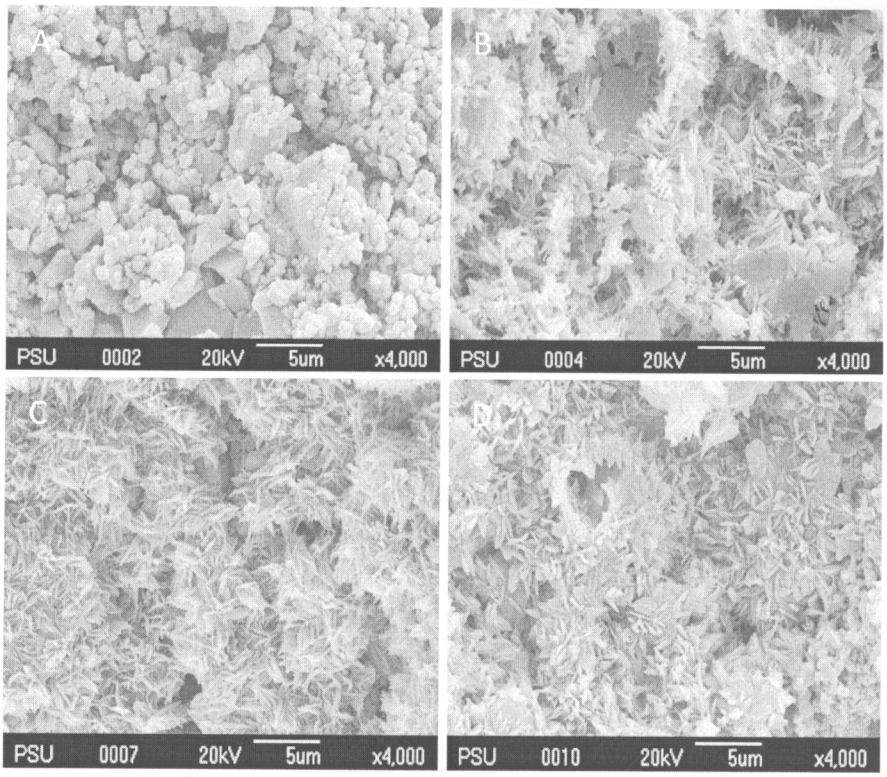
รูปที่ 11 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ในแต่ละอัตราส่วน และเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1150 องศาเซลเซียส ภายหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM (A) HTC1, (B) HTC2, (C) HTC3 และ (D) HTC4



รูปที่ 12 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ในแต่ละอัตราส่วน และเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1150 องศาเซลเซียส ภายหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM (A) HTC1, (B) HTC2, (C) HTC3 และ (D) HTC4



รูปที่ 13 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เตรียมได้ในแต่ละอัตราส่วน และเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส ภายหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM (A) HTC1, (B) HTC2, (C) HTC3 และ (D) HTC4



รูปที่ 14 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เตรียมได้ในแต่ละอัตราส่วน และเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส ภายหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM (A) HTC1, (B) HTC2, (C) HTC3 และ (D) HTC4

รูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงที่พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยมีการก่อตัวของผลึกอะพาไทต์ซึ่งมีรูปร่างทรงรีค่อนข้างกลม ตัวหนอน และจะสังเกตได้ชัดหลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (รูปที่ 12) สูตร HTC1 ซึ่งไม่มีแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ จากการสังเกตพบว่ามีผลึกอะพาไทต์เกิดขึ้นน้อยมากในช่วง 2 สัปดาห์แรก ตรงกันข้ามกับสูตรที่มีแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ เมื่อปริมาณแคลเซียมซิลิเกตเพิ่มขึ้น จำนวนผลึกอะพาไทต์จะเพิ่มขึ้นด้วย เรียงลำดับปริมาณผลึกที่เกิดขึ้นภายในช่วง 2 สัปดาห์หลังการแช่สารละลาย PBS ดังนี้ HTC4>HTC3>HTC2 >HTC1 และเมื่อพิจารณาการเกิดผลึกอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์โดยไม่คำนึงว่าเผาผนึกที่อุณหภูมิใดจะพบว่าปริมาณการเกิดผลึกอะพาไทต์เป็นไปตามปริมาณของแคลเซียมซิลิเกตที่เติม และระยะเวลาในการแช่สารละลาย PBS นอกจากนี้ปริมาณการเกิดผลึกบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เผาผนึกที่อุณหภูมิสูงกว่าคือ 1250 องศาเซลเซียส ยังมีมากกว่าที่เผาผนึกที่อุณหภูมิต่ำกว่าคือ 1150 องศาเซลเซียสอีกด้วย เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของสารเหมือนกัน (รูปที่ 13 และ 14)

1.3 ธาตุองค์ประกอบของชั้นผลึกอะพาไทต์ที่เกิดขึ้น

การก่อตัวของผลึกอะพาไทต์สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนภายหลังการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และจะปกคลุมทั่วพื้นผิวเมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ สามารถยืนยันได้จากการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของชั้นอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค SEM-EDX ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5-7

ตารางที่ 5 ธาตุองค์ประกอบบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เผาผนึกที่อุณหภูมิ 1150 องศาเซลเซียส ภายหลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สูตร HTC1, HTC2, HTC3 และ HTC4

ธาตุ	สูตร			
	HTC1	HTC1	HTC3	HTC4
C	2.479	3.108	2.918	3.678
O	14.388	16.63	18.898	17.616
Si	0.299	8.569	13.58	14.69
P	22.029	17.581	14.443	11.87
Ca	59.146	50.95	47.49	44.083
Others	1.659	3.162	2.671	8.063
Total	100	100	100	100
Ca/P	2.68	2.88	3.29	3.71
Si/(Ca+P)	1.12	3.08	4.13	3.96

ตารางที่ 6 ธาตุองค์ประกอบบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เผาผนึกที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส ภายหลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สูตร HTC1, HTC2, HTC3 และ HTC4

ธาตุ	สูตร			
	HTC1	HTC1	HTC3	HTC4
C	2.988	3.282	3.608	3.579
O	13.168	19.167	18.668	19.452
Si	0	7.886	8.897	14.967
P	18.815	17.827	15.876	12.321
Ca	51.59	49.591	49.056	41.064
Others	13.439	2.247	3.895	8.617
Total	100	100	100	100
Ca/P	2.74	2.78	3.09	3.33
Si/(Ca+P)	0	2.84	2.88	4.49

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบอัตราส่วนของ Ca/P และ Si/(Ca+P) ของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่เผาผนึกที่อุณหภูมิ 1150 และ 1250 องศาเซลเซียส ภายหลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สูตร	Ca/P		Si/(Ca+P)	
	1150 ^{o}C	1250 ^{o}C	1150 ^{o}C	1250 ^{o}C
HCT1	2.68	2.74	1.12	0
HCT2	2.88	2.78	3.08	2.84
HCT3	3.29	3.09	4.13	2.88
HCT4	3.71	2.88	3.96	4.49

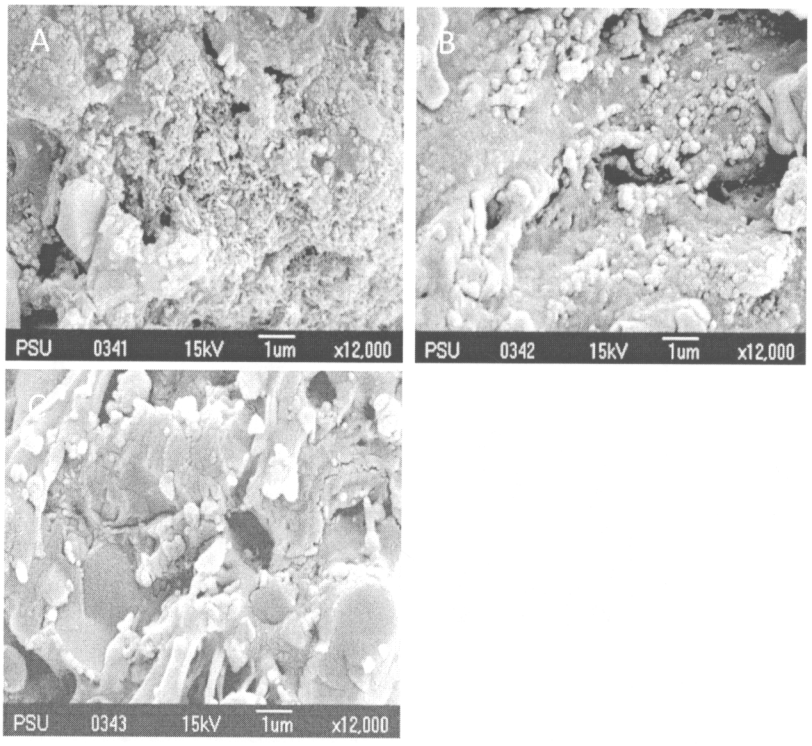
จากรูปที่ 11-14 จะพบว่าภายหลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ผลึกอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นบนโครงเลี้ยงเซลล์มีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้เผาผนึก และการมีอยู่ของแคลเซียมซิลิเกต กล่าวคือ เมื่อเผาผนึกที่ 1150 องศาเซลเซียส และโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีแคลเซียมซิลิเกต ผลึกอะพาไทต์จะมีรูปร่างกลมคล้ายดอกกะหล่ำปลี เมื่อเติมแคลเซียมซิลิเกตลงไป ผลึกอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นๆ และเกิดการสะสมของผลึกอะพาไทต์รูปร่างกลมบนแผ่นอะพาไทต์เดิมจนมีลักษณะคล้ายตัวหนอนเมื่อระยะเวลาการแช่ในสารละลาย PBS นานขึ้น ส่วนเมื่อเผาโครงเลี้ยง

เซลล์ที่ 1250 องศาเซลเซียส ผลึกอะพาไทต์ลักษณะเป็นแผ่นๆ มีแนวโน้มเกิดขึ้นได้เร็วกว่าที่มีรูปร่างกลมเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์มีแคลเซียมซิลิเกตอยู่ด้วย ส่วนที่ไม่ได้ผสมแคลเซียมซิลิเกตลงไปผลึกอะพาไทต์จะมีรูปร่างกลมเช่นเดิม

ภายหลังการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราส่วนของ Ca/P มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในสูตร HCT1-HCT4 ในขณะที่อัตราส่วน Si/(Ca+P) เพิ่มขึ้นต่อเนื่องในสูตร HCT1-HCT3 และลดลงในสูตร HCT4 เมื่อเผาผนึกที่ 1150 องศาเซลเซียส แต่อัตราส่วนของ Ca/Pจะเพิ่มขึ้นในสูตร HCT1-HCT3 และลดลงในสูตร HCT4 ในขณะที่อัตราส่วน Si/(Ca+P) เพิ่มขึ้นต่อเนื่องในสูตร HCT1-HCT4 เมื่อเผาผนึกที่ 1250 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 7) การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนทั้งสองนี้ แสดงให้เห็นว่าการสะสมของชั้นอะพาไทต์จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเติมแคลเซียมซิลิเกตลงไป และเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคลเซียมซิลิเกตในสูตรมากขึ้น แต่เมื่อสัดส่วนดังกล่าวเพิ่มขึ้นแล้วกลับลดลง แสดงว่าชั้นอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นใหม่มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างไปจากที่สะสมอยู่เดิม ซึ่งสามารถเปรียบเทียบความแตกต่างดังกล่าวได้ชัดเจนจากรูปที่ 13 และ 14

1.4 โครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน

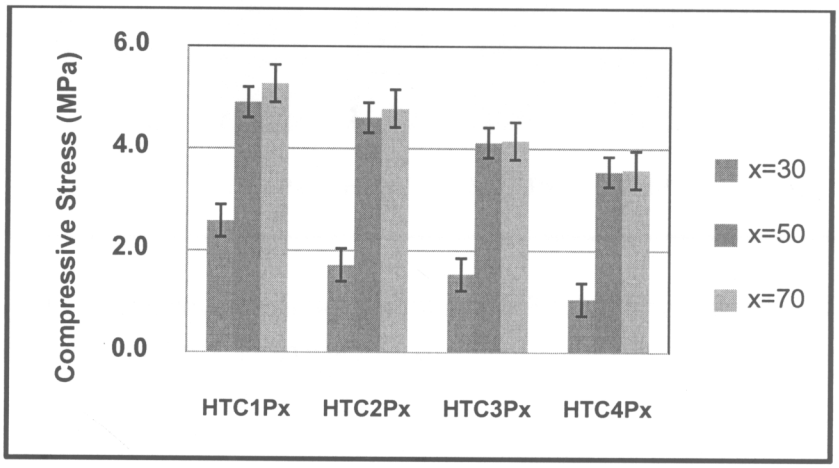
รูปที่ 15 แสดงโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน ภายหลังการแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี %PCL สูงๆ เช่น 70 %wt จะไม่ค่อยพบการสะสมของผลึกอะพาไทต์ที่ผิวสัมผัส ทั้งนี้เนื่องจากพอลิคาโปรแลคโตนเป็นสารที่ไม่เปียกน้ำ จึงป้องกันไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมซิลิเกตไม่ให้สัมผัสกับน้ำ ผลึกอะพาไทต์จึงเกิดได้น้อย แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี %PCL ในสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนต่ำ เช่น 30 %wt ซึ่งสารละลาย PBS จะซึมผ่านรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่า จึงเกิดการสะสมของอะพาไทต์ได้ดีกว่า อย่าไรก็ตามเมื่อปริมาณ PCL ในสารเคลือบลดลงจะส่งผลต่อความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งทำให้มีค่าลดลงด้วย



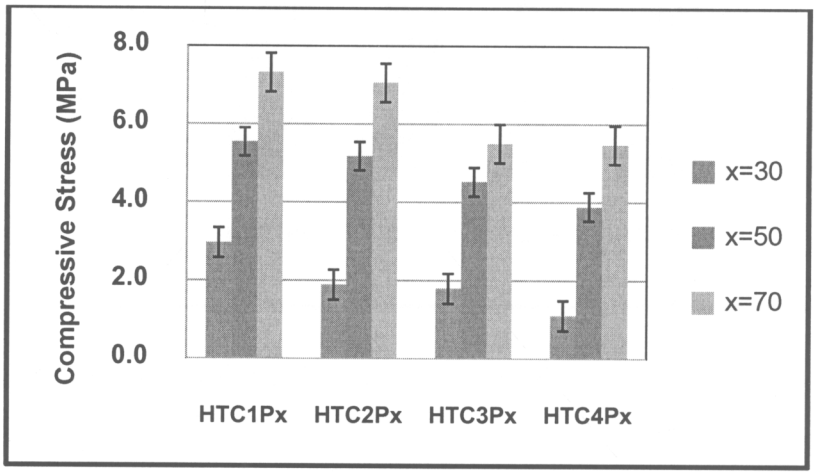
รูปที่ 15 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ HTC3 ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน ภายหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM (A) PCL 30 %wt, (B) PCL 50 %wt, (C) PCL 70 %wt

1.5 สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน

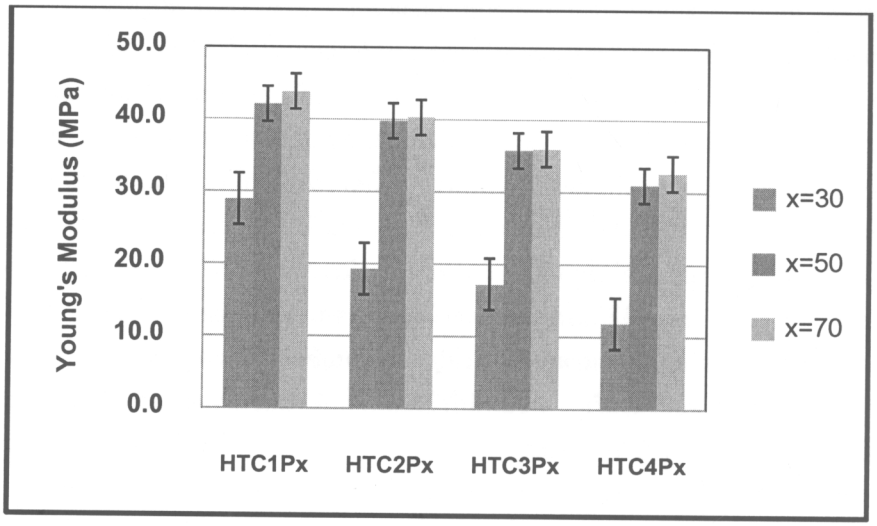
เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์สูตร HCT1-HCT4 มาเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี PCL 30, 50 หรือ 70 %wt มาทดสอบความแข็งแรงเชิงกล (mechanical strength) ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 16-19



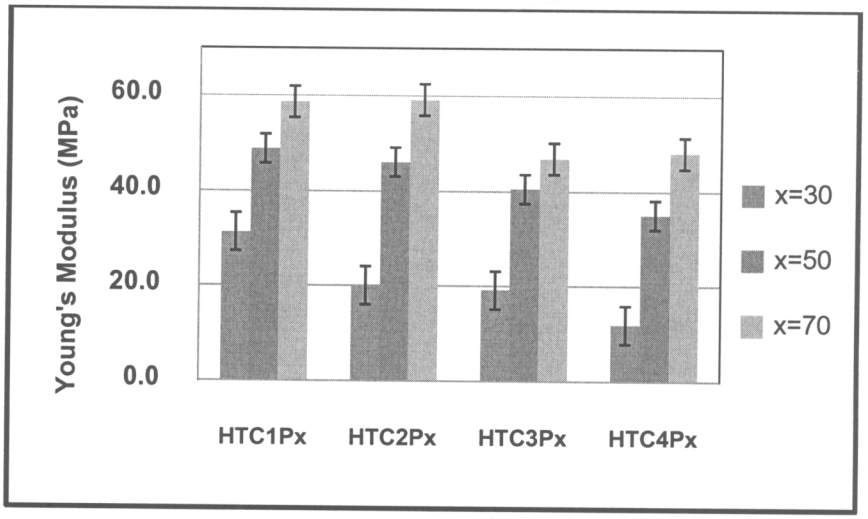
รูปที่ 16 ค่ากำลังอัด (MPa) ของโครงเลี้ยงเซลล์ HCT1-HCT4 เผาผนึกที่ 1150 องศาเซลเซียส และเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี PCL 30, 50 หรือ 70 %wt



รูปที่ 17 ค่ากำลังอัด (MPa) ของโครงเลี้ยงเซลล์ HCT1-HCT4 เผาผนึกที่ 1250 องศาเซลเซียส และเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี PCL 30, 50 หรือ 70 %wt



รูปที่ 18 ค่ามอดูลัสของยังของโครงเลี้ยงเซลล์ HCT1-HCT4 เผาผนึกที่ 1150 องศาเซลเซียส และเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี PCL 30, 50 หรือ 70 %wt



รูปที่ 19 ค่ามอดูลัสของยังของโครงเลี้ยงเซลล์ HCT1-HCT4 เผาผนึกที่ 1250 องศาเซลเซียส และเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี PCL 30, 50 หรือ 70 %wt

จากรูปที่ 16-17 จะพบว่าอัตราส่วนองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นใน และอุณหภูมิที่ใช้ในการเผาผนึก ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อกำลังอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของ PCL ในสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนมีผลอย่างมากต่อกำลังอัดดังกล่าว กล่าวคือ ไม่ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในจะเป็นสูตรใดหากเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี PCL 70 wt% จะรับกำลังอัดได้ดีที่สุด ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่สารเคลือบมี PCL 30 wt% จะรับกำลังอัดได้น้อยที่สุด เรียงลำดับกำลังอัดจากมากไปน้อยได้ดังนี้ HTCxP70 > HTCxP50 > HTCxP70 อย่างไรก็ตาม ถ้านำปัจจัยการมีอยู่ของแคลเซียมซิลิเกตในโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในมาพิจารณาด้วยจะพบว่า สูตรที่ไม่มีแคลเซียมซิลิเกตจะรับกำลังอัดได้ดีที่สุดในที่นี้คือสูตร HTC1P70 ซึ่งรับกำลังอัดได้ 7.318 MPa ส่วนสูตรที่มีแคลเซียมซิลิเกตอยู่ด้วย ความสามารถในการรับกำลังอัดของโครงเลี้ยงเซลล์จะลดลงเมื่อปริมาณแคลเซียมซิลิเกตที่เติมเข้าไปเพิ่มขึ้น เรียงลำดับความสามารถในการรับกำลังอัดจากมากไปน้อยได้ดังนี้ HTC1Px > HTC2Px > HTC3Px > HTC4Px เมื่อ x มีค่าเท่ากันซึ่งหมายถึงเปอร์เซ็นต์ของ PCL ในสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน โดย x = 30, 50 หรือ 70%) ในทำนองเดียวกับค่ามอดูลัสของยัง (รูปที่ 18-19) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สารเคลือบมี %PCL มากกว่าจะให้ค่ามอดูลัสของยังมากกว่าด้วย อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิที่ใช้เผาผนึกโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในมีผลต่อค่ามอดูลัสของยังมากกว่าค่ากำลังอัด โดยเมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า (ที่ 1250 องศาเซลเซียส) จะส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนแล้ว มีค่ามอดูลัสของยังสูงกว่าที่เผาผนึกที่อุณหภูมิต่ำกว่า (ที่ 1150 องศาเซลเซียส) นั่นคือ โครงเลี้ยงเซลล์ HTC1P70 ที่แกนชั้นในผ่านการเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1250 $^{\circ}$C จะให้ค่ามอดูลัสของยังสูงสุดคือ 58.66 MPa

1.6 ค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนแล้วมาวัดค่ามุมสัมผัส ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนแล้ว

สูตร	Contact angle (องศา)
HCTxP30	71.43
HCTxP50	76.93
HCTxP70	78.60

จากตารางที่ 8 จะพบว่าค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี %PCL สูงกว่าจะมีค่ามากกว่า เรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ HCTxP70 > HCTxP50 > HCTxP30 แสดงว่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับ %PCL ที่มีอยู่ในสารเคลือบ

จากรูปที่ 9 และ 10 พบว่าเมื่อเผาผนึกโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่อุณหภูมิสูงกว่า 1100 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นจุดหลอมเหลวของไฮดรอกซีอะพาไทต์ จะเกิดการหลอมของเกรนส่งผลให้เกรนมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนไตรแคลเซียมฟอสเฟตมีจุดหลอมเหลวที่สูงกว่าคือ 1670 องศาเซลเซียส จะยังไม่หลอมละลาย แต่ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่หลอมละลายแล้วจะรวมกับเกรนของไตรแคลเซียมฟอสเฟต ทำให้เกรนมีขนาดใหญ่ขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้เมื่ออุณหภูมิที่ใช้เผาผนึกสูงกว่า 1230 องศาเซลเซียส (กรณีเผาผนึกที่ 1250 องศาเซลเซียส) ยังส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนเฟสจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ไปเป็นไตรแคลเซียมฟอสเฟตด้วย กระบวนการนี้มีการคายความร้อนออกมา ส่งผลให้อุณหภูมิที่ต้องใช้เพื่อหลอมผลึกไตรแคลเซียมฟอสเฟตลดลง เกิดการหลอมละลายของไตรแคลเซียมฟอสเฟตเพิ่มขึ้นแม้จะเป็นอุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวมากก็ตาม จึงสังเกตเห็นขอบของเกรนได้ไม่ชัดเจน (เปรียบเทียบรูปที่ 9A และ 10A)

พบว่าแคลเซียมซิลิเกตมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตมาก โครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่มีแคลเซียมซิลิเกตเป็นส่วนประกอบจึงมีขนาดรูพรุนลดลงเมื่อปริมาณแคลเซียมซิลิเกตในสูตรเพิ่มขึ้น เนื่องจากผลึกแคลเซียมซิลิเกตเข้าไปแทรกในช่องว่างระหว่างเกรนของไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟต เมื่อเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1150 องศาเซลเซียส เฉพาะเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์เท่านั้นที่เกิดการหลอมละลาย ส่วนแคลเซียมซิลิเกตไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากมีจุดหลอมเหลวที่ 1540 องศาเซลเซียส ขนาดเกรนของไฮดรอกซีอะพาไทต์จึงขยายใหญ่ขึ้น ในขณะเดียวกันก็ผลักแคลเซียมซิลิเกตซึ่งมีขนาดเล็กกว่ามาอยู่ที่ขอบของเกรน แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้เผาผนึกเป็น 1250 องศาเซลเซียส ไฮดรอกซีอะพาไทต์จะเกิดการหลอมเหลวเพิ่มขึ้นพร้อมกับเปลี่ยนเฟสเป็นไตรแคลเซียมฟอสเฟตและให้พลังงานความร้อนออกมา การหลอมละลายของเฟสทั้งสามจึงเกิดได้ดีที่อุณหภูมินี้เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 1150 องศาเซลเซียส จึงสังเกตขอบของเกรนได้ไม่ชัดเจนเช่นเดียวกับข้างต้น นอกจากนี้ขนาดรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ยังเล็กลงด้วยเมื่อมีแคลเซียมซิลิเกตในสูตรเพิ่มขึ้น (เปรียบเทียบรูปที่ 9B-C และ 10B-C)

ภายหลังการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในในสารละลาย PBS เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์พบว่าอุณหภูมิที่ใช้เผาผนึกที่สูงกว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเฟสที่เป็นรูปทรงอสัณฐาน (amorphous form) ได้ดีกว่า เฟสลักษณะนี้มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารเดิม ไอออนต่างๆ ในสารละลาย PBS จึงมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งการละลายของแคลเซียมซิลิเกตทำให้เกิด $-Si-O^-$ ที่ผิวหน้าจำนวนมาก และเป็นจุดที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนกลับมาของไอออนกลายเป็นชั้นอะพาไทต์ ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่ผ่านการเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียสและมีแคลเซียมซิลิเกตในสัดส่วนที่มากกว่าจึงเกิดการสะสมของชั้นอะพาไทต์ได้มากกว่า (เปรียบเทียบรูปที่ 11-14)

กำลังอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในที่ผ่านการเผาผนึกที่ 1150 องศาเซลเซียสและเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน ไม่ได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโครงสร้างชั้นในอย่างเป็นนัยสำคัญ แต่

ขึ้นอยู่กับ %PCL ที่ผสมในสารผสมที่ใช้เคลือบโครงเลี้ยงเซลล์ ถ้ามีปริมาณ PCL มาก ค่าความเค้นอัดและค่ามอดูลัสของยังก็จะมีค่ามาก แต่เมื่อใช้อุณหภูมิที่เผาผนึกสูงกว่า (ที่ 1250 องศาเซลเซียส) จะส่งผลต่อค่ามอดูลัสของยัง โดยส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนแล้วมีค่ามอดูลัสของยังสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเผาผนึกที่อุณหภูมิต่ำกว่า (ที่ 1150 องศาเซลเซียส) ผลทั้งสองอย่างนี้ขึ้นอยู่กับว่าสารผสมเกิดการหลอมเป็นเนื้อเดียวกันได้มากน้อยเพียงใด ความเป็นเนื้อเดียวของสารองค์ประกอบจะพบได้สูงสุดในสูตร HTC1 ซึ่งผ่านการเผาผนึกที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อเคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนที่มี PCL 70% (ในที่นี้คือสูตร HCT1P70) จะให้ความเค้นอัดและค่ามอดูลัสของยังสูงสุด เทียบเท่ากับค่าทั้งสองของ cancellous bone [27]

มุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตนทุกสูตร มีค่าน้อยกว่า 90 องศา แสดงถึงความชอบน้ำของพื้นผิว คาดว่าโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวน่าจะเหมาะสมต่อการยึดเกาะของเซลล์กระดูก ซึ่งต้องทำการทดลองใน in vitro โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

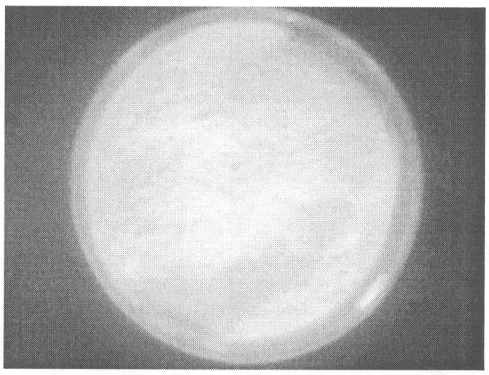
2. โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบมีรูพรุน

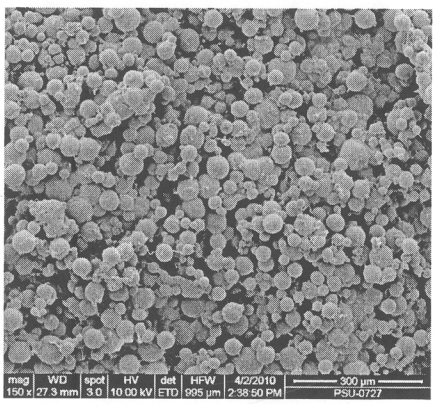
2.1 การเตรียมพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์

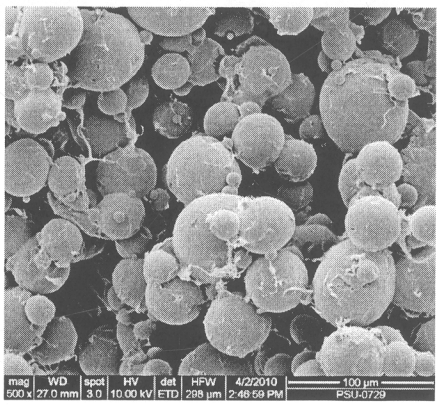
ลักษณะของพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ที่ได้เป็นผงสีขาวละเอียด (รูปที่ 20A) เมื่อวิเคราะห์โครงร่างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกระจายในช่วง 5-50 ไมครอน (รูปที่ 20B และ C)

2.2 หาตัวประสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์

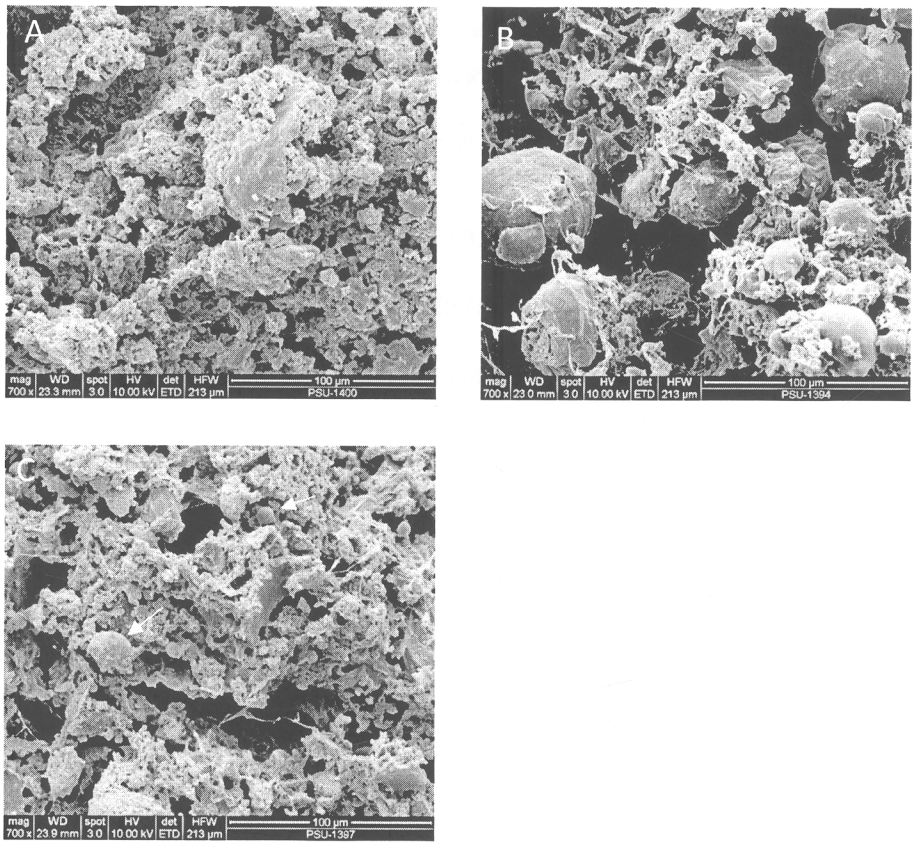
นอกจากการใช้ 0.5% PVA ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ในการเตรียมไมโครสเฟียร์ยังได้ดัดแปลงทั้ง % และชนิดของตัวประสานที่ใช้ด้วยเพื่อหาตัวประสานที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามไม่สามารถเตรียมผงสีขาวของพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์จากการใช้ 0.5% และ 2% Tween 80 ได้ ส่วนผงสีขาวที่เกิดจาก 1% Tween 80 เมื่อวิเคราะห์โครงร่างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าไม่มีลักษณะเป็นไมโครสเฟียร์ (รูปที่ 21A) แต่เกิดไมโครสเฟียร์ขึ้นเมื่อใช้ 1% และ 2% PVA เป็นตัวประสาน (รูปที่ 21B และ C) แม้จะสังเกตไมโครสเฟียร์ได้ไม่ชัดเจนมากนักเนื่องจากได้ผสมผงไบแคลเซียมฟอสเฟตลงไปด้วยเพื่อให้สามารถวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานได้ จากการวิเคราะห์ขนาดและการกระจายของอนุภาค พบว่าไมโครสเฟียร์มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 33.37 ± 35.22, 22.37 ± 18.87 และ 36.75 ± 30.12 ไมครอน เมื่อใช้ 0.5%, 1% และ 2% PVA ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อพิจารณาการกระจายของขนาดอนุภาคพบว่าการใช้ 1% และ 2% PVA มีการกระจายของขนาดอนุภาคมากกว่าที่ใช้ 0.5% PVA (ตารางที่ 9) ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไมโครสเฟียร์กรณีหลังนี้ จึงมีรูพรุนภายในโครงสร้างขนาดใกล้เคียงกันซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ต้องการ เปอร์เซ็นต์ผลได้ (%yield) ของการเตรียมไมโครสเฟียร์เท่ากับ 74 % ส่วนที่สูญเสียไปเกิดขึ้นในขั้นตอนการปั่นล้าง นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพการเกิดไมโครสเฟียร์ขึ้นอยู่กับปริมาณและความหนืดของตัวประสานด้วย เมื่อตัวประสานมีความหนืดน้อยทำให้การกวนเกิดขึ้นได้ดีจึงเกิดไมโครสเฟียร์ได้มาก







รูปที่ 20 ผงละเอียดสีขาวของพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมจากการใช้ 0.5% PVA เป็นตัวประสาน (A) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะทรงกลมของพอลิคาโปรแลคโตนไมโครส-เฟียร์ที่กำลังขยาย 150 เท่า (B) และที่กำลังขยาย 500 เท่า (C)



รูปที่ 21 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะของพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยผสมไบแคลเซียมฟอสเฟต กับไมโครสเฟียร์ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) เพื่อขึ้นรูปโครงสร้าง 3 มิติ ใช้ 1% Tween 80 (A), 1% PVA (B) และ 2% PVA (C) เป็นตัวประสานในขั้นตอนการเตรียมไมโครสเฟียร์

ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ได้ผสมไบแคลเซียมฟอสเฟต และพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักเข้าด้วยกัน จากนั้นกระจายในสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) (แต่อย่าให้เปียกเกินไป) แล้วอัดลงแม่พิมพ์พลาสติก นำไประเหิดแห้งก่อนแช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1% (w/v) เพื่อทำให้เกิดโยงไขว้ (cross-linking) จากการวิเคราะห์โครงร่างสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าไบแคลเซียมฟอสเฟตและพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ กระจายอย่างสม่ำเสมอในเมตริกซ์ของไคโตซานที่ผ่านการโยงไขว้ (รูปที่ 21B และ C) และไม่สามารถวัดค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ได้

เนื่องจากมีความพรุนมาก คาดว่าจะสามารถนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ไปทดสอบสมบัติ osteoconductivity ต่อไป

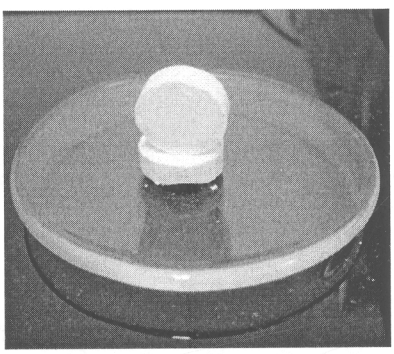
ตารางที่ 9 ขนาดและการกระจายของขนาดพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์เมื่อใช้สารละลาย PVA ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆกันเป็นตัวประสาน

Parameters	0.5% PVA	1% PVA	2% PVA
Mean (μm)	53.37	22.37	36.75
Median (μm)	50.75	15.51	28.54
Mean/Median ratio:	1.052	1.442	1.288
S.D. (μm)	35.22	19.87	30.12
Variance (μm^2)	1240	394.7	906.9
Size distribution (μm)			
<10%	8.44	3.05	4.68
<25%	23.54	7.17	12.89
<50%	50.75	15.51	28.54
<75%	78.07	32.30	53.36
<90%	102.8	51.01	84.08

2.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัดซึ่งมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน

ผสมพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอลตามอัตราส่วนในตารางที่ 10 (อัตราส่วนระหว่างสาร hydrophobic คือพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ และสาร hydrophilic คือไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และไคโตซานไมโครสเฟียร์) และขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคการอัด (รูปที่ 22) เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจะเกิดรูพรุนภายในโครงสร้างเนื่องจากการระเหยออกไปของเมนทอล ค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณสาร hydrophobic ที่เติมลงไป กล่าวคือ ถ้ามี % พอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์สูงจะให้ค่ามุมสัมผัสสูง ส่วนถ้ามี % พอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ต่ำก็จะให้ค่ามุมสัมผัสต่ำ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์มากกว่า 60% (คือสูตร C7, C8 และ C9) ให้ค่ามุมสัมผัส

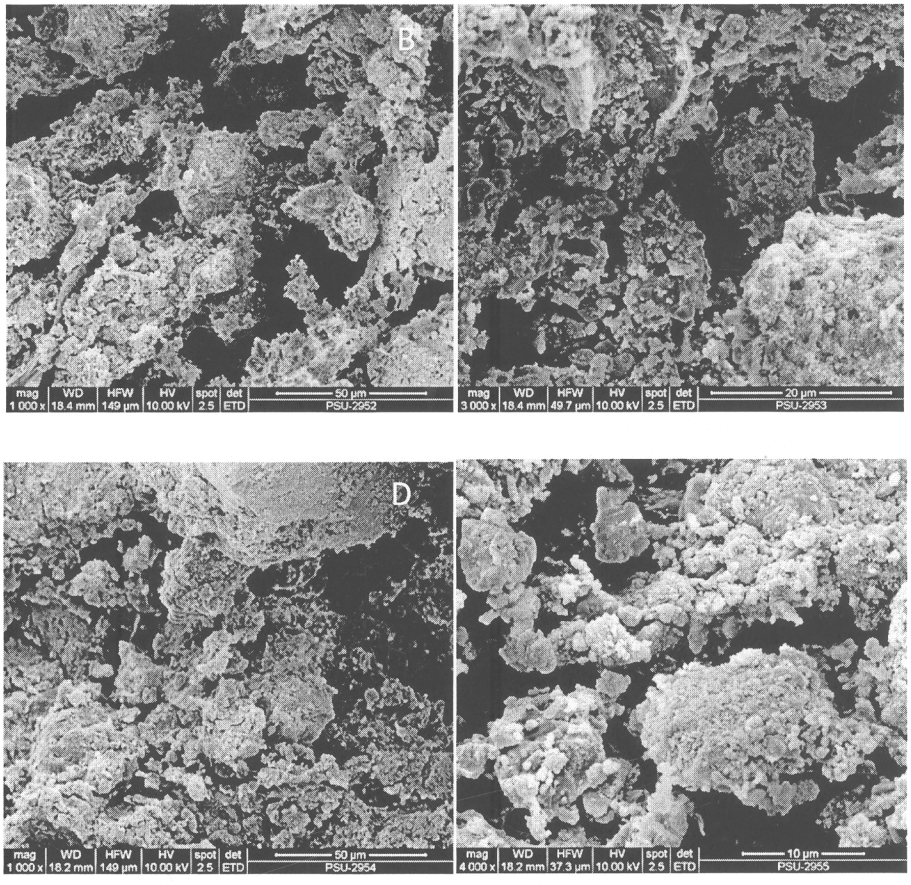
ในช่วง 71-74 องศา ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 60% จะเกิดการบวมตัวและแตกออกเมื่อแช่ในน้ำ จึงไม่นำมาศึกษาอีกต่อไป วัดค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้เท่ากับ 79.57 ± 2.98, 79.78 ± 2.29 และ 83.00 ± 1.26 % สำหรับสูตร C7, C8 และ C9 ตามลำดับ (รูปที่ 23 และ 24) เนื่องจากความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ การที่เซลล์จะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ และเป็นช่องทางที่เซลล์ใช้ขับถ่ายของเสีย ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 70% แสดงว่าเมนทอลที่ใช้ในสูตร C7-C9 มีปริมาณที่เหมาะสมแล้ว นอกจากนี้รูพรุนยังมีลักษณะเชื่อมต่อกันด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ในภาพรวม สูตร C7 น่าจะเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีปริมาณไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตมากที่สุด ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติ bioactivity ที่ดีเนื่องจากเกิดผลึกอะพาไทต์ได้มากเมื่อแช่ในสารละลาย PBS



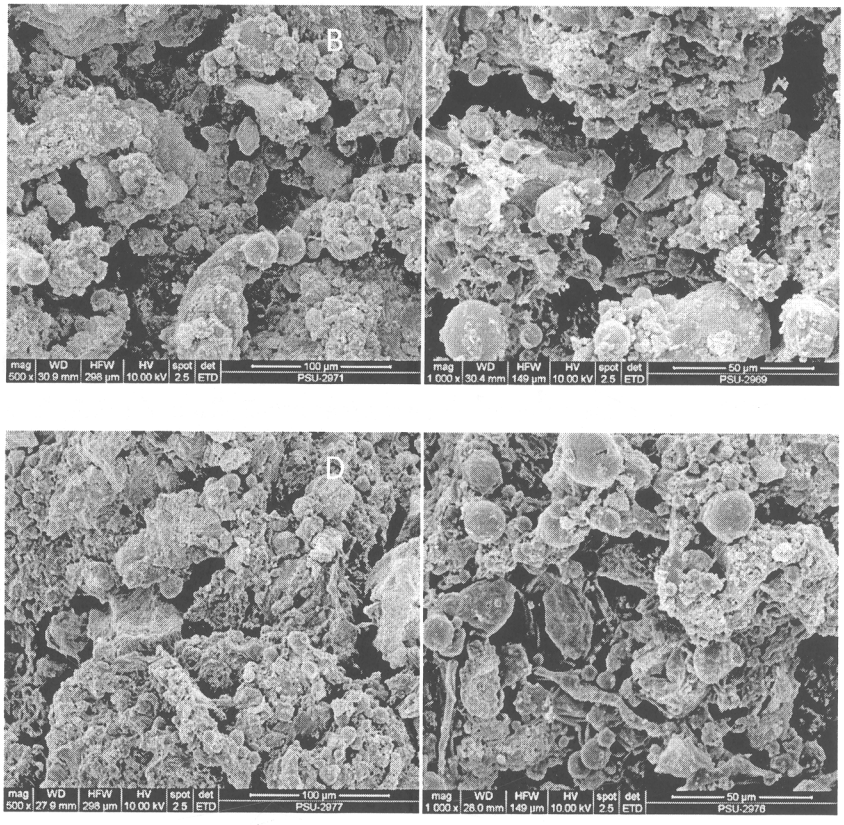
รูปที่ 22 โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอล ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัด

ตารางที่ 10 อัตราส่วนของพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต ไคโตซานไมโครสเฟียร์ และเมนทอลที่เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยเทคนิคการอัด ค่ามุมสัมผัสและค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน (n = 3)

สูตร	PCL microsphere (กรัม)	Bicalcium phosphate (กรัม)	Chitosan microsphere (กรัม)	Menthol (กรัม)	PCL microsphere wt%	Contact angle (องศา)	Porosity (%)
C1	0.1	0.45	0.45	0.26	10	40.44 ± 5.99	-
C2	0.2	0.4	0.4	0.26	20	40.72 ± 1.05	-
C3	0.3	0.35	0.35	0.26	30	44.42 ± 9.61	-
C4	0.4	0.3	0.3	0.26	40	48.23 ±1.91	-
C5	0.5	0.25	0.25	0.26	50	51.44 ± 3.46	-
C6	0.6	0.2	0.2	0.26	60	57.07 ± 2.45	-
C7	0.7	0.15	0.15	0.26	70	71.19 ± 6.07	79.57 ± 2.98
C8	0.8	0.1	0.1	0.26	80	73.86 ± 1.12	79.78 ± 2.29
C9	0.9	0.05	0.05	0.26	90	74.85 ± 2.94	83.00 ± 1.26



รูปที่ 23 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัด มีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุนและประกอบด้วยพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ต่ำกว่า 60% สูตร C2 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (A) และที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (B) และสูตร C5 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (C) และที่กำลังขยาย 4,000 เท่า (D)



รูปที่ 24 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัดและมีเมนทอลเป็นสารก่อรูพรุน เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์สูงกว่า 60% สูตร C7 ที่กำลังขยาย 500 เท่า (A) และที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (B) สูตร C8 ที่กำลังขยาย 500 เท่า (C) และที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (D)

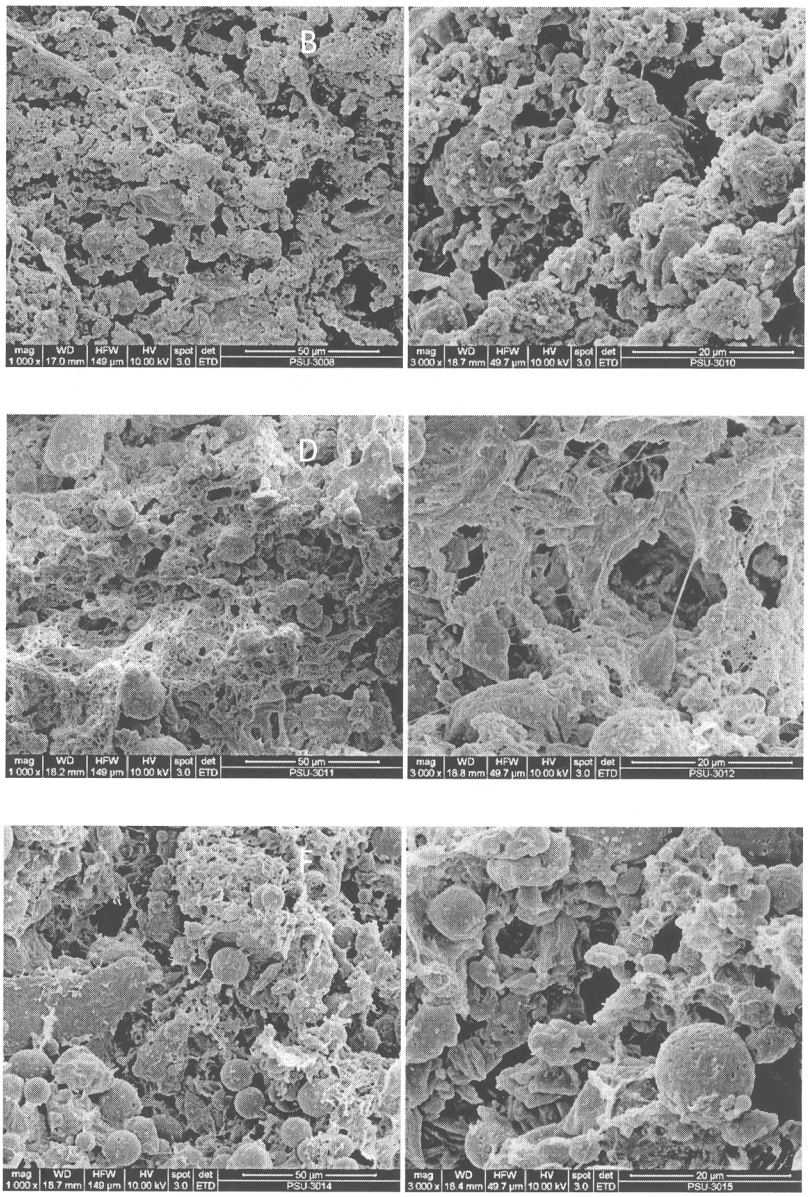
2.4 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบมีรูพรุนโดยวิธีระเหิดแห้งแช่แข็ง

ผสมพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์และไบแคลเซียมฟอสเฟตให้เข้ากัน (อัตราส่วนของสารที่ใช้เป็นไปตามตารางที่ 11 ซึ่งใช้แนวทางจากผลที่ได้โดยเทคนิคการอัดโดยมีปริมาณพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์เริ่มต้นที่ 60%) กระจายของแข็งผสมในสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% (w/v) (ไม่ควรให้เปียกเกินไป) ขึ้นรูปในหลอดพลาสติก แช่ในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต แล้วนำไประเหิดแห้ง นำโครงเลี้ยงเซลล์สูตร F5, F7 และ F9 มาวิเคราะห์ลักษณะโครงร่างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าได้โครงสร้างที่มีรูพรุน สังเกตเห็นพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์มากที่สุดในสูตร F9 พบการเกิดไคโตซานที่ถูกโยงไขว้ในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย (รูปที่ 25) เมื่อนำ

โครงเลี้ยงเซลล์มาทดสอบความพรุนพบว่ามีค่าเท่ากับ 79.93 ± 1.02, 89.39 ± 1.85 และ 89.83 ± 1.66 สำหรับสูตร F5, F7 และ F9 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สูง จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคระเหิดแห้งจะให้ค่าความพรุนสูงถึง 90-99% (Mao, et al., 2003) ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้จึงมีค่าความพรุนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จากการทดสอบค่ามุมสัมผัสของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 40.35 ± 8.98, 49.67 ± 11.30 และ 57.05 ± 6.01 สำหรับสูตร F5, F7 และ F9 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความชอบน้ำสูง และค่าของทั้ง 3 สูตรไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคการอัด พบว่าที่เตรียมจากเทคนิคระเหิดแห้งแช่แข็ง มีความชอบน้ำสูงกว่าเมื่อองค์ประกอบที่เป็นพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์เท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากไคโตซานเกิดการโยงไขว้ในลักษณะที่แตกต่างกัน กล่าวคือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคระเหิดแห้งจะมีไคโตซานเคลือบอยู่ที่ผิว ส่วนที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการอัดจะมีไคโตซานไมโครสเฟียร์อยู่ด้านใน แม้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร F7 และ F9 จะมีค่ามุมสัมผัสและความพรุนใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาส่วนประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า F7 น่าจะเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกว่า เนื่องจากมีปริมาณไฮดรอกซีอะพาไทต์มากกว่า ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลึกอะพาไทต์ได้มากกว่าด้วยเมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย PBS

ตารางที่ 11 อัตราส่วนพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์ ไบแคลเซียมฟอสเฟต และไคโตซานพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยเทคนิคระเหิดแห้ง ค่ามุมสัมผัสและความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน (n = 3)

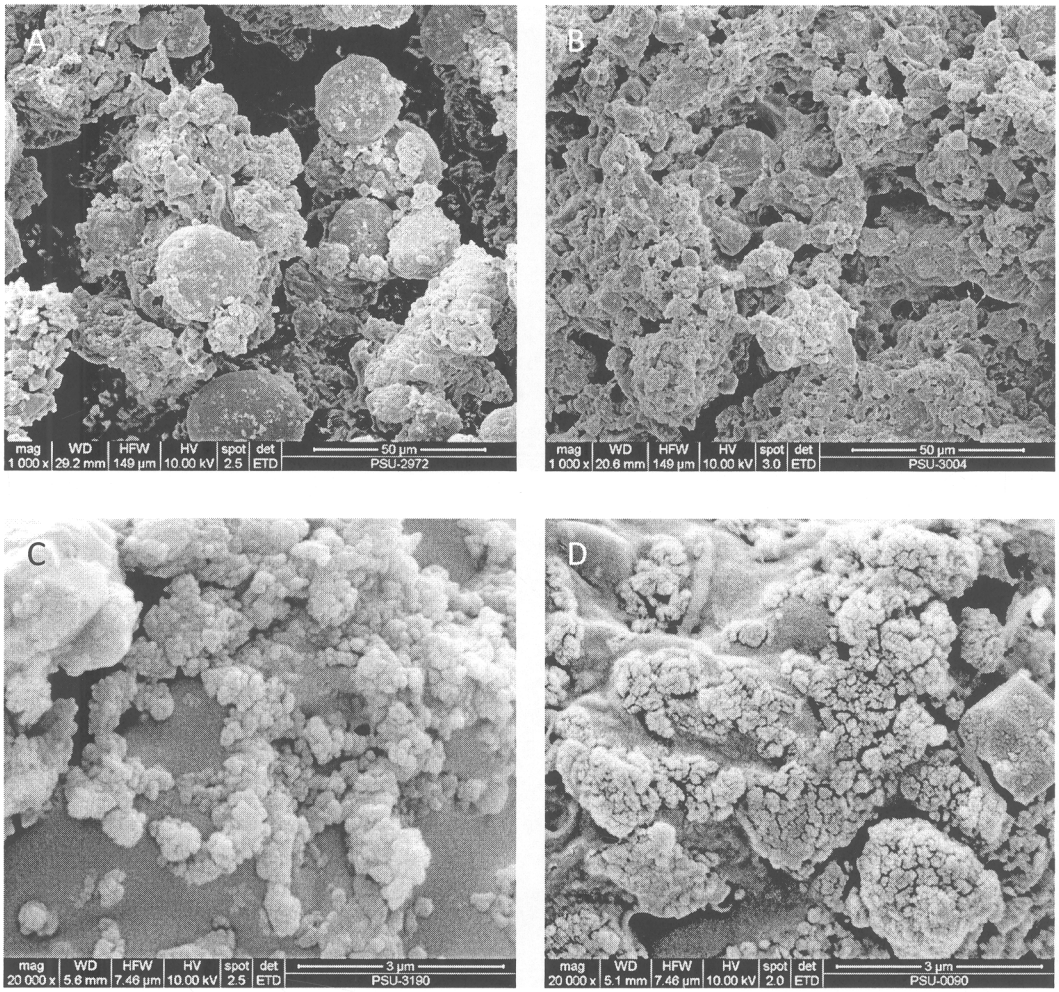
สูตร	PCL microsphere (กรัม)	Bicalcium phosphate (กรัม)	Chitosan (กรัม)	PCL microsphere (wt%)	Contact angle (องศา)	Porosity (%)
F5	0.5	0.25	0.0020	66.49	40.35 ± 8.98	79.93 ± 1.02
F7	0.7	0.15	0.0027	82.10	49.67 ± 11.30	89.39 ± 1.85
F9	0.9	0.05	0.0038	94.36	57.05 ± 6.01	89.83 ± 1.66



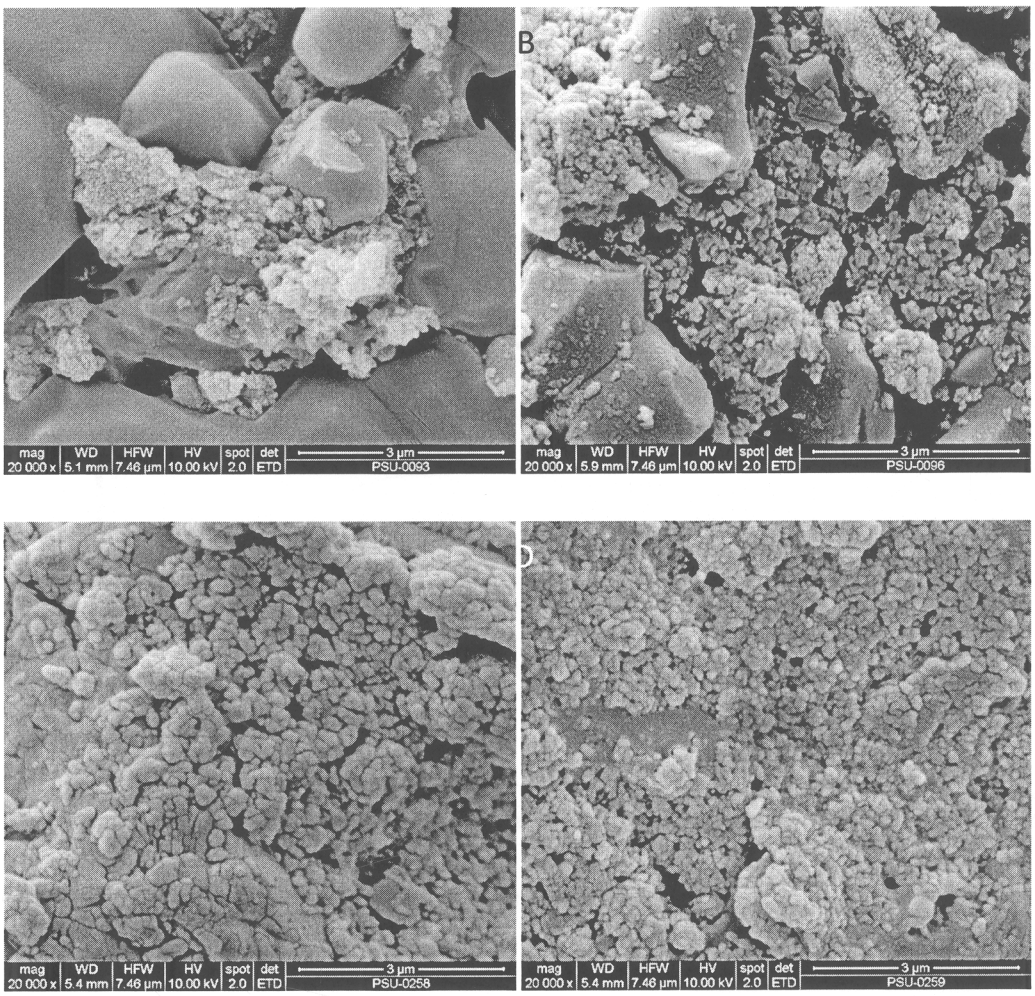
รูปที่ 25 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยผสมพอลิคาโปรแลคโตนไมโครสเฟียร์และไบแคลเซียมฟอสเฟตเข้าด้วยกัน กระจายของแข็งผสมในสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% ก่อนขึ้นรูปโดยเทคนิคระเหิดแห้ง สูตร F5 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (A) และที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (B); สูตร F7 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (C) และที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (D); สูตร F9 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (E) และที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (F)

2.5 สมบัติด้านชีวภาพ (bioactivity) ของโครงเลี้ยงเซลล์

ทดสอบคุณสมบัติด้านชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์โดยการแช่ในสารละลาย PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยสารละลาย PBS มีปริมาณและชนิดของไอออนเลียนแบบของเหลวในร่างกาย [28] ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าหลังการแช่เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สูตร C7 จะมีผลึกอะพาไทต์เกิดขึ้นและจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อแช่เป็นเวลานานขึ้น โดยผลึกอะพาไทต์ที่เกิดใหม่จะซ้อนทับกับที่มีอยู่เดิม ทำให้สังเกตเห็นลักษณะเป็นชั้นของผลึกอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 26) ส่วนการเกิดผลึกอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์สูตร F7 นั้นจะเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ 1 สัปดาห์แรก และจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อแช่เป็นเวลานานขึ้นเช่นกัน (รูปที่ 27) เนื่องจากผู้วิจัยต้องการให้เกิดผลึกอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์อย่างรวดเร็วในปริมาณมาก เพราะสัมพันธ์กับความสามารถในการสมานกระดูกที่แตกหรือเชื่อมกระดูกเดิมเข้ากับโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7 พบว่า F7 เกิดผลึกอะพาไทต์ได้เร็วกว่า C7 จึงมีสมบัติด้านชีวภาพดีกว่า อย่างไรก็ตามการเกิดผลึกอะพาไทต์สัมพันธ์กับความพรุนของโครงสร้างเช่นกัน กล่าวคือถ้าโครงสร้างมีความพรุนมากสารละลาย PBS จะแทรกเข้าไปได้ดี จึงเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกอะพาไทต์ได้ดีกว่า



รูปที่ 26 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงการเกิดผลึกอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 ที่แช่ในสารละลาย PBS เป็นระยะเวลา 1 (A), 2 (B), 3 (C) และ 4 สัปดาห์ (D)

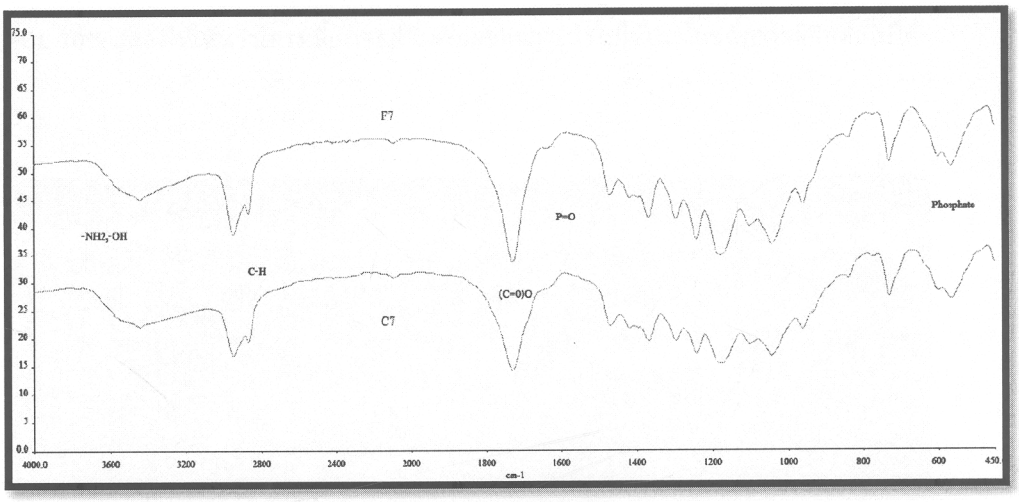


รูปที่ 27 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงการเกิดผลึกอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์สูตร F7 ที่แช่ในสารละลาย PBS เป็นระยะเวลา 1 (A), 2 (B), 3 (C) และ 4 สัปดาห์ (D)

2.6 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นโดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR)

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิค FTIR พบว่าสูตร C7 และ F7 มีสเปกตรัมคล้ายกันมาก (รูปที่ 27) โดยมีแถบการดูดกลืนแสงของการยืดของพันธะ alkyl C-H และ carbonyl C=O ที่ 3060 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพอลิคาโปรแลคโตน แถบการดูดกลืนแสงของพันธะ O-H ที่ 3572 และ 632 cm^{-1} ของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [29] และการยืดของพันธะของหมู่ฟอสเฟตที่ 1089, 1045 และ 960 cm^{-1} แต่ที่เป็นพีคเด่นของไฮดรอกซีอะพาไทต์คือแถบดูดกลืนแสงเนื่องจากการงอของพันธะของหมู่ฟอสเฟตที่ 601 และ 571 cm^{-1} นอกจากนี้ยังพบแถบการดูดกลืนแสง

เนื่องจากการยืดของพันธะ $-NH_2$ และ O-H ที่ 3466 cm^{-1} และปรากฏแถบการดูดกลืนแสงของพันธะ amide I ที่ 1640 cm^{-1} ของไคโตซานด้วย แต่เมื่อไคโตซานเกิดการโยงไขว้กับไตรโซเดียมพอลิฟอสเฟต แถบการดูดกลืนแสงที่ 1640 cm^{-1} จะหายไป เกิดแถบการดูดกลืนแสงใหม่ที่ 1638 และ 1537 cm^{-1} และแสดงแถบการดูดกลืนแสงของพันธะ P=O ที่ 1278 cm^{-1} [30-32] ในขณะที่แถบการดูดกลืนแสงของพันธะในโมเลกุลไตรแคลเซียมฟอสเฟต จะถูกบดบังด้วยแถบการดูดกลืนแสงของพอลิคาโปรแลคโตนจึงสังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจนนัก และไม่ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงของเมนทอลในสูตร C7 แสดงว่าเมนทอลระเหยออกไปหมดแล้ว

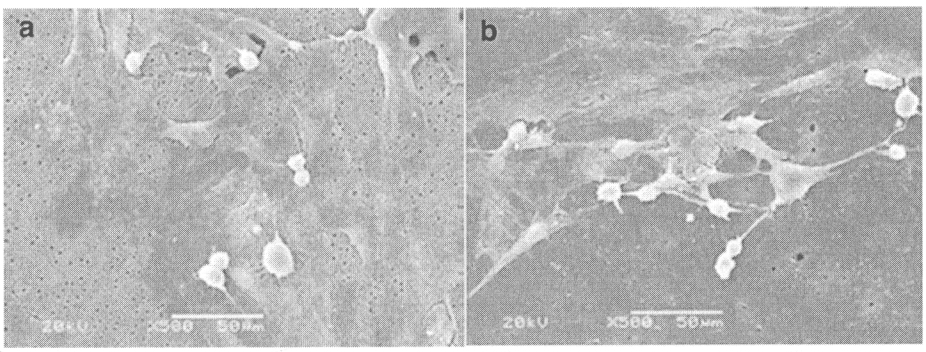


รูปที่ 27 สเปกตรัม FTIR ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร C7 และ F7

3. สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อทดสอบกับเซลล์กระดูก

3.1 การเกาะและรูปร่างของเซลล์บน coated scaffolds

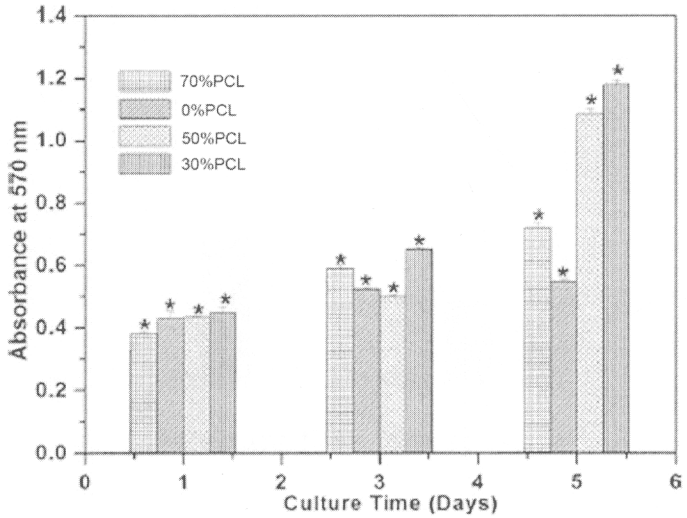
จากการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 28 พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวดังกล่าวได้ดี และแผ่ขยายออกเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น โครงสร้างสัณฐานที่พบเป็นปกติ จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตต่อไป จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี PCL เคลือบอยู่ 30% มีปริมาณมากกว่าที่เคลือบด้วย PCL 70% แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้นน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกต่อไปได้



รูปที่ 28 ภาพ SEM แสดงการเกาะของเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย PCL 70% (a) และ 30% (b)

3.2 การเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารผสมพอลิคาโปรแลคโตน

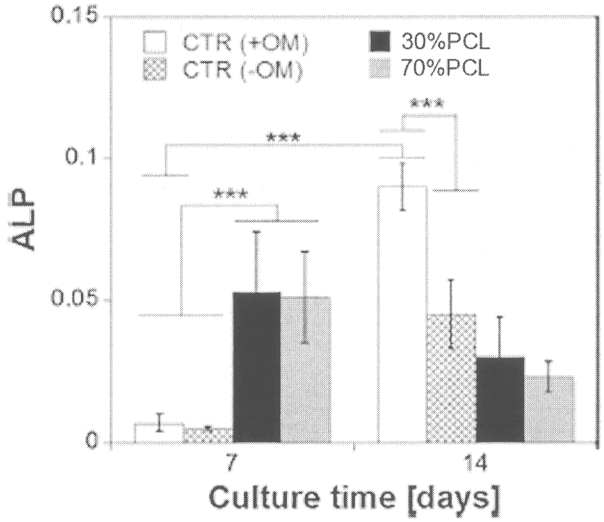
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งที่เคลือบและไม่เคลือบด้วย PCL เป็นเวลา 5 วัน และหาปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตด้วยเทคนิค MTT พบว่าสมบัติความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์มีผลต่อปริมาณเซลล์ดังกล่าว (รูปที่ 29) โดยเซลล์จะไม่ชอบพื้นผิวทั้งที่มีความชอบน้ำสูงหรือความไม่ชอบน้ำสูง แต่จะเจริญเติบโตได้ดีบนพื้นผิวที่มีความชอบน้ำปานกลาง โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็นเซรามิกอย่างเดียว จะมีความชอบน้ำสูง ซึ่งเซลล์จะยึดเกาะได้ยาก ในทางตรงกันข้ามหากโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ PCL ในเปอร์เซ็นต์สูงๆ จะทำให้พื้นผิวโครงเลี้ยงมีความไม่ชอบน้ำสูงด้วย เซลล์จะยึดเกาะได้ยากเช่นกัน ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ PCL 30-50% อาจส่งผลให้พื้นผิวมีความชอบน้ำปานกลาง เซลล์จะยึดเกาะได้ดี



รูปที่ 29 ผลการหาปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งที่เคลือบและไม่เคลือบด้วย PCL ด้วยเทคนิค MTT วิเคราะห์ในช่วง 1-5 วัน ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยตั้งค่านัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.3 การสร้างเอนไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทสของเซลล์กระดูก

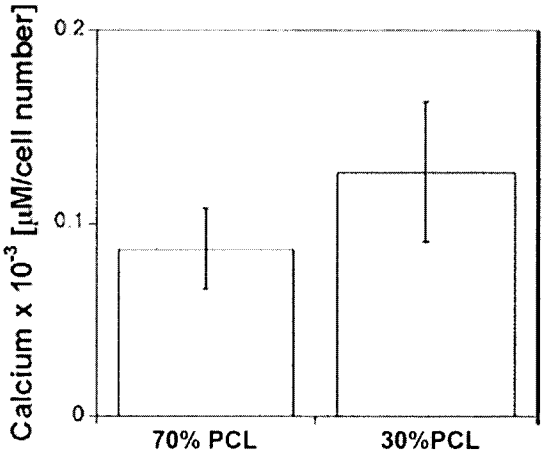
การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกไปเป็นกระดูก วิเคราะห์ได้โดยการวัดแอคทิวิตีของเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 30 พบว่าแอคทิวิตีของเอ็นไซม์ดังกล่าวจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย PCL 30 และ 70% มีค่าเท่ากับ 0.050 $\pm$ 0.021 and 0.051 $\pm$ 0.016 ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงพลาสติกให้ค่าแอคทิวิตีเท่ากับ 0.007 $\pm$ 0.003 ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้นแอคทิวิตีของเอ็นไซม์จะลดลง ดังนั้น ช่วงเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง เพื่อให้เกิดการสร้างกระดูกเบื้องต้นก่อนนำไปฝังในสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ประโยชน์ทางคลินิกจึงต้องเหมาะสม



รูปที่ 30 แอคทิวิตีของเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทส ซึ่งบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกไปเป็นกระดูก เซลล์กระดูกถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 และ 14 วันบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย PCL 30 และ 70% เปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงพลาสติกที่มี (CTR, +OM) และไม่มี (CTR, -OM) สารเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก ใช้ student *t* test เพื่อคำนวณนัยสำคัญทางสถิติ

3.4 การสะสมเกลือแร่ของเซลล์กระดูกที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์

จากการย้อมสีเซลล์กระดูกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์นาน 14 วันด้วยสี alizarin red S (ARS) พบว่า ปริมาณเกลือแร่ที่สะสมบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย PCL 30 และ 70% มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 31)

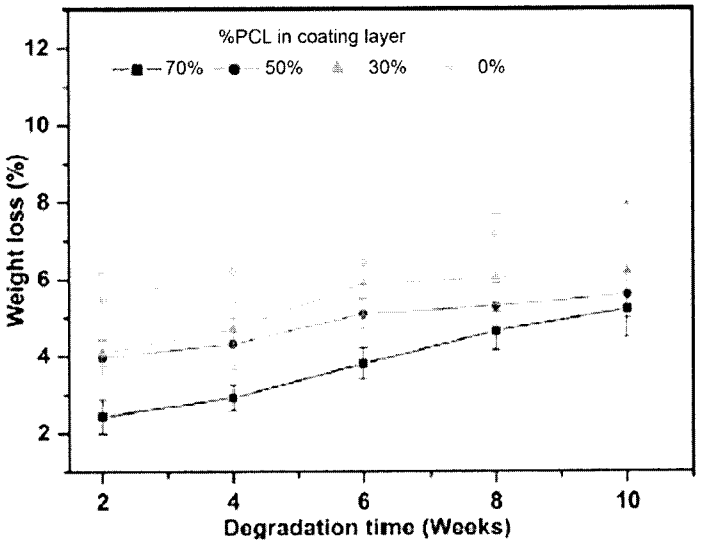


รูปที่ 31 การสะสมเกลือแร่ของเซลล์กระดูกที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย PCL 30 และ 70% เป็นเวลา 14 วัน ย้อมเซลล์ด้วยสี alizarin red S (ARS)

ผลจากการทดลองหาแอคทิวิตีของเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทส และการสะสมเกลือแร่บนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าการเจริญเติบโตและการสร้างเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทสของเซลล์กระดูกที่เพาะเลี้ยงบนโครงสร้างสองมิติ (2D-structure) และสามมิติ (3D-structure) มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย PCL 30 และ 70% ให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เซลล์กระดูกบนโครงสร้างสามมิติสร้างเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทสได้มากที่สุดที่ 7 วัน และลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน ผลดังกล่าวนี้จะตรงกันข้ามกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงสร้างสองมิติ เนื่องจากเอ็นไซม์แอลคาไลด์ฟอสฟาเทสเป็นเครื่องหมายที่บ่งบอกการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูก ผลการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างแบบมีรูพรุนสามมิติของโครงเลี้ยงเซลล์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยง มีรายงานว่า [33,34] ปัจจัยหลายอย่างอันได้แก่ สมบัติทางเคมีของพื้นผิว (materials chemistry) และลักษณะความลึกตื้นของพื้นผิว (topography) ส่งผลอย่างมากต่อความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นหรือการกระจายตัวของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ ก็มีผลต่อประสิทธิภาพการสร้างกระดูกและการสะสมเกลือแร่บนโครงเลี้ยงเซลล์เช่นกัน [35] ที่น่าสนใจคือปริมาณแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมซิลิเกตที่เป็นองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าส่งผลอย่างมากต่อการสะสมเกลือแร่ของเซลล์กระดูก ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานพลาสติก

3.5 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเลียนแบบของเหลวในร่างกาย

รูปที่ 32 แสดงน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อแช่ใน PBS นาน 10 สัปดาห์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรมีน้ำหนักหายไปเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการแช่นานขึ้น โดยเฉพาะสูตรที่ไม่ได้เคลือบด้วย PCL จะสูญเสียน้ำหนักมากที่สุด ส่วนสูตรที่เคลือบด้วย PCL พบว่าเมื่อเปอร์เซ็นต์ของ PCL เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่สูญเสียไปจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก PCL ป้องกันไม่ให้น้ำจากด้านนอกผ่านเข้าไปในรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ องค์ประกอบที่เป็นเซรามิกจึงไม่เกิดการละลาย น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์จึงเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าที่ไม่ได้เคลือบด้วย PCL



รูปที่ 32 น้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อแช่ใน PBS นาน 10 สัปดาห์ เมื่อ 0% คือโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เคลือบด้วย PCL ส่วน 30%, 50%, 70% คือโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย PCL 30, 50 และ 70% ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

[1] "กระดูก" Available online: http://www.bloggang.com (สืบค้นเมื่อ 10 มกราคม 2554).

[2] J. Reignier, M.A. Huneault, Preparation of interconnected poly(ε-caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching. Polymer 47, 4703-4717 (2006).

[3] C.M. Agrawal, R.B. Ray, Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal regeneration. J Biomed Mater Res 55, 141-150 (1998).

[4] สุกิจ แสงนิพันธ์กุล, กระดูกและกระดูกอ่อน. คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาออร์โทปิดิกส์มหาวิทยาลัยขอนแก่น (1990).

[5] "ระบบโครงกระดูก" Available online: http://school.obec.go.th (สืบค้นเมื่อ 5 มกราคม 2554).

[6] "กระดูก" Available online: http://th.wikipedia.org (สืบค้นเมื่อ 5 มกราคม 2554).

[7] W. Suchanek, M. Yashima, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. J Mater Res 13, 875-879 (1998).

[8] R. Langer, Tissue engineering. Mol Therapy 1, 12-15 (2000).

[9] R.J. Koch, G.K. Gorti, Tissue engineering with chondrocytes. Facial Plastic Surg 18, 59-68 (2002).

[10] A. Atala, R.P. Lanza, Methods of tissue engineering. 1st ed. New York: Academic Press. (2002).

[11] B.D. Boyan, C.H. Romero, Z. Schwartz, Bone and cartilage tissue engineering. Clin. Plastic Surg 26, 629-645 (1999).

[12] D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 21, 2529-2543 (2000).

[13] C. Kumar, Tissue, Cell and Organ Engineering. Nanotechnologies for the Life Science 9, 4-5, 227-234 (2011).

[14] นราวุธ ทองมะโรงสี, การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, (2003).

[15] S. Sprio, A. Tampieri, G. Celotti, E. Landi, Development of hydroxyapatite/ calcium silicate composites addressed to the design of load-bearing bone scaffolds. J Mech Behav Biomed Mater 2, 147-155 (2008).

[16] สุพัตรา จินาวัฒน์, การขึ้นรูปไฮดรอกซีอะพาไทต์ชนิดพรุนโดยใช้ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต และไดแคลเซียมฟอสเฟตแอนไฮดรัสจากอุตสาหกรรมกระดูกสัตว์. เทคโนโลยีเซรามิก คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, (1999).

[17] H.Y. Kweon, M.K. Yoo, I.K. Park, H.C. Lee, H.S. Lee, J.S. Oh, T. Akike, C.S. Cho, A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. Biomaterials 24, 801-808 (2003).

[18] "polycaprolactone" Available online: http://reference.findtarget.com (สืบค้นเมื่อ 20 มีนาคม 2554)

[19] สุภาสินี ลิมปานุภาพ, การเตรียมโครงสร้างวัสดุชีวภาพแบบมีรูพรุนด้วยเทคนิคหล่อแบบ/กำจัดอนุภาค. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, (2007).

[20] ภาวดี เมธะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟูชาติ และก้องเกียรติ คงสุวรรณ, ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตซาน. ใน Chitin-chitosan Technical Note. จัดโดยกลุ่มไคตินไคโตซาน โปรแกรมการวิจัยพอลิเมอร์ชีวภาพ ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 1-4 (2542).

[21] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Prog Polymer Sci 34, 641–678 (2009).

[22] F. Suh, H.W.T. Matthew, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials 21, 2589-2598 (2000).

[23] S.V. Madihally, H.W.T. Matthew, Porous scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 20, 1133-1142 (1999).

[24] J. Kaewsrichan, P. Wongwitwichot, K. Chandarajoti, K.H. Chua, and B.H.I. Ruszymah, Sequential induction of marrow stromal cells by FGF2 and BMP2 improves their growth and differentiation potential *in vivo*. Arch Oral Biol 56, 90-101 (2011).

[25] F. Merkline, C. Hendrich, U. Noth, G. Kochinki, C.O. Rader, N. Schutze, Standardized tests of bone implant surfaces with an osteoblast cell culture system. I. Orthopedic standard materials. Biomedical Technology (Berl) 43, 354–359 (1998).

[26] J.A. Greenwald, B.J. Mehrara, J.A. Spector, G.S. Chin, D.S. Steinbrech, P.B. Saadeh, Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: Immature versus mature dura mater. Plastic Reconstruction Surg 105, 1382–92 (2000).

[27] "Bone mechanical properties" Available online: www.tcd.ie/bioengineering (สืบค้นเมื่อ 11 กันยายน 2554)

[28] L. Kaewsichan, D. Riyapana, P. Prommajana, J. Kaewsrichan, Effects of sintering temperatures on micro-morphology, mechanical properties, and bioactivity of bone scaffolds containing calcium silicate. Sci Asia 37, 240–246 (2011).

[29] K.R. Mohamed, A. Mostafa, Preparation and bioactivity evaluation of hydroxyapatite-titania/chitosan-gelatin polymeric biocomposites. Mater Sci Eng C 28, 1087-1099 (2008).

[30] Y. Xu, Y. Du, Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. Int J Pharm 250, 215-226 (2003).

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

[32] J.Z. Knaul, S.M. Hudson, K.A.M. Creber, Improved mechanical properties of chitosanfibres. J Appl Polymer Sci 72, 1721-1731 (1999).

[33] V. Guarino, F. Causa, A. Salerno, L. Ambrosio, P.A. Netti, Design and manufacture of microporous polymeric materials with hierarchal complex structure for biomedical application. Mater Sci Tech 24, 1111–1117 (2008).

[34] A. Salerno, M. Oliviero, E. Di Maio, P.A. Netti, C. Rofani, A. Colosimo, V. Guida, B. Dallapiccola, P. Palma, E. Procaccini, A.C. Berardi, F. Velardi, A. Teti, S. Iannace, Design of novel three-phase PCL/TZ-HA biomaterials for use in bone regeneration applications. J Mater Sci Mater Med 21, 2569–2581 (2010).

[35] A. Lode, A. Bernhardt, M. Gelinsky, Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: Influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation. J Tissue Eng Regen Med 2, 400–407 (2008).