



การผลิตชีววัสดุพอลิเมอร์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลสำหรับ
วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

Fabrication of Polymeric Biomaterials Based on Microbubble
Process for Bone Tissue Engineering

ธัญชนก ปรีวัตรพันธ์

Tanchanok Parivatphun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Master of Engineering in Mining and Materials Engineering
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การผลิตชีววัสดุพอลิเมอร์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลสำหรับ
วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

Fabrication of Polymeric Biomaterials Based on Microbubble
Process for Bone Tissue Engineering

ธัญชนก ปรีวัตรพันธ์

Tanchanok Parivatphun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Master of Engineering in Mining and Materials Engineering
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตชีววัสดุพอลิเมอร์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ
กระดูก
ผู้เขียน นางสาวธัญชนก ปรีวัตรพันธ์
สาขาวิชา วิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (รองศาสตราจารย์ กัลยาณี คุปตานนท์) ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระชัย แสงฉาย)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมกรรมการ (รองศาสตราจารย์ กัลยาณี คุปตานนท์)
..... (ดร.มัทนา ช้างคะมโณ)กรรมการ (ดร.มัทนา ช้างคะมโณ)
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.จิรัฐ มีเสน)กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.จิรัฐ มีเสน)
กรรมการ (ดร.สมใจ จันทร์อุดม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และ
วัสดุ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟาร์รุ่งสาง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มี
ส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ กัลยาณี คุปตานนท์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(นางสาวธัญชนก ปรีวัตรพันธ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวธัญชนก ปรีวัตรพันธ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตชีววัสดุพอลิเมอร์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก
ผู้เขียน	นางสาวธัญชนก ปรีวัตรพันธ์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

โครงร่างมิติ (3D) เป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โครงร่างแบบสามมิติที่ประกอบไปด้วยรูพรุนสร้างจากเทคนิคไมโครบับเบิลนั้นได้ถูกนำเสนอสำหรับการประยุกต์ใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โครงร่างแบบสามมิติแบบที่มีรูพรุนถูกสร้างขึ้นโดยการใช้อัตราการไหลของอากาศที่แตกต่างกัน: 20, 100, 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ นอกจากนี้การนำชีววัสดุชนิดต่างๆ มาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อถือว่ามีประโยชน์อย่างยิ่ง ในงานวิจัยนี้ยังมีการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์แบบผสม (PVA/Silk) ที่ความเข้มข้นของสารละลายไหมแตกต่างกัน 0, 1, 3 และ 5% w/v ตามลำดับ สันฐานวิทยาของโครงร่างผ่านการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด มีการประเมินสมรรถนะทางกายภาพ พฤติกรรมการบวมและสมบัติเชิงกลของโครงร่าง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์สร้าง osteoblast การศึกษาประสิทธิภาพทางชีวภาพโดยการประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน และกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส โครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ แสดงโครงสร้างรูพรุนแบบลำดับชั้นมีขนาดเซลล์และขนาดรูพรุนที่มีขนาดใหญ่ และรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน ซึ่งส่งผลต่อพฤติกรรมการบวม และสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก นอกจากนี้ยังมีสมบัติทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ โครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 5% w/v พบว่ามีการปกคลุมของไหมอยู่ทั่วทั้งชิ้นงาน และมีลักษณะจำลองที่คล้ายคลึงกับโครงสร้างภายนอกเซลล์ของมนุษย์ มีสมบัติเชิงกลที่เป็นเอกลักษณ์ และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้เพาะเลี้ยงมากที่สุด ดังนั้นโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ และโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 5%w/v แสดงให้เห็นถึงความมีประสิทธิภาพ และเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

Thesis title Fabrication of Polymeric Biomaterials Based on Microbubble Process for Bone Tissue Engineering
Author Miss Tanchanok Parivatphun
Major program Mining and materials Engineering
Academic year 2018

ABSTRACT

Three-dimensional scaffold has been interested in an application of bone tissue engineering. A three-dimensional porous scaffold for bone tissue engineering was constructed from the microbubble process. The porous structures were fabricated using different air flow rates: 20, 100, 200, and 300 cc/min, respectively. In this research, blend scaffolds were fabricated with different concentrations of silk fibroin: 0, 1, 3, and 5% w / v, respectively. The morphologies of the scaffolds were analyzed using scanning electron microscopy. Swelling behavior, mechanical and thermal properties of the scaffold were also examined. For the biological properties' assessments, cell proliferation, protein synthesis, and alkaline phosphatase activity were also examined, respectively. The scaffold at the flow rate of 100 cc/min represented a hierarchical porous structure of large cells and interconnected pores that affect the swelling behavior and mechanical properties which is suitable for bone tissue engineering and biological function. The scaffold at 5% w/v of silk found that the silk was covered with the whole workpiece and its appearance was entirely similar to the extracellular matrix. Furthermore, this condition provides unique mechanical properties and increasing the number of cells. According to the current research, the scaffolds at flow rate 100 cc / min and the scaffold at of 5% w / v of silk are suitable for applications in bone tissue engineering.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือ และความกรุณาแก่บุคคลเหล่านี้ ที่มีส่วนร่วมทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ กัลยาณี คุปตานนท์, ดร. มัทนา ชังคะมโน และรองศาสตราจารย์ ดร. จิรัฐ มีเสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำ คำชี้แนะ และคำปรึกษาอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตประจำวัน และตลอดการศึกษาวิจัย รวมไปถึงความช่วยเหลือทางด้านภาษา การวิเคราะห์ผลการทดลอง และความเอาใจใส่ ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งต่องานวิจัยเล่มนี้ วิทยานิพนธ์เล่มนี้ไม่สามารถสำเร็จไปได้ถ้าขาดความกรุณาในส่วนนี้

ขอขอบคุณ ดร. รุ่งโรจน์ เกาะคุ ที่ให้คำปรึกษาในส่วนของการรวบรวมการไมโครบำบัด ทั้งออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการทดลอง ตลอดจนงบประมาณที่ให้ในระหว่างการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วีระชัย แสงฉาย ประธานกรรมการสอบ และ ดร. สมใจ จันทร์อุดม กรรมการสอบ ที่เป็นเกียรติมาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบคุณสำหรับคำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัยให้มีความรู้ความเข้าใจในงานของตนเองมากขึ้น

ขอขอบคุณ คุณเบญจพร หนูคล้าย, คุณสุภาพร แสงเกิด และศูนย์พัฒนาอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อการส่งออก คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับความช่วยเหลือ การวิเคราะห์ผลการทดลองในส่วนของสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพ และคำปรึกษาที่มีให้ตลอดมา จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จในที่สุด

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย, สถานวิจัยบัณฑิตความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมวัสดุ และทุนศิษย์ก้นกุฎิคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนสนับสนุนส่งเสริมตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และครอบครัว สำหรับกำลังใจ ความรัก ความเอาใจใส่ และการสนับสนุน ที่มีผลอย่างยิ่งตลอดการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ น้อง พี่ เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ภาควิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจสนับสนุนกันตลอดมา

ธัญชนก ปรีวัตรพันธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญรูป	(13)
สารบัญตาราง	(19)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. ที่มาและความสำคัญ	1
1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4. ขอบเขตงานวิจัย	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1. วัสดุชีวภาพ	5
2.1.1. ประวัติความเป็นมาของวัสดุชีวภาพ	5
2.1.2. ชนิดของวัสดุชีวภาพ	7
2.2. วิศวกรรมเนื้อเยื่อ	7
2.2.1. วัสดุค้ำจุน	8
2.2.2. การออกแบบวัสดุค้ำจุนจากชีววัสดุ	8
2.2.3. คุณสมบัติของโครงร่างกระดูกอุดมคติ	9
2.2.4. ชีววัสดุที่ได้จากธรรมชาติและวัสดุที่เตรียมได้จากอวัยวะ	
ในร่างกายในการสร้างโครงร่างรับแรงเซลล์	10
2.2.5. ชีววัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์ในการสร้างโครงร่างรับแรงเซลล์	11
2.3. ลักษณะรูปร่างของโครงร่างรับแรงเซลล์	14
2.3.1. โครงร่างแบบไฮโดรเจล	14
2.3.2. โครงร่างแบบสองมิติ	15
2.3.3. โครงร่างแบบสามมิติ	16
2.4. โครงร่างกระดูกจากพอลิเมอร์	18
2.4.1. เทคโนโลยีที่ใช้ในการสร้างโครงร่างรับแรงเซลล์	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5. ทฤษฎีของการเกิดฟองและทฤษฎีของไมโครบับเบิล	36
2.5.1. การเกิดฟอง	36
2.5.2. ความเร็วในการลอยตัวของฟอง	36
2.5.3. รูปแบบการไหลของฟองในบับเบิลคอลัมน์	37
2.5.4. ลักษณะรูปร่างของฟอง	38
2.5.5. ไมโครบับเบิล	39
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ ขั้นตอนการทดลอง และวิธีการวิเคราะห์	41
3.1. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	41
3.1.1. พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	41
3.1.2. ไหม	41
3.1.3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน	42
3.1.4. เซลล์ MC3T3E1	42
3.1.5. เซลล์ L929	42
3.1.6. Alpha mem media	42
3.1.7. PrestoBlue cell reagent	43
3.1.8. Alkaline Phosphatase LiquiColor® Test kit	43
3.1.9. Bio-Rad Protein Assay Dry Reagent Concentrate	43
3.2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	43
3.2.1. อุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหล	43
3.2.2. ดิฟฟิวเซอร์	44
3.2.3. บับเบิลคอลัมน์	44
3.2.4. ปีมลม	45
3.2.5. แม่พิมพ์อะลูมิเนียม	45
3.2.6. เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง	46
3.2.7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง	47
3.2.8. เครื่อง Biochrom Anthos Multiread 400 Microplate Reader	47
3.2.9. อุปกรณ์อื่นๆ	48

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ	48
3.3.1. การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	48
3.3.2. การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน	48
3.3.3. การทดสอบสมบัติเชิงกล	49
3.3.4. การทดสอบความสามารถในการบวมตัว	49
3.3.5. การทดสอบหาหมู่ฟังก์ชัน	50
3.4. การวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ	50
3.4.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์	50
3.4.2. การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์	51
3.4.3. กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส	52
3.4.4. การสังเคราะห์โปรตีน	54
3.4.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ	55
3.5. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	56
3.5.1. การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดย กระบวนการไมโครบับเบิล	56
3.5.2. การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสม ใหม่โดยกระบวนการไมโครบับเบิลและกระบวนการ ทำแห้งแบบแช่แข็ง	61
3.6. แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	66
3.7. แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิล แอลกอฮอล์ผสมใหม่	67
3.8. ตัวอย่างชุดการทดลองไมโครบับเบิล	68
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง	69
4.1. ผลการวิเคราะห์และการอภิปรายผลของการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จาก พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	69
4.1.1. โครงสร้างทางมหภาคของโครงร่างรองรับเซลล์จาก พอลิไวนิลแอลกอฮอล์	69

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.2. โครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	70
4.1.3. สมบัติทางความร้อนของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	72
4.1.4. สมบัติการบวมตัวของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	73
4.1.5. สมบัติทางกลของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	75
4.1.6. การเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	77
4.1.7. การสังเคราะห์โปรตีนของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	78
4.1.8. กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสบนโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	80
4.2. ผลการวิเคราะห์และการอภิปรายผลของการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม	82
4.2.1. โครงสร้างทางมหภาคของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม	83
4.2.2. โครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม	84
4.2.3. การวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม	87
4.2.4. สมบัติการบวมตัวของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม	89
4.2.5. สมบัติทางกลของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม	91
4.2.6. การเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม	94
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	96
5.1. การผลิตโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิล	96

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2. การผลิตโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมใหม่ด้วย กระบวนการไมโครบับเบิลและกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง	97
5.3. ข้อเสนอแนะ	98
บรรณานุกรม	99
ภาคผนวก ก บทความวิจัยที่ได้นำเสนอและได้รับการตีพิมพ์	109
ประวัติผู้เขียน	113

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1. ภาพตัวอย่างโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้จากกระบวนการขึ้นรูปต่างๆ (ก) โครงร่างรองรับเซลล์จากกระบวนการฟริสตายอิง (Freeze drying) (ข) โครงร่างรองรับเซลล์จากกระบวนการชะล้างเกลือ (Solvent casting/Particulate) และ (ค) โครงร่างรองรับเซลล์จาก กระบวนการปั่นขึ้นรูปด้วยเส้นใย	2
รูปที่ 1.2. หลักการสร้างฟองอากาศสำหรับผลิตโครงร่างรองรับเซลล์ โดยเริ่มจาก บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ลงในบับเบิลคอลล์มจากนั้นเป่าอากาศผ่าน ดิฟฟิวเซอร์จนเกิดเป็นบับเบิลอยู่ในบับเบิลคอลล์ม (ก) แสดงเป็นบับเบิลที่อยู่ใน บับเบิลคอลล์ม (ข) เป็นภาพขยายของบับเบิลที่อยู่ในบับเบิลคอลล์ม	3
รูปที่ 2.1. ภาพตัวอย่างของวัสดุชีวภาพจากยุคสมัยต่างๆ (ก) สมัย 300 ปีก่อน คริสตกาล (ข) และ (ค) วัสดุชีวภาพที่ทำมาจากวัสดุธรรมชาติและวัสดุ สังเคราะห์ที่นิยมในปัจจุบัน	6
รูปที่ 2.2. ตัวอย่างกระบวนการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ	8
รูปที่ 2.3. โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไกลโคลิคแอซิด	11
รูปที่ 2.4. โครงสร้างโมเลกุลของพอลิแลคติกแอซิด	12
รูปที่ 2.5. โครงสร้างโมเลกุลของพอลิคาโปแลกโตน	12
รูปที่ 2.6. โครงสร้างโมเลกุลของพอลิเอธิลีนไกลคอล	13
รูปที่ 2.7. โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	13
รูปที่ 2.8. โครงร่างรองรับเซลล์แบบไฮโดรเจลที่มีการบวมน้ำอยู่ภายใน	15
รูปที่ 2.9. โครงร่างรองรับเซลล์แบบสามมิติที่สร้างมาจากไหม (Silk fibroin) นำมาขึ้นรูปเป็น ฟิล์มบาง	16
รูปที่ 2.10. โครงร่างรองรับเซลล์แบบสามมิติที่สร้างมาจากวัสดุที่แตกต่างกัน (ก) โครงร่าง สามมิติที่สร้างมาจากแอลจินेट (Alginate), (ข) โครงร่างสามมิติที่สร้างมา จากโอวัลบูมิน (Ovalbumin) และ (ค) โครงร่างสามมิติที่สร้างมาจาก ไทเทเนียม (Titanium)	17
รูปที่ 2.11. ตัวอย่างภาพโครงสร้างทางจุลภาคของกระดูกมนุษย์ที่มีขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกัน	17

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.12. ตัวอย่างภาพโครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างสามมิติที่มีลักษณะและขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกัน (ก) โครงร่างสามมิติที่ได้มากจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง และ (ข) โครงร่างสามมิติที่ได้มากจากกระบวนการปั่นขึ้นรูปเป็นเส้นใย	18
รูปที่ 2.13. กระบวนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยกระบวนการหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกลือ	20
รูปที่ 2.14. กระบวนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง	22
รูปที่ 2.15. กระบวนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยกระบวนการปั่นขึ้นรูปด้วยเส้นใย	23
รูปที่ 2.16. อิทธิพลของความความต่างศักย์ที่ใช้และอิทธิพลความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์และตัวทำละลายที่ใช้ต่อลักษณะของเส้นใยที่ฉีดได้ (ก) แสดงเส้นใยที่มีลักษณะผิวเรียบตลอดทั้งเส้นใย และ (ข) แสดงเม็ดกลมๆ คล้ายลูกปัดอยู่บนเส้นใย	24
รูปที่ 2.17. ลักษณะของเส้นใยที่ได้เมื่อใช้พอลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ก) และ (ข) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13,000– 23,000 g/mol ที่ความเข้มข้น 21 wt.%, 27 wt.% ตามลำดับ (ค) และ (ง) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 – 89,000 g/mol ที่ความเข้มข้น 9 wt.%, 13 wt.% ตามลำดับ	25
รูปที่ 2.18. กระบวนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยกระบวนการหล่อขึ้นรูปโดยใช้ตัวทำละลาย	26
รูปที่ 2.19. โครงสร้างจุลภาคของฟิล์มพอลิคาโพรแลคโตน โดยแสดงในส่วนของ top surface, cross section และ bottom surface ตามลำดับ	26
รูปที่ 2.20. กระบวนการขึ้นรูปโดยใช้โฟมแก๊ส	28
รูปที่ 2.21. โครงสร้างจุลภาคเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังใช้กระบวนการขึ้นรูปโดยโฟมแก๊ส (ก, ข, ค, ง, จ และ ฉ) หลังใช้กระบวนการโฟมแก๊สได้ผิวที่มีความพรุนมากขึ้น และ (ซ, ซ และ ณ) ก่อนใช้กระบวนการโฟมแก๊สจะสังเกตได้ว่าไม่มีความพรุนอยู่เลย	28
รูปที่ 2.22. กระบวนการขึ้นรูปโดยใช้การแยกเฟสโดยการเหนี่ยวนำความร้อน	29
รูปที่ 2.23. กระบวนการขึ้นรูปโดยใช้การแยกเฟสโดยการหลอมเหลว	31

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.24. โครงสร้างจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้จากกระบวนการชะล้าง เกล็ดและการหลอมเหลวสังเกตได้ว่ารูพรุนที่ได้มีรูปร่างเป็นไปตาม รูปร่างของอนุภาคเกล็ดที่ใช้	31
รูปที่ 2.25. กระบวนการขึ้นรูปและโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้ (ก) ระหว่างการปรีนขึ้นรูป, (ข) โครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้, (ค) Plain view ของโครงร่างรองรับเซลล์ และ (ง) ลักษณะของรูพรุนในแนวตั้งฉากของโครงร่างรองรับเซลล์	32
รูปที่ 2.26. กระบวนการขึ้นรูปและโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้ (ก) ภาพที่ได้จาก การออกแบบผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์, (ข) โครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้, (ค) ภาพถ่ายโดยกล้องธรรมดาของโครงร่างรองรับเซลล์ และ (ง) โครงสร้าง ทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	33
รูปที่ 2.27. ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการลอยตัวของฟองกับขนาดของฟองที่ เกิดขึ้นตามทฤษฎีของ Levich	37
รูปที่ 2.28. แผนภาพของระบบการไหลที่เป็นไปได้ในบับเบิลคอลัมน์	38
รูปที่ 2.29. Fluidic oscillator เป็นอุปกรณ์ที่ออกแบบโดย Prof. William Zimmerman	40
รูปที่ 3.1. ตัวอย่างไหมชนิดไฟเบอร์อินจากกรมหม่อนไหม	41
รูปที่ 3.2. ตัวอย่างสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ซาลีน	42
รูปที่ 3.3. ตัวอย่างของเซลล์กระดูกของหนูที่ปลูกอยู่บนแผ่นไทเทเนียม (ก) ปลูก 24 ชั่วโมง, (ข) ปลูก 48 ชั่วโมง และ (ค) ปลูก 72 ชั่วโมง ตามลำดับ	42
รูปที่ 3.4. ตัวอย่างอุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหลที่ใช้ในงานวิจัย (ก) อุปกรณ์ควบคุม อัตราการไหลที่อัตราการไหล 0-120 มิลลิลิตร/นาที่ และ (ข) อุปกรณ์ควบคุม อัตราการไหลที่อัตราการไหล 100-1000 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ	43
รูปที่ 3.5. ตัวอย่าง diffuser ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกัน	44
รูปที่ 3.6. ตัวอย่างบับเบิลคอลัมน์ที่ใช้ในงานวิจัย	45
รูปที่ 3.7. ตัวอย่างปั๊มลมที่ใช้ในงานวิจัย	45
รูปที่ 3.8. ตัวอย่างแม่พิมพ์อะลูมิเนียมที่ใช้ในงานวิจัย	46
รูปที่ 3.9. ตัวอย่างเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็งที่ใช้ในงานวิจัย	46
รูปที่ 3.10. เครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนของแสง	47
รูปที่ 3.11. เครื่อง Biochrom Anthos Multiread 400 Microplate Reader	47

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.12. ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ก่อนการนำไปปลูกบนโครงร่างรองรับเซลล์	51
รูปที่ 3.13. แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์	52
รูปที่ 3.14. แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส	53
รูปที่ 3.15. แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์การสังเคราะห์โปรตีน	55
รูปที่ 3.16. ขั้นตอนการละลายสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (ก) ผงพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมน้ำกลั่นวางอยู่บนเครื่องกวน และทำการให้อุณหภูมิจนถึง 80 องศาเซลเซียสและ (ข) สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์หลังจากกวนผสมครบ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ	56
รูปที่ 3.17. สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่บรรจุอยู่ในบับเบิลคอลัมน์	57
รูปที่ 3.18. ฟองที่เกิดขึ้นในบับเบิลคอลัมน์หลังจากใช้อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาที เห็นได้ว่าเกิดเป็นฟองขนาดเล็กขึ้นในบับเบิลคอลัมน์	58
รูปที่ 3.19. กระบวนการเปลี่ยนสถานะของสารละลายให้อยู่ในรูปของของแข็ง (ก) หลังจากเทสารละลายลงสู่แม่พิมพ์ทำการรูดอุณหภูมิโดยการแช่แม่พิมพ์ลงในน้ำแข็ง (ข) แม่พิมพ์ถูกใส่เข้าไปในช่องแช่แข็งเพื่อให้ฟองที่เป่าได้อยู่ในรูปของของแข็ง และ (ค) โครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้หลังจากแช่แข็ง 12 ชั่วโมง ตามลำดับ	59
รูปที่ 3.20. ชิ้นงานโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้หลังจากทำการอบไล่ความชื้นที่อัตราการไหลแตกต่างกัน (ก) 20 มิลลิลิตร/นาที, (ข) 100 มิลลิลิตร/นาที, (ค) 200 มิลลิลิตร/นาที และ (ง) 300 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ	60
รูปที่ 3.21. สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 20 %w/v	61
รูปที่ 3.22. สารละลายไหมที่อยู่ในบับเบิลคอลัมน์	62
รูปที่ 3.23. ฟองพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมที่เกิดขึ้นในบับเบิลคอลัมน์หลังจากใช้อัตราการไหล 200 มิลลิลิตร/นาที (ก) ปล่อยอากาศผ่านสารละลายไหมจนเกิดฟองในบับเบิลคอลัมน์, (ข) สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ถูกเทลงไปในบับเบิลคอลัมน์ที่มีสารละลายไหมบรรจุอยู่ภายในดังแสดงในวงกลมคือสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์, (ค) กวนผสมเล็กน้อยโดยใช้แท่งแก้วกวน และ(ง) ฟองสารผสมที่เกิดขึ้นในบับเบิลคอลัมน์ ตามลำดับ	63

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.24. กระบวนการเปลี่ยนสถานะของสารละลายให้อยู่ในรูปของของแข็ง (ก) หลังจากเทสารละลายลงสู่แม่พิมพ์ทำการลดอุณหภูมิโดยการ แช่แม่พิมพ์ลงในน้ำแข็ง และ (ข) โครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ที่ได้ หลังจากแช่แข็ง 12 ชั่วโมง ตามลำดับ	64
รูปที่ 3.25. ชิ้นงานโครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมที่ได้หลังจากทำการทำแห้งแบบ แช่แข็งที่ความเข้มข้นของสารละลายใหม่แตกต่างกัน ที่อัตราการไหลเดียวกัน (ก) โครงร่างรองรับเซลล์ที่ไม่ผสมใหม่, (ข) โครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมที่ได้จาก สารละลายใหม่ความเข้มข้น 1%w/v, (ค) โครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมที่ได้จาก สารละลายใหม่ที่ความเข้มข้น 3%w/v และ (ง) โครงร่างรองรับเซลล์แบบผสม ที่ได้จากสารละลายใหม่ที่ความเข้มข้น 5%w/v ตามลำดับ	65
รูปที่ 3.26. แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	66
รูปที่ 3.27. แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมใหม่	67
รูปที่ 3.28. ตัวอย่างชุดทดลองไมโครบับเบิลที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์	68
รูปที่ 4.1. ตัวอย่างภาพถ่ายของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากอัตราการไหลต่างๆ (ก) 20 มิลลิลิตร/นาที่, (ข) 100 มิลลิลิตร/นาที่, (ค) 200 มิลลิลิตร/นาที่ และ (ง) 300 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ	70
รูปที่ 4.2. โครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากอัตราการไหลต่างๆ (ก) 20 มิลลิลิตร/นาที่, (ข) 100 มิลลิลิตร/นาที่, (ค) 200 มิลลิลิตร/นาที่ และ (ง) 300 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ	71
รูปที่ 4.3. สมบัติทางความร้อนของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากกระบวนการไมโครบับเบิล	73
รูปที่ 4.4. โครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่อัตราการไหล (ก) 20, (ข) 100, (ค) 200, (ง) 300 มิลลิลิตร/นาที่ และ (จ) กราฟเปอร์เซ็นต์การบวมตัว หลังจากบ่ม ในสารละลาย PBS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ 15 นาที่ถึง 480 นาที่	74
รูปที่ 4.5. ผลกำลังอัดของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากอัตราการไหลต่างๆ ภายใต้อ (ก) สภาวะแห้งและ (ข) สภาวะเปียก ตามลำดับ	76
รูปที่ 4.6. การเพิ่มจำนวนของเซลล์ 1, 3, 5 และ 7 วันตามลำดับหลังจากการทดสอบ ด้วยสารละลาย PrestoBlue reagent	78

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.7. การสังเคราะห์โปรตีนในวันที่ 7, 14 และ 21 ตามลำดับหลังจากการทดสอบด้วย สารละลาย Bio-Rad Protein Assay Dry Reagent Concentrate	79
รูปที่ 4.8. กิจกรรม ALP ในวันที่ 7, 14 และ 21 ตามลำดับ หลังจากการทดสอบด้วย สารละลาย Alkaline Phosphatase LiquiColor® Test kit	81
รูปที่ 4.9. ตัวอย่างภาพถ่ายของโครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ที่เกิดจากความเข้มข้นต่างๆ (ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม 3% w/v และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v ตามลำดับ	84
รูปที่ 4.10. ภาพตัดขวางโครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ที่เกิด จากความเข้มข้นต่างๆ (ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม 3% w/v และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v วงกลมแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของเซลล์ของโครงร่างที่ไม่ ผสมไหมกับโครงร่างที่ผสมไหม ตามลำดับ	85
รูปที่ 4.11. ภาพตัดขวางของโครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ที่แบ่งออก เป็นสองส่วน (ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม 3% w/v และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v ลูกศรแสดงส่วนที่เป็นชั้นฟิล์ม และส่วนที่เป็นรูพรุน ตามลำดับ	86
รูปที่ 4.12. ภาพตัดขวางของโครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ในส่วนที่ เป็นฟิล์ม (ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม 3% w/v และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v ตามลำดับ	87
รูปที่ 4.13. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของโครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ (ก) ส่วนที่เป็นฟิล์ม และ (ข) ส่วนที่เป็นรูพรุน ตามลำดับ	88
รูปที่ 4.14. โครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นไหม (ก) 0%, (ข) 1%, (ค) 3%, (ง) 5% w/v และ (จ) กราฟเปอร์เซ็นต์การบวมตัว หลังจากบ่มในสารละลาย PBS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ 15 นาทีถึง 480 นาที	91
รูปที่ 4.15. ผลกำลังอัดของโครงร่างรองรับเซลล์ที่เกิดจากความเข้มข้นไหมที่แตกต่างกัน ภายใต้ (ก) สภาวะแห้งและ (ข) สภาวะเปียก ตามลำดับ	93
รูปที่ 4.16. การเพิ่มจำนวนของเซลล์ 1, 3, 5 และ 7 วันตามลำดับหลังจากการทดสอบ ด้วยสารละลาย PrestoBlue reagent	95

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของกระบวนการขึ้นรูปแบบดั้งเดิม	34
ตารางที่ 2 ขนาดเซลล์และขนาดรูปทรงของโครงร่างรองรับเซลล์ที่อัตราการผลิตแตกต่างกัน	72

บทที่ 1

บทนำ

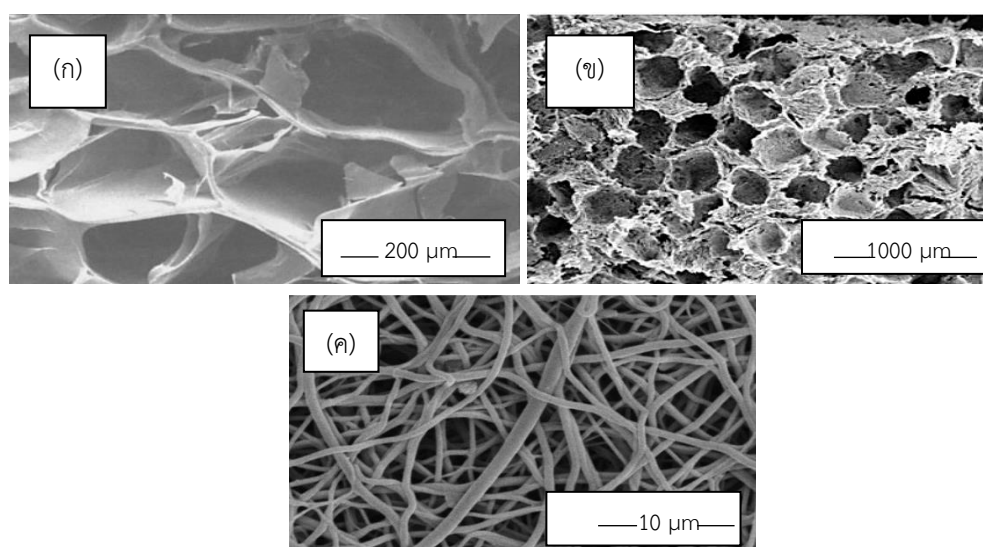
1. ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันการวิจัยพัฒนาด้านวัสดุชีวภาพ (Biomaterials) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากวิทยาการทางการแพทย์มีความก้าวหน้ามากขึ้น การพัฒนาวัสดุชีวภาพเพื่อนำมาใช้เป็นวัสดุซ่อมแซมหรือทดแทนอวัยวะในร่างกายที่เกิดการบกร่องหรือถูกทำลายไปจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง วัสดุชีวภาพที่สามารถนำมาใช้กับร่างกายมนุษย์ต้องสามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อของร่างกายซึ่งปัจจุบันมีผู้ป่วยจำนวนมากเสียอวัยวะหรือเนื้อเยื่อบางส่วนไปจากการได้รับบาดเจ็บ ส่งผลให้ความต้องการอวัยวะของผู้ป่วยมีสูงกว่าผู้บริจาค ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (การปลูกเนื้อเยื่อทดแทน) เพื่อแทนที่พื้นที่ที่ได้รับบาดเจ็บของผู้ป่วย วิศวกรรมเนื้อเยื่อมีส่วนประกอบพื้นฐานที่สำคัญ 3 ประการคือ โครงร่างรองรับเซลล์, เซลล์ และโกรทแฟคเตอร์ (สารธรรมชาติที่เร่งให้เซลล์เจริญเติบโต)

โครงร่างรองรับเซลล์ (Scaffold) มีบทบาทสำคัญคือเป็นพื้นที่ให้เซลล์เจริญเติบโต ให้เซลล์เกิดการเคลื่อนย้าย และให้เซลล์เกิดการเคลื่อนไหวได้อย่างสะดวก รูพรุนในโครงร่างรองรับเซลล์ควรกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและมีการเชื่อมต่อกันเพื่อช่วยให้สารอาหารต่างๆ แพร่เข้าสู่เซลล์ และขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อควรอยู่ในช่วง 100 – 1,200 ไมโครเมตร [1, 2] โดยโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิเมอร์นั้นมีความอ่อนไหวและมีความสามารถในการสลายตัวทางชีวภาพในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้ดี โดยส่วนมากในการสร้างโครงร่างกระดูกจากพอลิเมอร์นั้นจะใช้พอลิเมอร์จากธรรมชาติเช่น คอลลาเจน ไคติน-ไคโตซาน ไฟโบรอิน แอลจินेट ไทม และกรดไฮยาลูโรนิก หรือพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิแลคติกแอซิด (PLA) พอลิไกลโคลิกแอซิด (PGA) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และพอลิคาโปแลคโตน (PCL) ซึ่งข้อได้เปรียบของการใช้พอลิเมอร์คือ ความง่ายในกระบวนการขึ้นรูปและความสามารถในการดัดแปลงทางเคมี

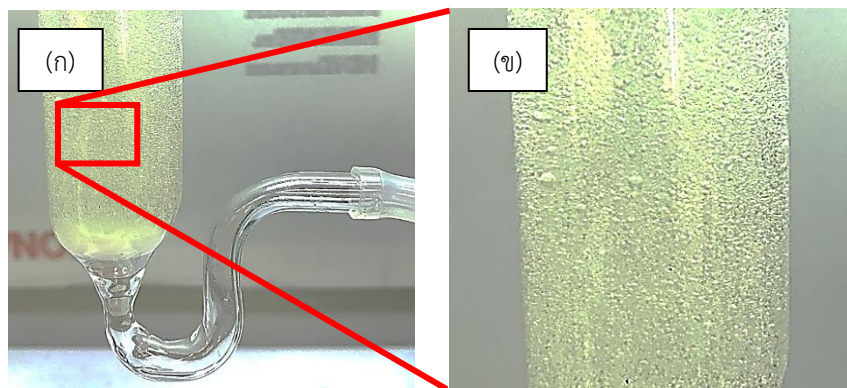
ซึ่งเทคโนโลยีในการเตรียมโครงร่างกระดูกในปัจจุบันมีเทคโนโลยีดังนี้ กระบวนการชะล้างเกลือ (Solvent casting/Particulate leaching) กระบวนการฟริสตายอิง (Freeze drying) และกระบวนการหล่อแบบจากสารละลาย (Solvent casting) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้มีข้อเสียบางประการดังเช่น กระบวนการชะล้างเกลือ (Solvent casting/Particulate leaching) ต้องใช้อุณหภูมิเกลือเป็นตัวช่วยทำให้เกิดรูพรุนส่งผลให้ลำบากในขั้นตอนการชะอนุภาคเกลือออกจากโครงร่างรองรับเซลล์และรูปร่างของรูพรุนนั้นจะเป็นไปตามรูปร่างของอนุภาคเกลือที่ใช้ กระบวนการฟริสตายอิง (Freeze drying) เป็นกระบวนการที่ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวในกระบวนการผลิต และกระบวนการหล่อ

แบบจากสารละลาย (Solvent casting) เป็นกระบวนการที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการละลายพอลิเมอร์ส่งผลให้ชิ้นงานที่ได้มีสารตกค้างของสารละลายอินทรีย์อยู่ด้วย และโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ได้จากกระบวนการนี้มักอยู่ในรูปของฟิล์มบาง [1, 3, 4] รูปที่ 1.1 เป็นภาพแสดงตัวอย่างของโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ได้จากกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่ารูพรุนในโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จะมีรูปร่างที่แตกต่างกัน และเป็นไปตามกระบวนการผลิตนั้นๆ



รูปที่ 1.1 ภาพตัวอย่างโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ได้จากกระบวนการขึ้นรูปต่างๆ (ก) โครงสร้างรองรับเซลล์จากกระบวนการฟริสตายอิง (Freeze drying) (ข) โครงสร้างรองรับเซลล์จากกระบวนการชะล้างเกลือ (Solvent casting/Particulate และ (ค) โครงสร้างรองรับเซลล์จากกระบวนการปั่นขึ้นรูปด้วยเส้นใย [5 - 7]

ดังนั้นทางผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของปัญหาและอุปสรรคเหล่านี้ จึงได้นำเสนอวิธีใหม่ ที่สามารถทำได้ง่าย และมีราคาถูก มาใช้ผลิตโครงสร้างรองรับเซลล์กระดูก โดยการนำเทคโนโลยีไมโครบับเบิลมาประยุกต์ใช้ในการสร้างฟองอากาศในโครงสร้างรองรับเซลล์กระดูกดังรูปที่ 1.2 ข้อดีของวิธีนี้คือ (1) ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไม่มีการใช้สารอินทรีย์ใดๆ ช่วยในกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงไม่มีการตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์, (2) เพื่อที่จะทำการสร้างฟองอากาศ (รูพรุน) ที่สามารถควบคุมขนาดของรูพรุนได้และคาดว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานเป็นโครงสร้างรองรับเซลล์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม และทั้งนี้ยังมีการศึกษาการเติมโพลีเมอร์ลงในโครงสร้างรองรับเซลล์อีกด้วย เพื่อที่จะสร้างเป็นโครงร่างในรูปแบบคอมพอสิต และต้องการที่จะศึกษาผลของการเติมโพลีเมอร์ต่อสมบัติทางชีวภาพ



รูปที่ 1.2 หลักการสร้างฟองอากาศสำหรับผลิตโครงร่างรองรับเซลล์ โดยเริ่มจากบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ลงไป
 ในบับเบิลคอลัมน์จากนั้นเป่าอากาศผ่านดิฟฟิวเซอร์จนเกิดเป็นบับเบิลอยู่ในบับเบิลคอลัมน์
 (ก) แสดงเป็นบับเบิลที่อยู่ในบับเบิลคอลัมน์ (ข) เป็นภาพขยายของบับเบิล
 ที่อยู่ในบับเบิลคอลัมน์ [8]

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 2.1 สร้างโครงร่างรองรับเซลล์ (Scaffold) ที่มีขนาดรูพรุนแตกต่างกันเพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพ โดยใช้เทคโนโลยีไมโครบับเบิล
- 2.2 สร้างโครงร่างรองรับเซลล์ที่มีไหมเป็นส่วนผสมลงไปเพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพ โดยการผสมผสานระหว่างกระบวนการไมโครบับเบิลและกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง
- 2.3 ศึกษาผลของปริมาณไหมในโครงร่างรองรับเซลล์ต่อสมบัติทางชีวภาพ

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ได้โครงร่างรองรับเซลล์ที่สามารถประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้
- 3.2 ได้โครงร่างรองรับเซลล์ที่สามารถควบคุมขนาดของรูพรุนได้และขนาดของรูพรุนมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นกว่าเดิม
- 3.3 ได้โครงร่างรองรับเซลล์ที่ไม่มีสารพิษตกค้าง
- 3.4 ได้วิธีใหม่ที่มีประสิทธิภาพสำหรับสร้างโครงร่างรองรับเซลล์ โดยมีกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก และต้นทุนต่ำ

4. ขอบเขตการวิจัย

4.1. ขึ้นรูปชิ้นงานโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลโดยใช้ดีฟิวเซอร์ที่มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง (10-16 ไมโครเมตร: P4) และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 20 มิลลิลิตร/นาที่, 100 มิลลิลิตร/นาที่, 200 มิลลิลิตร/นาที่ และ 300 มิลลิลิตร/นาที่ โดยใช้ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 50 มิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 25 %w/v ตามลำดับ

4.2. ขึ้นรูปชิ้นงานโครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลและกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งโดยใช้ดีฟิวเซอร์ที่มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง (10-16 μm : P4) และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 200cc/min แล้วทำการผสมสารละลายใหม่ลงไปที่มีความเข้มข้น 1, 3 และ 5 %w/v ตามลำดับ และความเข้มข้นของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 20 %w/v ตามลำดับ

4.3. ทำการทดสอบโครงสร้างทางจุลภาคโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM), สมบัติเชิงกล (Compressive strength), สมบัติการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน (DSC), ศึกษาหมู่ฟังก์ชัน (FT-IR), สมบัติการบวมน้ำ (Swelling) และสมบัติทางชีวภาพได้แก่ การเพิ่มจำนวนของเซลล์, การสังเคราะห์โปรตีน และกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ตามลำดับ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1. วัสดุชีวภาพ (Biomaterials)

วัสดุชีวภาพ คือวัสดุที่สามารถประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อการนำไปใช้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการนำมาใช้มากมาย ไม่ว่าจะเป็นการทดแทน การซ่อมแซม หรือการสร้างใหม่ของอวัยวะที่ได้รับความเสียหายหรือเสื่อมสภาพ โดยเนื้อเยื่อหรืออวัยวะในบริเวณที่ได้รับ ความเสียหายนั้นจะต้องไม่สามารถสร้างขึ้นใหม่ได้โดยธรรมชาติ จึงจำเป็นต้องใช้วัสดุชีวภาพมาใช้ในการทดแทน จุดประสงค์ของการใช้วัสดุทางการแพทย์คือ ใช้ทดแทนส่วนอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ ที่เสียหาย สูญเสีย หรือขาดหายไป ในขณะที่เดียวกันต้องเป็นวิธีที่ปลอดภัย เชื่อถือได้ ประหยัด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย [9]

2.1.1. ประวัติความเป็นมาของวัสดุชีวภาพ (History of biomaterials)

วิวัฒนาการของวัสดุที่ใช้ในทางการแพทย์ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ในยุคแรกๆ วัสดุที่นิยมใช้จะเป็นพวกโลหะไร้สนิม (Stainless steel) ต่อมาก็ได้มีการพัฒนา มาเรื่อยๆ จนถึงยุคปัจจุบัน โดยวิวัฒนาการของวัสดุชีวภาพที่สำคัญมี [10] ดังนี้

2.1.1.1. ปีพุทธศักราช 2372: เริ่มมีการศึกษาการฝังวัสดุจำพวกโลหะเข้าไปในกระดูกของ สุนัขและพืช เพื่อดูการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์ [10]

2.1.1.2. ปีพุทธศักราช 2413: ศัลยแพทย์ชาวอังกฤษ Joseph Lester ได้นำเสนอวิธีการ ผ่าตัดแบบปลอดเชื้อ (aseptic surgical) ปรากฏจากเชื้อจุลินทรีย์และแบคทีเรีย [10]

2.1.1.3. ปีพุทธศักราช 2429 H. Hansmann: แพทย์ชาวเยอรมัน เป็นคนแรกที่ได้นำแผ่น โลหะมาตรึงภายในร่างกายของมนุษย์ [10]

2.1.1.4. ปีพุทธศักราช 2474 Boston Smith: ศัลยแพทย์ชาวอังกฤษ พัฒนาถ้วยโลหะ สำหรับใช้ในงานสะโพกเทียม [10]

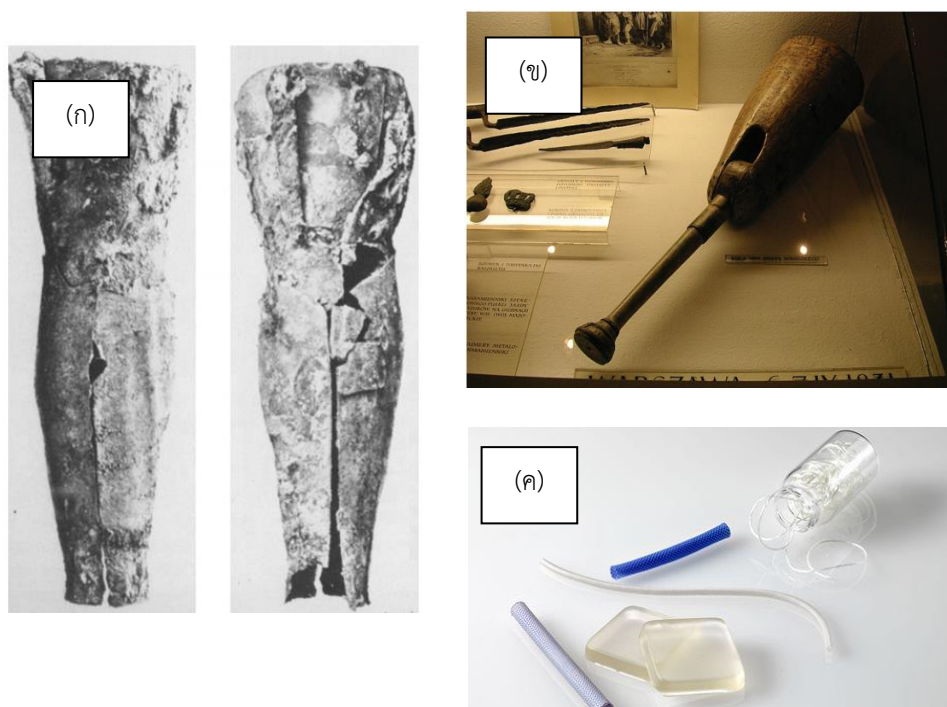
2.1.1.5. ปีพุทธศักราช 2482 – 2488: ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้มีการพัฒนาเทคนิคการ ผ่าตัดกระดูกและข้อและวัสดุใหม่ๆ จำนวนมาก จนกระทั่งปีพุทธศักราช 2493 ได้มีการโลหะ มาใช้อย่างเต็มรูปแบบเพราะพลาสติกในสมัยนั้นมีเพียงไม่กี่ชนิด [10]

2.1.1.6. ปีพุทธศักราช 2490: เกิดกระดาษแผ่นแรกจากพอลิเมอร์ชนิดพอลิเอธิลีน (Polyethylene) และมีแนวคิดจะนำไปใช้เป็นวัสดุเทียมใช้ฝังในร่างกาย [10]

2.1.1.7. ปีพุทธศักราช 2492: กระดาษแผ่นแรกที่ได้คิดค้นนั้นได้ถูกเผยแพร่ และได้มีการตีพิมพ์สารเติมลงไปมากมายเช่น Cellophane, Lucite และ Nylon ลงไป

2.1.1.8. ปีพุทธศักราช 2493 – ปัจจุบัน: ได้มีการปฏิวัติวัสดุชีวภาพมาเรื่อยๆ จนถึงปัจจุบัน [10]

รูปที่ 2.1 แสดงตัวอย่างของวัสดุชีวภาพ (ก) คือขาเทียมที่ทำจากทองแดงในช่วง 300 ปีก่อนคริสตกาล จัดทำขึ้นเพื่อให้ทหารในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 (ข) แสดงขาเทียมที่ทำมาจากไม้ วัสดุธรรมชาติ และ (ค) เป็นวัสดุชีวภาพที่ทำมาจากพอลิเมอร์ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน



รูปที่ 2.1 ภาพตัวอย่างของวัสดุชีวภาพจากยุคสมัยต่างๆ (ก) สมัย 300 ปีก่อนคริสตกาล (ข) และ (ค) วัสดุชีวภาพที่ทำมาจากวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ที่นิยมในปัจจุบัน [11, 12]

2.1.2. ชนิดของวัสดุชีวภาพ

ปัจจุบันวัสดุชีวภาพแบ่งออกเป็น 4 ชนิดคือ พอลิเมอร์ (Polymer), โลหะ (Metal), เซรามิก (Ceramic) และวัสดุกึ่งตัวนำ (Semiconductor material) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงาน [13] ดังนี้

2.1.2.1. วัสดุชีวภาพจากพอลิเมอร์ประยุกต์ใช้ในงาน กระบวนการขนส่งยา (Drug delivery devices), การฝังแก้วตาเทียม (Ocular implant) [13]

2.1.2.2. วัสดุชีวภาพจากเซรามิกประยุกต์ใช้ในงาน ปลุกกระดูก (Bone replacement), งานลิ้นหัวใจ (Heart valve) และงานทันตกรรม (Dental Implants) [13]

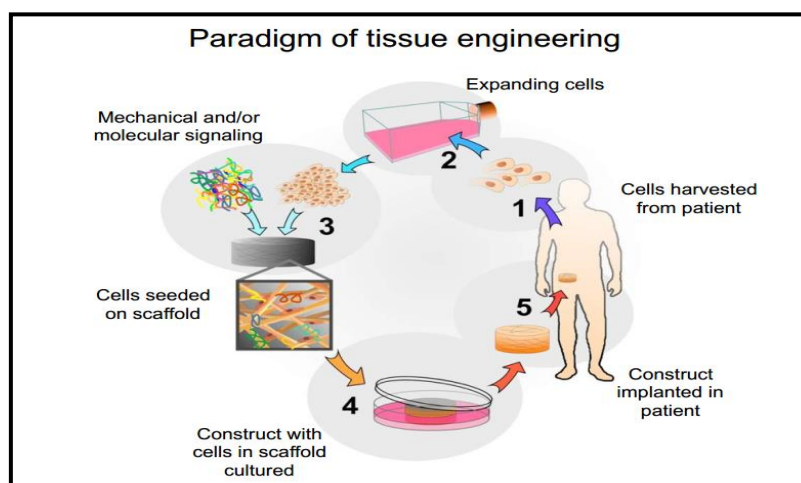
2.1.2.3. วัสดุชีวภาพจากโลหะประยุกต์ใช้ในงาน ทางด้านทันตกรรม (Dental Implants) และสกรูทางออร์โธปิดิกส์ (orthopedic screws) [13]

2.1.2.4. วัสดุชีวภาพจากวัสดุกึ่งตัวนำประยุกต์ใช้ในงาน ด้านไบโอเซ็นเซอร์ (Biosensors) และวัสดุฝังจำพวกไมโครอิเล็กโทรด (Implantable microelectrode) [13]

2.2. วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)

สาขาวิชาวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) ได้ก้าวหน้าอย่างมากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาวิธีการงอกขึ้นใหม่ของเนื้อเยื่อกันอย่างแพร่หลาย [14] ในปัจจุบันความผิดปกติของกระดูกนั้นเกิดเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มของวัยกลางคน วิธีการรักษาความผิดปกติเหล่านี้เรียกว่า การปลุกกระดูก (Bone grafts)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ(Tissue Engineering) คือ การประยุกต์รวมศาสตร์ทางวิศวกรรมวัสดุและวิทยาศาสตร์ชีวภาพ นำไปพัฒนาและสร้างวัสดุทดแทน ฟันฟู หรือปรับปรุงเนื้อเยื่อกระดูกตามธรรมชาติที่มีความเสียหายหรือมีความผิดปกติ [1] โดยทั่วไปแล้วนั้นกระบวนการในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการคือ การนำเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมาเลี้ยงบนวัสดุที่เตรียมจากอวัยวะของร่างกายแล้วค่อยนำกลับไปปลูกถ่ายบริเวณตำแหน่งเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย (Acellular matrices) และการเลี้ยงเซลล์บนวัสดุเพื่อให้เซลล์เจริญจนสามารถสร้างเนื้อเยื่อที่ต้องการก่อนแล้วค่อยไปปลูกถ่ายตรงตำแหน่งเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ (Matrices with cell) ดังนั้นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงประกอบด้วยปัจจัยที่สำคัญ 3 ประการคือ วัสดุค้ำจุน (matrices or scaffold), โกรว์ทแฟกเตอร์ (growth factors) และเซลล์ที่จะนำมาปลูกบนวัสดุค้ำจุน (cells) [15, 16] ตัวอย่างกระบวนการทำงานของวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นไปดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างกระบวนการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ tissue engineering [17]

2.2.1. วัสดุค้ำจุน (Matrices or scaffold)

งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะใช้วัสดุค้ำจุนหรือโครงร่างเทียมเป็นที่ทำให้เกิดการสร้างกระดูก โดยการนำเซลล์หรือเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนโครงร่างเทียมนี้ จนเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เลี้ยงนี้เจริญเติบโตไปเป็นกระดูกในบริเวณที่ได้รับความเสียหายนั้น วัสดุค้ำจุนที่จะนำมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะเป็นเป็นวัสดุที่มีความพรุนสูง, เป็นโครงร่างสามมิติ และควรมีคุณสมบัติสำคัญดังต่อไปนี้คือ ต้องเข้ากับเซลล์ร่างกายได้ดี, สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยปราศจากอาการอักเสบ, ควรก่อให้เกิดสภาพที่เหมาะสมต่อพฤติกรรมของเซลล์เช่น การเกาะติด การขยายขนาด การเคลื่อนย้าย และการเปลี่ยนแปลงของร่างกาย [3]

2.2.2. การออกแบบวัสดุค้ำจุนจากชีววัสดุ (Scaffold design from biomaterials)

โครงร่างรองรับเซลล์ (Scaffold) จัดเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญเพราะเนื่องจากทำหน้าที่เป็นตัวที่รองรับเซลล์เวลานำมาเลี้ยงเพื่อที่จะสร้างเป็นเนื้อเยื่ออวัยวะที่เราต้องการ [18] โดยตัวโครงร่างรองรับเซลล์จะมีลักษณะเป็นรูพรุนเพื่อให้เซลล์ที่นำมาปลูกสามารถเจริญเข้าไปข้างในได้ ซึ่งรูพรุนดังกล่าวจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางในระดับไมครอนและจะต้องมีลักษณะที่เหมาะสมกับเซลล์ที่เราต้องการจะนำมาปลูก [19] ปัจจุบันมีวัสดุค้ำจุนหลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็น พิล์ม เจล แผ่น ผง เส้นใย และเม็ด เป็นต้น การเลือกใช้ควรคำนึงถึงวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้งาน ดังเช่นถ้าเป็นแผลในบริเวณกว้างควรเลือกวัสดุค้ำจุนที่มีลักษณะเป็นแผ่นหรือเส้นใยในการซ่อมแซมบริเวณดังกล่าว ถ้าเป็นแผลในบริเวณแคบควรเลือกวัสดุค้ำจุนแบบเจล ส่วนรูปแบบผงหรือเม็ด เหมาะสำหรับใช้ตรึงสารหรือบรรจุสาร เช่นยาหรือโปรตีน ซึ่งจะใช้ในกระบวนการขนส่งยาเป็นต้น

ชีววัสดุที่ย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆคือ วัสดุที่ได้จากธรรมชาติ (Naturally derived materials) วัสดุที่เตรียมได้จากอวัยวะในร่างกาย (acellular tissue matrices) และพอลิเมอร์สังเคราะห์ (Synthetic polymers) ข้อดีของชีววัสดุ 2 ประเภทแรกคือ เข้ากับร่างกายได้ดีจึงไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย เช่น การอักเสบหรือการแพ้ ส่วนพอลิเมอร์สังเคราะห์มีข้อดีคือสามารถทำการผลิตซ้ำได้และผลิตได้ในปริมาณที่มาก [15]

2.2.3. คุณสมบัติของโครงร่างกระดูกอุดมคติ (Ideal scaffold)

2.2.3.1. ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) เป็นความสามารถที่จะรองรับเซลล์และกิจกรรมของเซลล์ได้โดยไม่เกิดเป็นพิษหรือความเสียหายกับเนื้อเยื่อโดยรอบ โดยโครงร่างกระดูกอุดมคตินั้นจะต้องมีสมบัติ Osteoconductive คือจะต้องให้เซลล์กระดูกสามารถเข้ายึดเกาะ เติบโต และสามารถสะสมอาหาร และแร่ธาตุที่บริเวณพื้นผิวและรูพรุนของวัสดุได้ [1]

2.2.3.2. สมบัติเชิงกล (Mechanical properties) สมบัติเชิงกลของโครงร่างควรเหมาะสมกับสมบัติเชิงกลของกระดูกในบริเวณที่ปลูกถ่ายเพื่อให้ได้ถ่ายเทแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ความพรุนและสมบัติเชิงกลของโครงร่างจะมีบทบาทสำคัญต่อการเกาะติดของเซลล์ด้วย เพราะรูพรุนที่เชื่อมต่อกันจะช่วยในการถ่ายเทแรงต่างๆ ไปทั่วทั้งโครงร่าง [20]

2.2.3.3. ขนาดของรูพรุน (Pore size) โครงร่างกระดูกอุดมคตินั้นจำเป็นต้องเป็นวัสดุที่มีรูพรุนและมีการเชื่อมต่อกันของรูพรุน เพื่อให้สารอาหารที่จำเป็นและออกซิเจนสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ เพื่อให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่อย่างไรก็ตามขนาดรูพรุนที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 100-1200 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดรูพรุนที่ทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตได้ดีที่สุด [1]

2.2.3.4. ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradability) ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูก โดยโครงร่างกระดูกอุดมคตินั้นจะต้องมีการสลายตัวในช่วงเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้มีพื้นที่ให้กับกระดูกที่เกิดขึ้นใหม่ ซึ่งจะเริ่มนับตั้งแต่เริ่มฝังโครงร่างเข้าไปในร่างกายของมนุษย์ [21] โดยโครงร่างนั้นไม่ได้อยู่ในร่างกายมนุษย์ไปตลอดถาวร โครงร่างจะใช้เวลาในการย่อยสลายตัวมันเองประมาณ 24 เดือน แต่การสลายตัวนั้นจะต้องไม่ส่งผลเสียต่อเนื้อเยื่อโดยรอบ ไม่ควรก่อให้เกิดการอักเสบต่อเนื้อเยื่อบริเวณอื่นๆ [22]

2.2.4. ชีววัสดุที่ได้จากธรรมชาติ (Naturally derived biomaterials) และวัสดุที่เตรียมได้จากอวัยวะในร่างกาย (Acellular tissue matrices) ในการสร้างโครงสร้างรองรับเซลล์

2.2.4.1. คอลลาเจน (Collagen) เป็นชีววัสดุที่จัดว่าเป็นองค์ประกอบหลักของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix, ECM) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในกระดูกและฟันโดยคอลลาเจนเป็นสารที่มีสมบัติทางชีววิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่จริง แต่เนื่องมาจากคอลลาเจนนั้นต้องนำมาจากสัตว์จึงเป็นข้อพิงระลึกถึงทางด้านจริยธรรม จึงทำให้มีการคิดที่จะใช้สารใหม่หรือโปรตีนทดแทนการใช้คอลลาเจน โปรตีนตัวใหม่ที่เกิดขึ้นได้คือ ไหม (Silk) [16]

2.2.4.2. ไหม (Silk) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใย ซึ่งถูกผลิตจากหนอนไหม และแมงมุมเป็นต้น ไหมที่ได้จากแหล่งต่างกันจะส่งผลต่อสมบัติไหมที่ต่างกันไป ไหมที่ได้จากหนอนไหม (Silkworm silk) เป็นไหมที่ถูกนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ ในงานสิ่งทอ และทางการแพทย์มาหลายทศวรรษ ไหมจะถูกผลิตจากหนอนไหมชนิดบอมบรีกซ์ มอริ (Bombyx mori) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือ ไฟโบรอิน (fibroin) และ เซอริซิน (sericin) เป็นเส้นใยที่มีลักษณะคล้ายกับเส้นใยคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของกระดูกแต่มีความแข็งแรงสูงกว่า 1000 เท่า ไหมไฟโบรอินเป็นไหมที่นิยมนำมาใช้ในกระบวนการทางการแพทย์เนื่องจาก เป็นเส้นใยที่มีความแข็งแรงสูง เข้ากันได้ดีกับเซลล์ของร่างกาย ก่อให้เกิดการอักเสบต่ำ ระบายน้ำและอากาศได้ดี สามารถสลายได้ในกระบวนการของสิ่งมีชีวิต และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์หลากหลายชนิด ไหมได้มาจากแมงมุม (Spider silks) เป็นไหมที่ไม่นิยมนำใช้ในเชิงพาณิชย์ จะนำไปใช้ในทางการแพทย์เป็นหลัก เพราะเนื่องจากไหมจากแมงมุมค่อนข้างหาได้ยากเมื่อเทียบกับไหมจากหนอนไหม [23] ด้วยเหตุผลนี้ไหมไฟโบรอินจึงถูกเตรียมสำหรับเป็นโครงสร้างรองรับเซลล์สำหรับงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ไหมไฟโบรอินยังสามารถผลิตได้หลายรูปแบบเช่น เจล ฟองน้ำ ผง ฟิล์ม เส้นใย และอนุภาค ข้อดีของการนำไหมไปใช้คือ มีระยะเวลาในการสลายตัวที่นาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงนิยมปรับปรุงหรือพัฒนาสมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพของไหมให้ย่อยสลายได้เร็วขึ้น [16]

2.2.4.3. ไคติน-ไคโตซาน (chitin-Chitosan) เนื่องจากเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ ร่างกายจึงไม่เกิดการต่อต้านสารดังกล่าว นอกจากนี้ไคติน-ไคโตซานยังช่วยป้องกันการติดเชื้อจึงนำมาใช้งานทางด้านวัสดุทางการแพทย์ได้เป็นอย่างดีในร่างกาย [15] นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจึงไม่เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ การไวไฟหรือเป็นพิษ สามารถนำไปใช้ทดแทนกระดูก ใช้เป็น filling ในกระดูกและฟัน ใช้เป็นวัสดุปิดปากแผล อีกทั้งยังเป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดการสร้างเซลล์ใหม่ได้อีกด้วย [24]

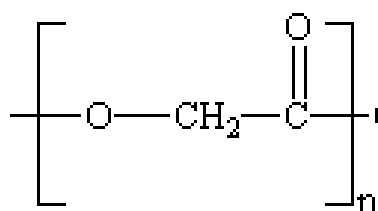
2.2.4.4. เจลาติน (Gelatin) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้มาจากกรดหรืออัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสของสัตว์ มีลักษณะคล้ายคอลลาเจนบนผิวหนังของสัตว์แต่วิธีการผลิตที่แตกต่างกัน ซึ่งปัจจุบันนิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์เนื่องจากหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ

และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่ก่อให้เกิดอันตรายจากการย่อยสลายของเอนไซม์ นอกจากนี้เจลลาตินยังถูกนำไปใช้เป็นสารเชื่อมต่อเนื้อเยื่อ และเจลาตินยังสามารถนำไปผสมกับพอลิเมอร์อื่นๆ ได้ดีอีกด้วย [25]

2.2.5 ซิววัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthesis derived biomaterials) ในการสร้างโครงสร้างรับรองเซลล์

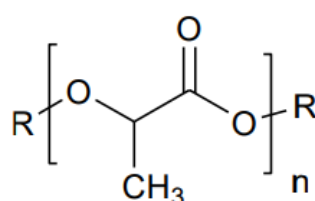
พอลิเมอร์สังเคราะห์ (Synthetic polymers) การศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้วัสดุในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อพบว่า กลุ่มของวัสดุที่ย่อยสลายยากมีการใช้งานเป็นลำดับแรกๆ ต่อมาพอลิเมอร์สังเคราะห์หรือที่รู้จักกันดีคือ ไหมละลาย ได้รับความนิยมนมากกว่า ที่พบมากได้แก่กลุ่มพอลิเอสเทอร์ (Polyesters) ได้แก่

2.2.5.1. พอลิไกลโคลิกแอซิด (polyglycolic acid: PGA) เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดหนึ่ง ที่มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ เป็นพอลิเมอร์ชนิดเทอร์โมพลาสติก มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ประมาณ 255 – 230 องศาเซลเซียส เป็นพอลิเมอร์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำเพราะมีความเป็นผลึกสูง แต่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้เมื่อมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ในปี 1960 พอลิไกลโคลิกแอซิด ถูกวางในท้องตลาดเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้มีชื่อทางการค้าว่า DEXON พอลิไกลโคลิกแอซิดเป็นวัสดุที่ต้องการสำหรับแพทย์เนื่องจากมีพฤติกรรมการย่อยสลายทางชีวภาพที่ดีเป็นเหตุผลหลัก โดยในการฝังรากฟันเทียมแบบย่อยสลายได้ส่วนใหญ่จะไม่ต้องการให้เกิดการผ่าตัดเป็นครั้งที่สองเพื่อกำจัดสิ่งที่ฝังอยู่ในรากฟันเทียมจึงนิยมนำพอลิไกลโคลิกแอซิดมาใช้ ปัจจุบันนิยมนำพอลิไกลโคลิกแอซิดไปใช้ในงานระบบขนส่งสาร (delivery vesicles) และงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (scaffolds for tissue regeneration) ที่ใช้กับกระดูก กระดูกอ่อน หรือเส้นเอ็น เป็นต้น [16, 26] โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไกลโคลิกแอซิดแสดงดังรูปที่ 2.3



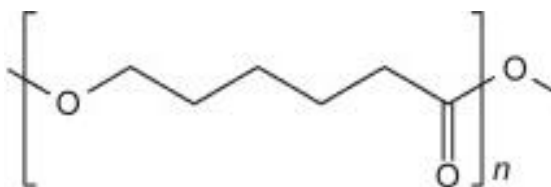
รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไกลโคลิกแอซิด [27]

2.2.5.2. โพลีแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) เป็นพอลิเอสเทอร์อเนกประสงค์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ได้จากวัสดุธรรมชาติ หรือได้มาจากการพอลิเมอไรเซชันของกรดแลคติกพวกรัณพีษ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมีการนำไปใช้งานอย่างกว้างขวางในด้านชีวการแพทย์ รวมถึงการเย็บวัสดุยึดกระดูก, วัสดุขนส่งยา และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นพอลิเมอไรท์สามารถหลอมแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ได้ มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 150 – 160 องศาเซลเซียส แต่มีข้อจำกัดคือมีราคาค่อนข้างสูง มีความแข็งแรงต่ำ และทนอุณหภูมิสูงได้ไม่ดี [28, 29] โครงสร้างโมเลกุลของโพลีไกลแลคติกแอซิดแสดงดังรูปที่ 2.4



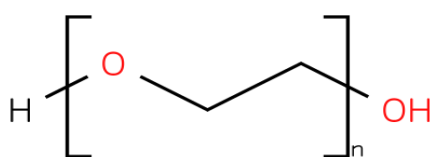
รูปที่ 2.4 โครงสร้างโมเลกุลของโพลีแลคติกแอซิด [29]

2.2.5.3. โพลีคาโปแลกโตน (poly-ε-caprolactone: PCL) เป็นพอลิเมอไรท์ย่อยสลายทางชีวภาพได้ (Biodegradable Polymer) มีโครงสร้างคล้ายโพลีแลคติกแอซิด แต่การสลายตัวช้ากว่า มีสมบัติเชิงกลและการเข้ากันได้ดีกว่าเซลล์ดีกว่าโพลีแลคติกแอซิด ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ดีในอะซิโตน คอโรฟอร์ม และเตตระไฮโดรฟูราน มีจุดหลอมเหลวต่ำอยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส นำไปประยุกต์ใช้กับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น กระดูกอ่อน ติบ ผิวนั่ง กระดูก และเซลล์ประสาท เป็นต้น โดยการใช้งานโพลีคาร์โปแลกโตนมักอยู่ในรูปของของแข็งที่เป็นพอลิเมอร์ผสมหรือคอมพอสิตพอลิเมอร์ [16, 30, 31] โครงสร้างโมเลกุลของโพลีคาโปแลกโตนแสดงดังรูปที่ 2.5



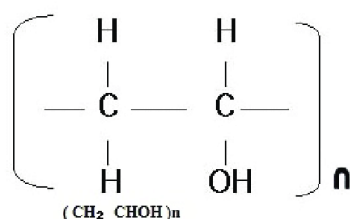
รูปที่ 2.5 โครงสร้างโมเลกุลของโพลีคาโปแลกโตน [32]

2.2.5.4. พอลิเอธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol: PEG) เป็นพอลิเมอร์ชนิดชอบน้ำ (hydrophilic) มีความสำคัญต่อการใช้งานทางการแพทย์ มีจุดหลอมเหลวประมาณ 61 - 66 องศาเซลเซียส สามารถปรับปรุงสมบัติต่างๆ ให้เข้ากับเนื้อเยื่อของมนุษย์ใช้ในกระบวนการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และกระบวนการขนส่งยา มีสมบัติที่สำคัญต่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่นมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ [33] พอลิเอธิลีนไกลคอลสามารถละลายได้ดีในน้ำ ดังนั้นหลังจากที่พอลิเอธิลีนไกลคอลสลายตัวแล้วจะทำให้เกิดรูพรุน [34] โครงสร้างโมเลกุลของพอลิเอธิลีนไกลคอลแสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างโมเลกุลของพอลิเอธิลีนไกลคอล [35]

2.2.5.5. พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol: PVA) เป็นมอนอเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ ทำให้มีสมบัติเป็นพอลิเมอร์ชอบน้ำคือสามารถละลายน้ำได้ดีและสามารถดูดซับน้ำได้ดีเยี่ยม พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีความเป็นผลึกสูงจะมีค่าเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสสูงจะทำให้ละลายน้ำได้ดีกว่า เพราะน้ำสามารถแทรกตัวโมเลกุลได้ดี เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถละลายในน้ำได้เวลานานไปใช้งานจึงมีความปลอดภัย ไม่เสี่ยงต่อการตกค้างของตัวทำละลายชนิดต่างๆ สามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกาย และย่อยสลายตัวเองได้โดยน้ำ โดยย่อยสลายเป็นจุลินทรีย์เมื่อถึงสภาวะที่เหมาะสม [16] ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้นักวิจัยจึงนิยมนำพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ไปใช้ในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพราะมีความบริสุทธิ์สูง ไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก [36] เช่นการนำไปใช้งานในหลอดเลือดแดง, งานลิ้นหัวใจ, การกระจกตาเทียม และวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน [37] โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 โครงสร้างโมเลกุลของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ [36]

2.3. ลักษณะรูปร่างของโครงร่างรองรับเซลล์ (Formation of the scaffold)

โครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิเมอร์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยทั่วไปแล้วนั้น นิยมสร้างให้มีรูปร่างเป็น 3 ลักษณะ [16] ดังนี้

2.3.1 โครงร่างแบบไฮโดรเจล (Hydrogel scaffold)

โครงร่างไฮโดรเจลนั้นเป็นโครงร่างที่มีลักษณะเป็นโครงข่าย 3 มิติ ที่สร้างมาจากพอลิเมอร์ที่มีสมบัติการดูดซับน้ำที่ดี เพราะสมบัติโดยทั่วไปของไฮโดรเจลนั้นมีความสามารถในการดูดซับน้ำสูงแต่ไม่เกิดการละลาย ส่งผลให้มีสมบัติการบวมตัว (Swelling) ที่ดีเยี่ยมตามมาด้วย ในสถานะที่ไฮโดรเจลเกิดการบวมตัวนั้นจะมีลักษณะนิ่มและเป็นยางคล้ายกับเนื้อเยื่อของมนุษย์ นอกจากนี้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อยังมีการนำไฮโดรเจลไปผสมกับพอลิเมอร์ตัวอื่นเป็นจำนวนมากเช่น ไคติน, ไคโตซาน และอัลจินต เป็นต้น ไฮโดรเจลยังมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่พึงประสงค์ต่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ไฮโดรเจลค้นพบครั้งแรกเมื่อ 50 ปีที่แล้ว เมื่อปีคริสต์ศักราช 1955 – 1960 และได้มีการพัฒนาเรื่อยมาจนสามารถประดิษฐ์เลนส์ตาเทียมได้ในรูปแบบของไฮโดรเจลเป็นครั้งแรก ซึ่งจากนั้นเป็นต้นมาได้มีการวิจัยในด้านไฮโดรเจลเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในสองทศวรรษที่ผ่านมา นอกจากนี้การใช้ไฮโดรเจลในปัจจุบันได้มีการนำไปใช้งานในหลายแขนงมากขึ้นเพื่อให้ครอบคลุมงานทางการแพทย์ทั้งหมด เช่น ใช้ในกระบวนการส่งมอบยา, การรักษาบาดแผล, วัสดุทางตา และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น

เนื่องจากโครงร่างไฮโดรเจลมีสมบัติในการบวมน้ำที่ดีเมื่อนำไปใช้ในร่างกายมนุษย์อาจจะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายก่อนเวลาอันควรได้ ดังนั้นในกระบวนการสร้างโครงร่างไฮโดรเจลนั้น จำเป็นจะต้องทำการเชื่อมขวางทางฟิสิกส์ (Physical crosslinking of hydrogel polymeric precursors) ดังเช่น การนำพอลิเมอร์ที่มีสมบัติชอบน้ำไปละลายให้เป็นสารละลายพอลิเมอร์ จากนั้นสารละลายพอลิเมอร์จะเกิดการแตกตัวเป็นประจุลบ แล้วทำการเติมอนุภาคของเกลือลงไปหรืออนุภาคของอะไรก็ได้ที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวก เมื่อประจুবวกจากอนุภาคเกลือแตกตัวจะไปจับกับประจุลบจากสารละลายพอลิเมอร์ทำให้เกิดการเชื่อมขวางกันด้วยแรงระหว่างประจุ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำโครงร่างไปใช้งานจริงนั้น ก็ไม่สามารถรับแรงหรือทนแรงของเนื้อเยื่อได้ จึงต้องทำการเชื่อมขวางทางเคมีแทน (Chemical crosslinking of hydrogel polymeric precursors) วิธีการเชื่อมขวางทางเคมีนั้น มีกระบวนการในการสร้างไฮโดรเจลเหมือนกับการเชื่อมขวางทางฟิสิกส์ทั้งหมด เพียงแต่การเชื่อมขวางทางเคมีจะมีการเพิ่มตัวเชื่อมขวางแบบ bi-functional crosslinking agent หรือหมู่ทางเคมี ลงไปในสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งสารละลายพอลิเมอร์นั้นจะต้องมีฟังก์ชันหรือหมู่ทางเคมีที่เหมาะสมกับสารตัวเติมที่เติมลงไป ซึ่งการเชื่อมขวางทางเคมีนี้นิยมใช้กับสารละลายพอลิเมอร์ที่มาจากสารสังเคราะห์และจากธรรมชาติ ตัวอย่างของการเชื่อมโยงทางเคมี เช่น การเชื่อมขวางอัลบู

มิน (albumin) ผสมเจลาติน (gelatin) ไฮโดรเจล เกิดการเชื่อมขวางด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) เป็นต้น

โดยปกติหลังจากการเชื่อมขวางจะทำให้โครงร่างไฮโดรเจลมีลักษณะเป็นตาข่ายอยู่ภายใน ซึ่งขนาดของตาข่ายนี้จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของการเชื่อมขวาง ถ้ามีความหนาแน่นสูงจะทำให้ตาข่ายมีขนาดเล็ก ถ้าความหนาแน่นต่ำตาข่ายจะมีขนาดใหญ่ ทั้งนี้ก็จะขึ้นอยู่กับการใช้งาน ซึ่งเวลานำไปใช้งานในวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะนิยมใส่ไปตั้งก่อน แล้วปล่อยให้ย่อยสลายเองตามธรรมชาติ [16, 38]



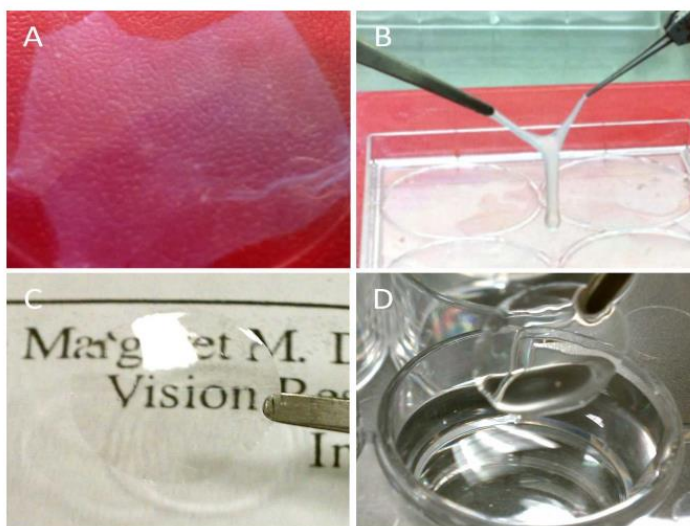
รูปที่ 2.8 โครงร่างรองรับเซลล์แบบไฮโดรเจลที่มีการบวมน้ำอยู่ภายใน [39]

2.3.2 โครงร่างแบบสองมิติ (2 Dimension scaffold)

โครงร่างสองมิติ ในปัจจุบันนิยมขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มที่มีลักษณะบางหรือหนาโดยจะขึ้นอยู่กับการใช้งาน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนโครงร่างสองมิตินั้นทำได้ดีในระดับหนึ่ง ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี แต่ในเรื่องของการแพร่กระจายของเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงนั้นยังไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเทียบกับโครงร่างแบบสามมิติ เพราะโครงร่างแบบสามมิติจะมีพื้นที่ให้เซลล์เกาะยึดมากกว่าแบบสองมิติ นอกจากนี้โครงร่างแบบสองมิตียังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านกระบวนการขนส่งยาอีกด้วย

ในกระบวนการผลิตโครงร่างแบบสองมิตินิยมใช้กระบวนการหล่อสารละลายพอลิเมอร์ หรือการปั่นสารละลายให้เกิดเป็นแผ่นโครงร่าง โดยสำหรับโครงร่างสองมิตินั้นจะมีข้อดีตรงที่ลักษณะของพื้นผิวจะมีความขรุขระ มีความหยาบ ส่งผลให้เซลล์สามารถเกาะอยู่ได้ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ เช่น งานวิจัยของ M. Hosseinkhani et. al [40] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาการกำเนิดของเซลล์ และความแตกต่างของเซลล์บนโครงร่างเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ ผลที่ได้พบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นเจริญได้ดีในทั้งสองโครงร่างแต่ในเรื่องของการแพร่กระจายของเซลล์พบว่าโครงร่างแบบสามมิติทำได้ดีกว่า ตามรายงานของ C. Xu et al. [41] ได้ทำการศึกษาพื้นผิวที่ขรุขระกับพื้นผิวที่เรียบว่าจะส่งผลอย่างไรต่อการยึดเกาะบนแผ่นไทเทเนียม พบว่าเซลล์กระดูก (osteoblast) ที่มีความขรุขระนั้นสามารถยึดติดบนพื้นผิวไทเทเนียมได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ของเหงือก (gingival) ที่มีความเรียบบนพื้นผิวไทเทเนียม จาก

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าบนพื้นที่ขรุขระนั้นมีผลต่อการยึดเกาะ และยึดเกาะได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีความเรียบ ซึ่งในกระบวนการขึ้นรูปพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปสามารถใช้ได้ทั้งพอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวหรือพอลิเมอร์สองชนิดผสมกันก็ได้ รูปที่ 2.9 แสดงตัวอย่างของโครงร่างแบบสองมิติแบบฟิล์มบางที่ผลิตมาจากไหมธรรมชาติ

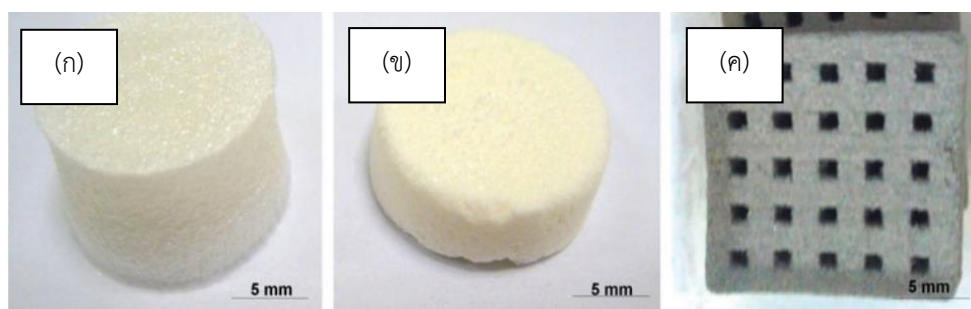


รูปที่ 2.9 โครงร่างรองรับเซลล์แบบสองมิติที่สร้างมาจากไหม (Silk fibroin) นำมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มบาง [42]

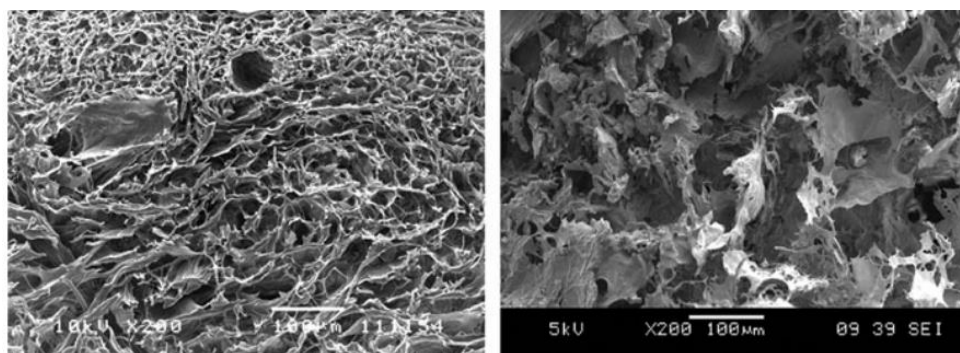
2.3.3 โครงร่างแบบสามมิติ (3 Dimension scaffold)

โครงร่างแบบสามมิติเป็นโครงร่างที่นิยมนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนกันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในปัจจุบัน โดยเฉพาะในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพราะโครงร่างแบบสามมิติจะเปรียบเสมือนเป็นสิ่งแวดล้อมขนาดใหญ่ที่เหมาะสมสำหรับการรวมตัวกันของเซลล์หรือเป็นที่ให้เซลล์เกิดการสื่อสารกัน เชื่อมโยงกัน ซึ่งปัจจัยที่ทำให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตเพื่อสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับความเสียหาย โครงร่างแบบสามมิติโดยทั่วไปนั้นจะมีรูพรุนอยู่ภายใน นิยมสร้างให้เป็นโครงร่างพรุน และมีการเชื่อมต่อกันของโครงข่ายรูพรุนเพื่ออำนวยความสะดวกให้กับกระบวนการขนส่งอาหาร และให้อากาศถ่ายเทเข้าไปถึงเซลล์ที่เลี้ยงได้อย่างสะดวก [43] โดยโครงร่างที่สร้างนั้นจะต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ มีสมบัติทางกลที่เหมาะสมเพื่อที่จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตดังรูปที่ 2.10 ซึ่งสาเหตุที่ต้องทำการขึ้นรูปให้เป็นรูพรุนเพราะต้องการเพิ่มพื้นที่ให้เซลล์เข้าไปยึดเกาะ เพื่อให้เซลล์มีที่อยู่มากขึ้น ต้องการจำลองสภาพให้เหมือนกระดูกจริงของมนุษย์ที่มีความพรุนอยู่ภายในดังรูปที่ 2.11 และอีกเหตุผลหนึ่งคือเมื่อมีรูพรุนในโครงร่างจะช่วยให้สื่อสารหรือโมเลกุลต่างๆกระจายเข้าสู่ทั้งตัวโครงร่างได้ดีกว่าเดิม [16] โดยขนาดของรูพรุนที่อยู่ภายในโครงร่างนั้นมีหลากหลายขนาดเพราะเนื่องมาจากกระบวนการผลิต พอลิเมอร์ที่ใช้ และสารช่วยให้เกิดรูพรุน

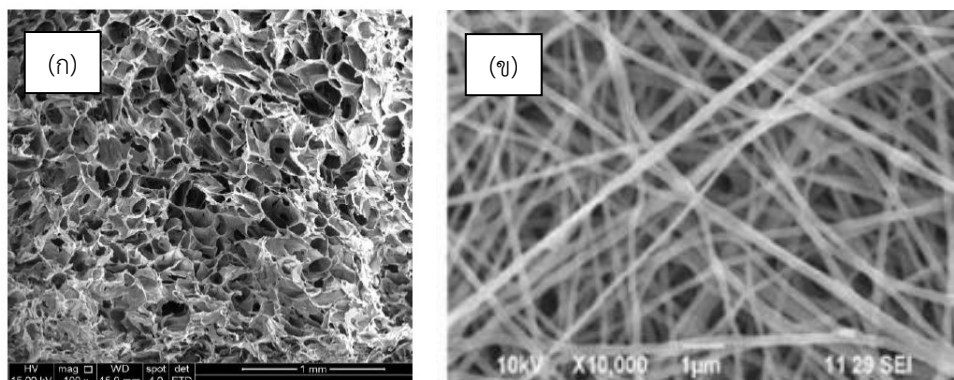
ต่างๆ ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำงานที่แตกต่างกันทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับการนำไปใช้งานและชนิดของเซลล์ที่จะนำมาปลูกด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.12 นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้โครงร่างสามมิติในงานจำพวกการขนส่งยา, ใช้งานตรวจสอบพฤติกรรมของเซลล์ และเป็นที่นิยมนำมาศึกษาอีกมากในเชิงวัสดุวิศวกรรมสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น



รูปที่ 2.10 โครงร่างรองรับเซลล์แบบสามมิติที่สร้างมาจากวัสดุที่แตกต่างกัน (ก) โครงร่างสามมิติที่สร้างมาจากแอลจินต (Alginate), (ข) โครงร่างสามมิติที่สร้างมาจากโอวัลบูมิน (Ovalbumin) และ (ค) โครงร่างสามมิติที่สร้างมาจากไทเทเนียม (Titanium) [43]



รูปที่ 2.11 ตัวอย่างภาพโครงสร้างทางจุลภาคของกระดูกมนุษย์ที่มีขนาดของรูพรุนที่ต่างกัน [43]



รูปที่ 2.12 ตัวอย่างภาพโครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างสามมิติที่มีลักษณะและขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกัน (ก) โครงร่างสามมิติที่ได้มากจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drying) และ(ข) โครงร่างสามมิติที่ได้มากจากกระบวนการปั่นขึ้นรูปเป็นเส้นใย (electrospinning) [44, 45]

2.4. โครงร่างกระดูกจากพอลิเมอร์

พอลิเมอร์นั้นมีความอ่อนไหวและความสามารถในการสลายตัวทางชีวภาพ ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกนั้นส่วนมากใช้พอลิเมอร์จากธรรมชาติเช่น คอลลาเจน ไคติน-ไคโตซาน ไฟโบรอิน แอลจินेट ไทม และกรดไฮยาลูโรนิก ข้อได้เปรียบของการใช้พอลิเมอร์คือ ความง่ายในกระบวนการขึ้นรูปและความสามารถในการดัดแปลงทางเคมี กระบวนการสลายตัวของพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิแลคติกแอซิด (PLA) พอลิไกลโคลิคแอซิด (PGA) และพอลิคาโปแลคโตน (PCL) จะให้สารผลิตภัณฑ์เป็นมอนอเมอร์ซึ่งร่างกายสามารถกำจัดออกได้เองตามธรรมชาติ พอลิเมอร์บางชนิดเช่น พอลิพอพอลิฟลูออโรเอทิลีน (PPE) มีค่าความแข็งแรงในการกดอัดสูงมากเมื่อเทียบกับกระดูกชั้นนอก และระยะเวลาในการสลายตัวสามารถควบคุมได้อยู่ในช่วงกว้าง อย่างไรก็ตามความแข็งแรงของโครงร่างกระดูกจากพอลิเมอร์ลดลงอย่างรวดเร็วระหว่างกระบวนการสลายตัวแม้ว่าความแข็งแรงเริ่มต้นจะมีค่าสูงก็ตาม

2.4.1 เทคโนโลยีที่ใช้ในการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์

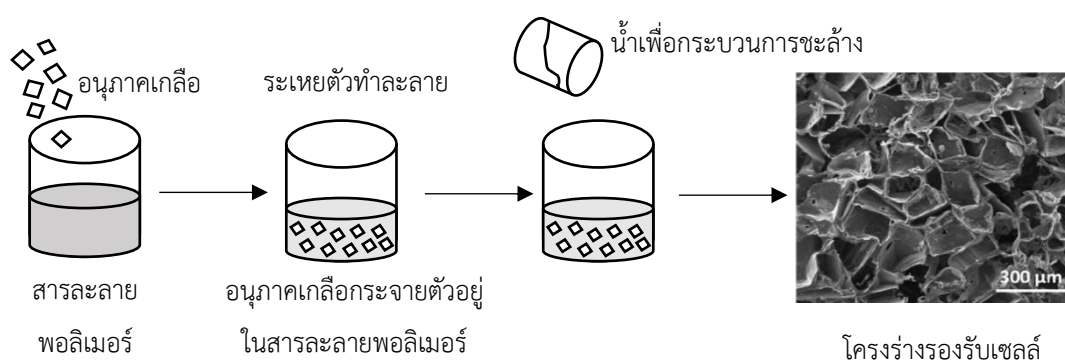
เทคนิคที่ใช้ในการผลิตโครงร่างกระดูกควรที่จะสามารถควบคุมจำนวน และขนาดของรูพรุนได้ซึ่งจำนวนรูพรุนจะช่วยสนับสนุนการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงร่างกระดูก ส่วนขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมมีหน้าที่ทำให้ออกซิเจนและสารอาหารซึมผ่านได้ และการเชื่อมต่อกันของรูพรุนที่มีลักษณะเป็นรูพรุนแบบเปิดก็ช่วยให้เกิดการถ่ายโอนสารอาหาร และออกซิเจนเข้าไปเลี้ยงเซลล์ช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น [2, 3] วิธีการเตรียมโครงร่างกระดูกแบบดั้งเดิมที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีหลายวิธีดังเช่น กระบวนการหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกลือ (solvent

casting/particulate leaching), กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze drying), การขึ้นรูปเป็นเส้นใย (electrospinning), การหล่อขึ้นรูปโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent casting), การขึ้นรูปโดยใช้โฟมแก๊ส (Gas foaming), การขึ้นรูปโดยการแยกเฟสโดยการเหนี่ยวนำความร้อน (Thermally-induced phase separation (TIPS)), การขึ้นรูปโดยการหลอมเหลว (Melt moulding) และการขึ้นรูปโดยการสร้างต้นแบบ (Rapid prototyping) [2] ซึ่งแต่ละวิธีนั้นมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น

2.4.1.1 กระบวนการหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกลือ (solvent casting/particulate leaching)

กระบวนการหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกลือ วิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการเติมอนุภาคเกลือ ลงไปผสมกับสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งสารละลายพอลิเมอร์นั้นเกิดจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการละลายเม็ดพอลิเมอร์ เมื่อได้สารละลายทั้งสองชนิดแล้วทำการผสมให้รวมกันเป็นเนื้อเดียว จากนั้นทำแห้งโดยการระเหยตัวทำละลายออก [46] จากรายงานของ H. Janik et al. [4] กล่าวว่าไว้ว่าสารละลายพอลิเมอร์ที่ใช้ควรมีความเข้มข้นอยู่ที่ 5-20% w/v และขนาดของรูพรุนนั้นอาจจะขยายเพิ่มขึ้นอีกหลังจากกระบวนการทำแห้ง แต่อุณหภูมิของเกลือก็ยังคงค้างอยู่ในโครงร่างหลังจากนั้นให้นำไปแช่น้ำกลั่นอนุภาคเกลือจะถูกชะออกมาทำให้เกิดเป็นโครงร่างที่เป็นรูพรุน ตามรายงานของ N. Zhu et al. [47] รูพรุนที่ได้กระบวนการนี้มีมากถึง 93 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ามีความพรุนสูง และขนาดของรูพรุนที่ได้จะเฉลี่ยอยู่ที่ 500 ไมโครเมตร รูปร่างของรูพรุนจะขึ้นอยู่กับรูปร่างของอนุภาคเกลือที่ใช้ ถ้าอนุภาคเกลือมีทรงกลมรูพรุนที่ได้ก็จะกลม ถ้าอนุภาคเกลือเป็นทรงเหลี่ยมรูพรุนที่ได้ก็จะเหลี่ยม ซึ่งในกระบวนการขึ้นรูปแบบหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกลือนี้ จะนิยมใช้แค่อนุภาคของเกลือเท่านั้น อนุภาคของน้ำตาล, ซูโครส และแป้งจะไม่นิยมนำมาใช้เป็นสารช่วยก่อรูพรุน กระบวนการขึ้นรูปนี้มีข้อควรระวังตรงที่ถ้าหากปริมาณเกลือที่ใช้ไม่มากพอจะทำให้สารละลายพอลิเมอร์เกิดการปกคลุมรอบอนุภาคเกลือได้โครงร่างที่ได้ก็จะไม่มีความพรุนที่มากพอ ในทางกลับกันถ้าอนุภาคของเกลือมากเกินไปจะทำให้เนื้อของสารละลายพอลิเมอร์ไม่เพียงพอต่อการคงรูป โครงร่างที่ได้ก็จะเป็โครงร่างแบบรูพรุนปิดซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และนอกจากนี้ในเรื่องของความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ก็เป็นอีกปัจจัยที่ควรระวัง เพราะถ้าความเข้มข้นของสารละลายมากจะทำให้ผนังของรูพรุนนั้นมีความหนามาก ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อสมบัติเชิงกลของโครงร่าง D. C. Sin et. al [48] ได้ทำการศึกษาไว้ว่า สมบัติเชิงกลของโครงร่างนั้นจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของรูพรุน ถ้ารูพรุนขนาดใหญ่จะทำให้สมบัติเชิงกลลดลงเมื่อเทียบกับรูพรุนขนาดเล็ก ข้อได้เปรียบหลักของกระบวนการนี้คือ ง่ายในการผลิตโดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่หายากมาใช้ แต่มีข้อเสียเปรียบตรงที่มีความยากลำบากในการเลือกขนาดของอนุภาคเกลือเพราะขนาดของ

อนุภาคเกล็ดจะมีผลต่อสมบัติเชิงกล ควบคุมความหนาของโครงร่างได้ยากเพราะมีอนุภาคของเกล็ดผสมอยู่ภายใน รูปร่างของรูพรุนในโครงร่างจะขึ้นอยู่กับรูปร่างอนุภาคเกล็ดและมีการตกค้างของสารอินทรีย์ในโครงร่างซึ่งเป็นสิ่งไม่พึงประสงค์สำหรับการใช้งานด้านชีวการแพทย์ รูปที่ 2.13 เป็นรูปแสดงการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยกระบวนการหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกล็ด นอกจากนี้ในงานวิจัยของ R. Huang et al. [49] ได้ทำการศึกษาวิธีการชำระล้างเกล็ดที่เหมาะสมของโครงร่างพอลิแลคติกแอซิดที่เตรียมโดยเทคนิคการหล่อด้วยตัวทำละลายและศึกษาผลของเกล็ดที่ยังคงหลงเหลืออยู่ภายในโครงร่าง พบว่าเมื่อทำการระเหยตัวทำละลายออกแล้วนั้นการชำระล้างด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องทำให้อนุภาคของเกล็ดไหลเข้าไปรวมกันอยู่ตรงบริเวณเดียวทำให้ชำระล้างเกล็ดออกได้ไม่หมด ซึ่งทำการแก้ไขปัญหานี้โดยเพิ่มอุณหภูมิให้โครงร่างก่อนการชำระล้างจะทำให้อนุภาคเกล็ดเกิดการตกผลึกลงมาก่อนและนำไปชำระล้างด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องพบว่าอนุภาคตกค้างลดลง และรูปร่างของรูพรุนที่ได้นั้นเป็นไปตามรูปร่างของอนุภาคเกล็ด แสดงให้เห็นว่ากระบวนการนี้มีข้อจำกัดอยู่จริงตามที่ได้กล่าวไปข้างต้น

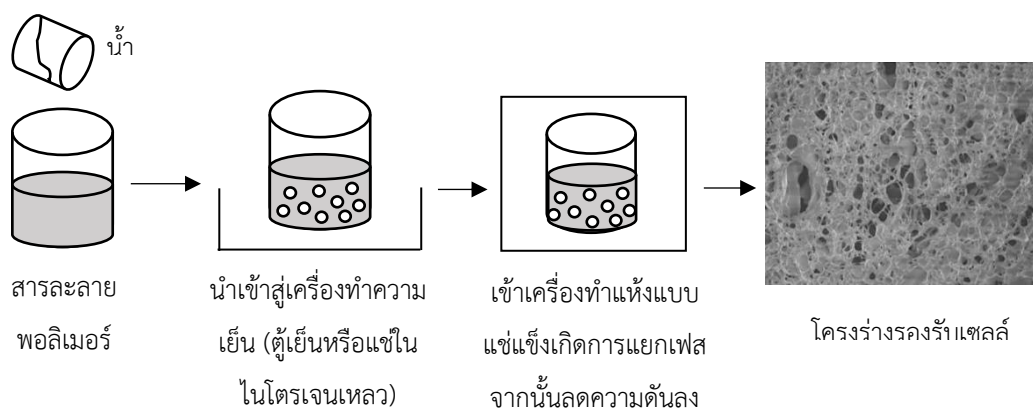


รูปที่ 2.13 กระบวนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยกระบวนการหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกล็ด [4]

2.4.1.2 กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze drying)

โครงร่างรูพรุนสามารถเตรียมได้โดยการทำแห้งด้วยความเย็น โดยอาศัยการแยกเฟสกันระหว่างน้ำและพอลิเมอร์ โดยกระบวนการจะเริ่มจากนำสารละลายพอลิเมอร์ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายไปแช่แข็งในตู้เย็นหรือแช่แข็งโดยไนโตรเจนเหลว (-96 องศาเซลเซียส) จากนั้นสารละลายพอลิเมอร์จะถูกลดอุณหภูมิให้น้ำนั้นเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง น้ำจะก่อตัวเป็นผลึกน้ำแข็ง หลังจากนั้นให้ทำการลดความดันในระบบลงให้ต่ำกว่าความดันไอเพื่อที่กำจัดผลึกน้ำแข็ง

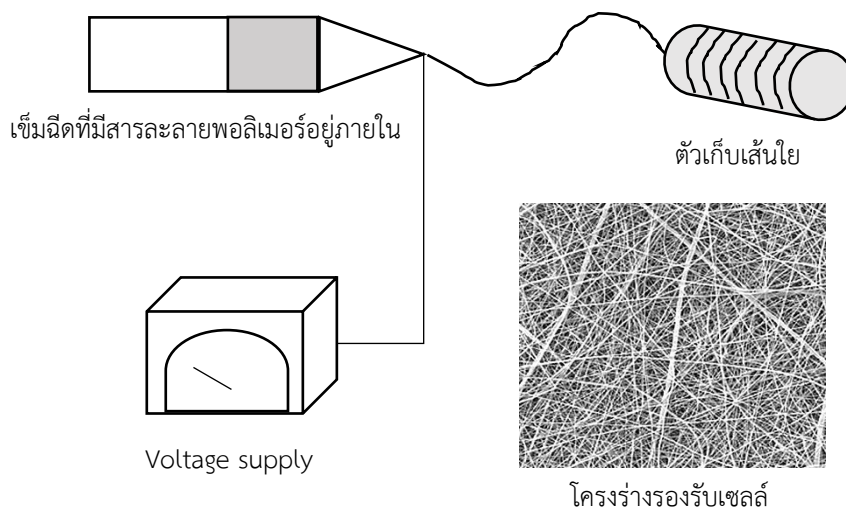
นั้นจนได้เป็นโครงร่างที่มีรูพรุนและมีการเชื่อมต่อระหว่างกันของรูพรุนภายใน [47] วิธีการทำแห้งแบบนี้ไม่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงและกระบวนการชะล้าง [46] กระบวนการนี้เป็นไปได้ที่จะได้โครงร่างรูพรุนที่มีขนาดรูพรุนตั้งแต่ 20 ถึง 200 ไมโครเมตร และความพรุนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ตามรายงานของ K. Whang et al. [50] ได้กล่าวไว้ว่าความเข้มข้นและความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์และปริมาณของน้ำที่กระจายในระบบมีผลต่อขนาดของรูพรุน เมื่อปริมาณน้ำลดลงขนาดรูพรุนโดยเฉลี่ยก็ลดลงเช่นกัน อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่ใช้ก็ส่งผลต่อความพรุน และขนาดของรูพรุนด้วยเช่นกันเพราะการเพิ่มความเข้มข้นนั้นจะทำให้น้ำไปสัมผัสกับเนื้อพอลิเมอร์ได้ลดลงทำให้โครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้มีความพรุนต่ำ และรูพรุนมีขนาดเล็กซึ่งไม่เหมาะสมกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ วิธีการขึ้นรูปโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งนั้นมีข้อดีตรงที่ ลดการใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษ, ใช้เวลาในการทำแห้งไม่นาน และหลีกเลี่ยงกระบวนการชะล้างสารจำพวกช่วยให้เกิดรูพรุน (porogen) แต่มีข้อจำกัดตรงที่กระบวนการนี้มีปัญหาในเรื่องของแรงตึงผิวระหว่างอิมัลชันของพอลิเมอร์และน้ำ จึงจำเป็นต้องเติมสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมเพื่อแก้ปัญหาดังนี้ สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้คือ waterborne polyurethane (WBPU) ในงานวิจัยของ X. Jiang et.al [51] ได้ศึกษาการเติม waterborne polyurethane (WBPU) ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันในการสร้างโครงร่างรูพรุนสามมิติที่ปราศจากสารพิษโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ผลที่ได้พบว่าการเติม waterborne polyurethane (WBPU) ลงไปช่วยทำให้เกิดการสร้างโครงร่างสามมิติที่มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น มีการเชื่อมต่อภายในโครงร่างได้มากยิ่งขึ้นกว่าเดิม และนอกจากนี้ waterborne polyurethane (WBPU) ยังช่วยให้ขนาดของรูพรุนที่ได้มีขนาดเล็กลง สามารถควบคุมขนาดของรูพรุนได้ และอาจเป็นวิธีที่ดีที่จะใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยตัวอย่างการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยวิธีทำแห้งแบบแช่แข็งนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 กระบวนการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์โดยกระบวนการ
ทำแห้งแบบแช่แข็ง [52]

2.4.1.3 การขึ้นรูปโดยการปั่นเป็นเส้นใย (electrospinning)

Q. P. Pham et.al [53] ได้กล่าวไว้ว่าการปั่นขึ้นรูป (Electrospinning) ถูกนำมาใช้ในการผลิตโครงสร้างรองรับเซลล์มาหลายทศวรรษ การปั่นขึ้นรูปเป็นเทคนิคการปั่นที่ใช้แรงไฟฟ้าสถิตเพื่อสร้างโครงสร้างรองรับเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย โดยการใช้การตั้งค่าเครื่องปั่นเส้นใยเช่น ตั้งค่าความเร็วรอบ ความเร็วในการฉีดยาเส้นใย เป็นต้น ค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในงานปั่นขึ้นรูปเป็นเส้นใยมีดังนี้ค่าสนามไฟฟ้า, อัตราการไหลของสารละลายพอลิเมอร์, ระยะห่างระหว่างเข็มและเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มที่ใช้ฉีดยาสารละลายพอลิเมอร์ และความเข้มข้นของสารละลาย โดยพารามิเตอร์เหล่านี้จะต้องควบคุม และควรระมัดระวังในกระบวนการผลิตเพราะอาจจะทำให้โครงสร้างรองรับเซลล์ที่ได้นั้นมีรูปร่างที่ไม่สมบูรณ์ได้ [54] กระบวนการปั่นด้วยเส้นใยจะเริ่มจากนำพอลิเมอร์ไปละลายให้เป็นสารละลายหรือนำไปให้ความร้อนให้อยู่ในรูปของพอลิเมอร์หลอมเหลว จากนั้นนำไปบรรจุลงในหัวฉีดที่มีปลายเข็มขนาดเล็ก โดยที่หัวเข็มจะต่ออยู่กับอุปกรณ์ที่เป็นวงจรไฟฟ้าความต่างศักย์สูง ปลายอีกด้านหนึ่งของวงจรไฟฟ้าจะเป็นเครื่องเก็บสะสมเส้นใยที่ปั่น หลังจากนั้นทำการฉีดยาเส้นใยไปเรื่อยๆ จนได้เป็นโครงสร้างที่เราต้องการดังรูปที่ 2.15 แต่จากการศึกษาวิจัยพบว่าการขึ้นรูปด้วยวิธีปั่นเส้นใยนี้มีข้อจำกัด และข้อควรคำนึงมากมายดังนี้

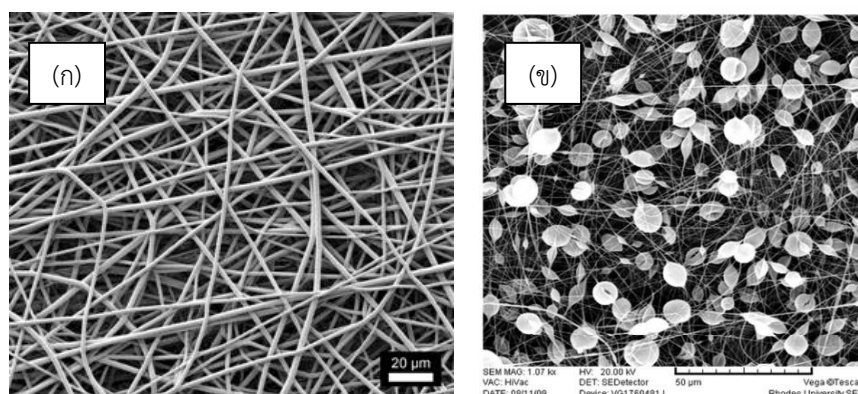


รูปที่ 2.15 กระบวนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์โดยกระบวนการปั่นขึ้นรูปด้วยเส้นใย [53]

(1) อิทธิพลของความต่างศักย์ที่ใช้ ตามรายงานของ A. Haider et al. [55] ได้กล่าวไว้ว่า ความต่างศักย์ที่ใช้ในกระบวนการปั่นด้วยเส้นใยนั้น จะขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์และการตั้งค่าของอุปกรณ์ ถ้าใช้ความต่างศักย์ที่สูงเกินไปจะส่งผลให้ขนาดของเส้นใยที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น และทำให้เกิดการก่อตัวของเม็ดเล็กๆ คล้ายลูกปัดบนเส้นใยทำให้เส้นใยมีผิวที่ขรุขระ ในทางตรงกันข้ามถ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำเกินไปจะส่งผลให้เกิดการตีกลับของแรงตึงผิวสารละลายทำให้ได้เส้นใยที่มีลักษณะเป็นปมปมบนเส้นใยเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.16

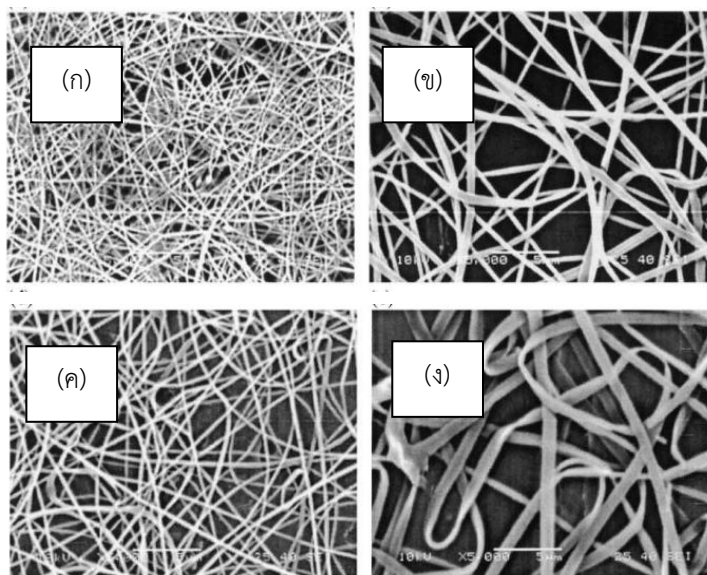
(2) อิทธิพลความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์และตัวทำละลายที่ใช้ ในงานวิจัยของ B. Tarus et.al [56] ได้ศึกษาพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ เซลลูโลสอะซิเตต (Cellulose acetate) และพอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinyl Chloride) ละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ acetone - dimethylacetamide (DMAc), acetone - dimethylformamide (DMF) และ Tetrahydrofuran (THF) ที่ความเข้มข้น 10, 12, 14 และ 16% w/v ตามลำดับ พบว่าเซลลูโลสอะซิเตต ที่ละลายใน DMF และ DMAc เมื่อความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ต่ำจะทำให้เส้นใยที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ดลูกปัดอยู่บนเส้นใย แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นเส้นใยที่ได้กลับเรียบ แต่ในทางตรงข้าม พอลิไวนิลคลอไรด์ที่ละลายใน Tetrahydrofuran (THF) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันกลับไม่เป็นผล ดังนั้น คือเส้นใยที่ได้มีผิวเรียบเหมือนกันในทุกๆ ความเข้มข้น ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการผลิตโดยกระบวนการปั่นเส้นใยนี้จะต้องเลือกตัวทำละลายและความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่เหมาะสม

เพื่อให้ได้เส้นใยที่ออกมาผิวเรียบตลอดทั้งเส้น ไม่มีการเกิดเป็นกลุ่มก้อนตามที่ได้อธิบายไปข้างต้นดังรูปที่ 2.16 นอกจากนี้ถ้าใช้สารละลายพอลิเมอร์ที่เจือจางมากทำให้มีปริมาณพอลิเมอร์ไม่เพียงพอ สารละลายที่ฉีดออกมาจะมีลักษณะเป็นหยดเล็กๆ แทน ในทางตรงกันข้ามเมื่อความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์สูง จะทำให้สารละลายมีความหนืดมากส่งผลต่อการไหลออกของสารละลายผ่านเข็มฉีด ทำให้การไหลไม่สม่ำเสมอและมีผลต่อขนาดเส้นใย เส้นใยที่ได้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ



รูปที่ 2.16 อิทธิพลของความความต่างศักย์ที่ใช้และอิทธิพลความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์และตัวทำละลายที่ใช้ต่อลักษณะของเส้นใยที่ฉีดได้ (ก) แสดงเส้นใยที่มีลักษณะผิวเรียบตลอดทั้งเส้นใย และ (ข) แสดงเม็ดกลมๆ คล้ายลูกปัดอยู่บนเส้นใย [57, 58]

(3) อิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีผลต่อขนาดของเส้นใย ตามการศึกษาของ A. Koski et.al [59] ทำการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีผลต่อขนาดของเส้นใย เมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นโครงสร้างของเส้นใยไม่เสถียรเกิดเป็นเม็ดลูกปัดบนผิวเส้นใย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยก็ใหญ่ขึ้นตามไปด้วย และถ้ายังมีความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์มากก็จะทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยกว้างขึ้นตาม รูปที่ 2.17 แสดงเส้นใยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดของเส้นใยมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดตามน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ใช้



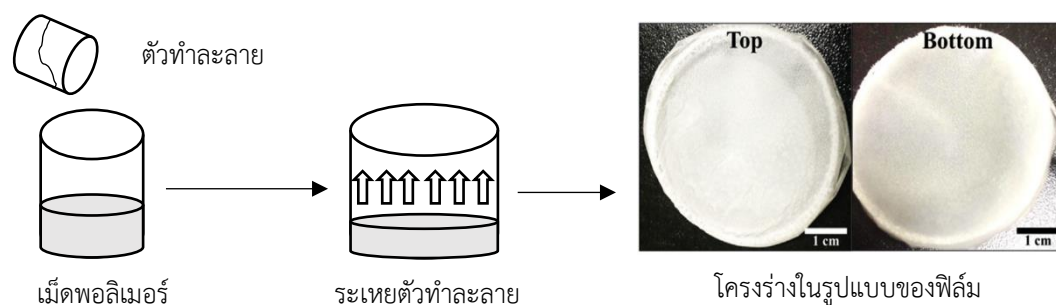
รูปที่ 2.17 ลักษณะของเส้นใยที่ได้เมื่อใช้พอลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นที่ต่างกัน (ก) และ (ข) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13,000– 23,000 กรัม/โมล ที่ความเข้มข้น 21 wt.%, 27 wt.% ตามลำดับ (ค) และ (ง) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000– 89,000 กรัมต่อโมลที่ความเข้มข้น 9 wt.%, 13 wt.% ตามลำดับ [59]

จากข้อจำกัดที่ได้กล่าวไปข้างต้นนั้น สามารถสรุปได้ว่าในกระบวนการขึ้นรูปด้วยเส้นใยนั้น ควรคำนึงถึง น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้, ตัวทำละลายที่จะใช้ในการละลาย, ความเข้มข้นของสารละลาย และพารามิเตอร์อื่นๆ ของอุปกรณ์เครื่องมือ ดังนั้นกระบวนการปั่นด้วยเส้นใยถึงจะมีกระบวนการที่ง่ายก็จริงแต่มีข้อควรระวังมากมายในกระบวนการผลิต

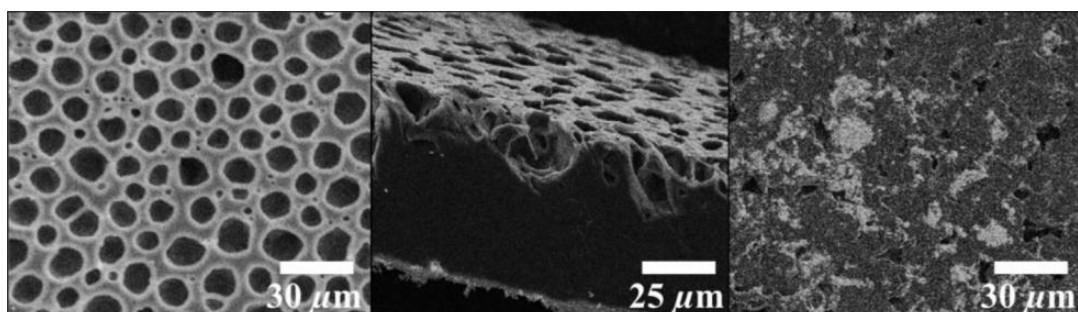
2.4.1.4 การหล่อขึ้นรูปโดยการใส่ตัวทำละลาย (solvent casting)

การหล่อตัวทำละลายสำหรับการเตรียมโครงร่างสามมิตินั้นเป็นวิธีที่ง่ายมากและไม่แพง ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ขนาดใหญ่ เพราะกระบวนการจะขึ้นอยู่กับการระเหยของตัวทำละลายที่ใช้ โดยกระบวนการจะเริ่มจากการนำเม็ดพอลิเมอร์ไปละลายในตัวทำละลายอินทรีย์จนได้เป็นสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน และจะต้องมีความหนืดที่เหมาะสมด้วย หลังจากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงไปบนแม่พิมพ์เป็นแม่พิมพ์แก้วหรืออะลูมิเนียมก็ได้ ตัวทำละลายในสารละลายพอลิเมอร์ก็จะระเหยออกไปจนได้เป็นโครงร่างสามมิติออกมาดังรูปที่ 2.18 แต่มีข้อควรคำนึงคือจะต้องเลือกชนิดของพอลิเมอร์ที่มีความสามารถในการละลายได้ใกล้เคียงกับตัวทำละลาย ดังเช่นพอลิไวนิลอิตเตตละลายได้ดีในโทลูอีน, พอลิไวนิลคลอไรด์ละลายได้ดีในเบนซีน และยางธรรมชาติละลายได้ดีในไซโลเฮกเซน เป็นต้น แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียควรพิจารณาคือ การนำตัวทำละลายอินทรีย์มาใช้นั้นอาจจะก่อให้เกิดอันตราย

ต่อการนำโครงสร้างสามมิติไปใช้ในอนาคตถ้าทำการระเหยออกไม่หมด โครงร่างที่ได้จะมีความเป็นพิษ เพื่อแก้ไขปัญหานี้มีนักวิจัยมากมายได้ทำการศึกษา และเสนอว่าควรระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในระบบสุญญากาศเพื่อที่จะกำจัดตัวทำละลายออกให้หมด แต่ทั้งนี้ก็ต้องมีการเสียค่าใช้จ่ายเพิ่ม การขึ้นรูปด้วยกระบวนการนี้นิยมขึ้นรูปเป็นโครงสร้างสองมิติแบบฟิล์มมากกว่าที่จะทำให้เป็นโครงสร้างที่มีรูพรุน [60] ดังเช่นในงานวิจัยของ Z.G. Tang et.al [61] ได้ทำการผลิตฟิล์มจากพอลิเมอร์ชนิดพอลิคาโปลาแลคโตนจากการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ชนิดคือ Chloroform, Tetrahydrofuran, Acetone และ Ethyl acetate พบว่าโครงสร้างที่ได้เป็นโครงสร้างสองมิติที่มีความขรุขระบนผิวหน้าทั้งนี้สามารถนำไปเลี้ยงเซลล์ได้เช่นกัน แต่จะต้องทำการระเหยตัวทำละลายออกไปให้หมดก่อนตั้งคำแนะนำข้างต้น ผลของฟิล์มที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.18 กระบวนการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์โดยกระบวนการหล่อ
ขึ้นรูปโดยใช้ตัวทำละลาย [61]

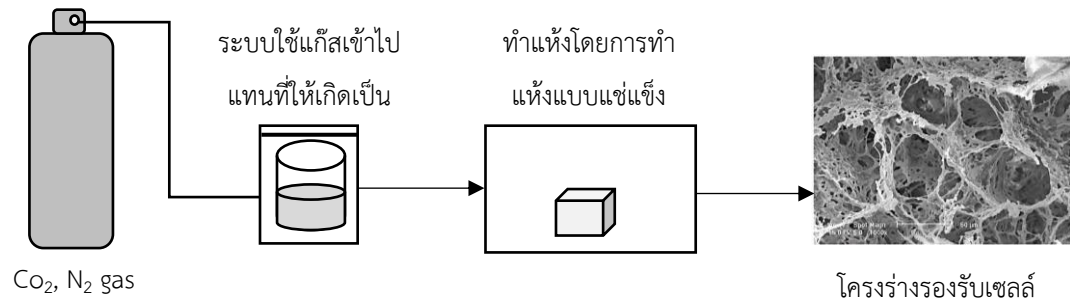


รูปที่ 2.19 โครงสร้างจุลภาคของฟิล์มพอลิคาโปลาแลคโตน โดยแสดงในส่วน of top surface, cross section และ bottom surface ตามลำดับ [62]

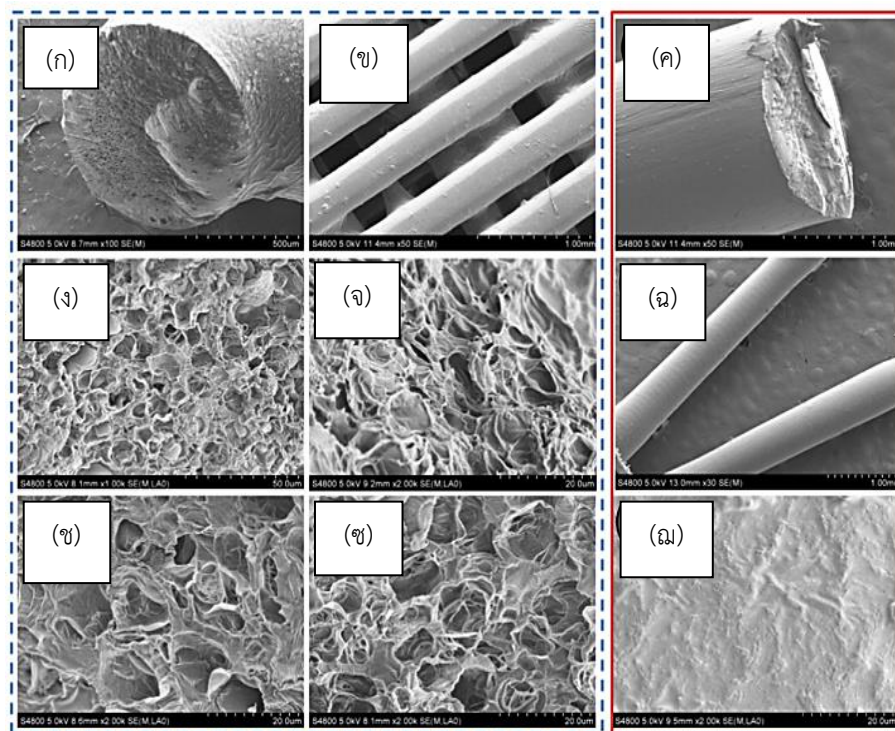
2.4.1.5 การขึ้นรูปโดยการใส่โฟมแก๊ส (Gas foaming)

T. Weigel et.al [63] ได้ให้ข้อมูลไว้ว่ากระบวนการโฟมแก๊สนิยมใช้กับพอลิเมอร์ชนิดเทอร์โมพลาสติก เป็นวิธีที่ใช้บ่อยในการผลิตวัสดุพอร์นโดยจะมีการใช้แก๊สหรือของเหลวเป็นตัวแทนทำให้เกิดฟองเช่น น้ำ และโซเดียมไบคาร์บอเนต เป็นการผลิตโดยไม่ใช้ตัวทำละลายสารอินทรีย์ วิธีนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และก๊าซไนโตรเจนซึ่งถูกจัดว่าเป็นก๊าซเฉื่อยมักถูกใช้เป็นก๊าซในระบบ ตามการศึกษาของ F. Dehghani et.al [64] สำหรับการก่อตัวของพอลิเมอร์โฟม ขนาดของรูพอร์นที่ได้จากกระบวนการนี้มีขนาดประมาณ 100 ไมโครเมตร และสามารถสร้างรูพอร์นได้มากถึง 93 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการจะเริ่มจากระบบทางอุณหพลศาสตร์จะปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือไนโตรเจน เข้าไปในสารละลายพอลิเมอร์อย่างรวดเร็วจนเกิดการตกผลึกและมีเติบโตของฟองก๊าซในสารละลายพอลิเมอร์ โครงสร้างรูพอร์นของพอลิเมอร์จะเกิดขึ้นตรงขั้นตอนการกระจายแก๊สซึ่งจะเรียกว่า “เฟสไม่ต่อเนื่อง” จะเข้าไปแทรกตัวในเนื้อพอลิเมอร์ที่เราเรียกว่า “เฟสต่อเนื่อง” หลังจากนั้นจะอาศัยการทำแห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งจนได้เป็นโครงร่างสามมิติออกมา วิธีการนี้มีความเสถียรทางจลนศาสตร์ต่ำ เนื่องจากมีความแตกต่างกันอย่างมากระหว่างความหนาแน่นของก๊าซและของเหลว เฟสของของเหลวมีแนวโน้มที่จะไหลลงไปที่ด้านล่างในขณะที่ก๊าซไหลขึ้นไปอยู่ด้านบน ซึ่งนำไปสู่การก่อตัวของโฟมที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน และอาจจะทำให้เกิดเป็นรูพอร์นแค่เพียงผิวด้านบนเท่านั้น จึงจำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นเพื่อรักษาเสถียรภาพของโฟมที่เกิดขึ้นและช่วยป้องกันการระบายน้ำที่ทำให้เกิดการรวมกันของฟอง หรือควรควบคุมพารามิเตอร์ดังนี้เพื่อเพิ่มความเสถียรของโฟม ประการแรกเพิ่มความหนืดของสารละลาย, ประการที่สองใช้พอลิเมอร์ซึ่งผ่านการทำให้แข็งตัวอย่างรวดเร็วตามอุณหภูมิ และประการที่สามคือเพิ่มพอลิเมอร์ตัวอื่นลงไปเพื่อทำให้เกิดการเชื่อมโยง (crosslinker) เป็นต้น กระบวนการขึ้นรูปโดยการใส่โฟมแก๊สเป็นไปดังรูปที่ 2.20

C. Zhou et.al [65] ได้ศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการออกแบบและการสร้างที่มีโครงสร้างแบบ microporous โดยมีขนาดรูพอร์นตั้งแต่ 100 – 800 ไมโครเมตร โดยใช้เทคนิคในการขึ้นรูปสองวิธีคือการขึ้นรูปโดยการปริ้นสามมิติ (3D printing) และการขึ้นรูปโดยการใส่โฟมแก๊ส สาเหตุที่ใช้ร่วมกันเพราะต้องการโครงร่างที่มีรูพอร์นอยู่ในของโครงร่างที่พิมพ์ได้จึงต้องนำกระบวนการโฟมแก๊ส มาช่วยให้เกิดรูพอร์นนั่นเอง ดังรูปที่ 2.21 เปรียบเทียบโครงสร้างจุลภาคก่อนใช้โฟมแก๊ส และหลังใช้โฟมแก๊สซึ่งจะเห็นได้ว่าโครงร่างที่ได้มีรูพอร์นภายในมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการขึ้นรูปนี้มักนิยมใช้ร่วมกับกระบวนการขึ้นรูปอื่นเพื่อให้ได้โครงร่างรูพอร์นที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น



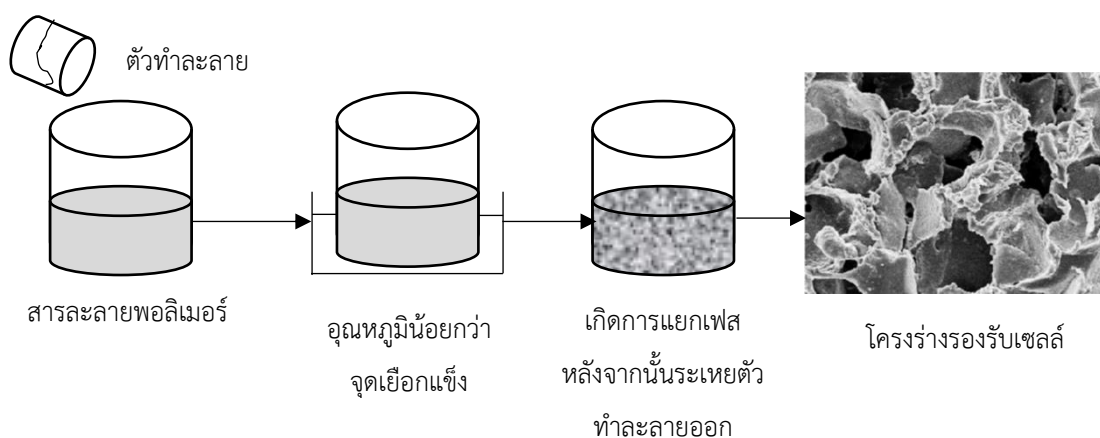
รูปที่ 2.20 กระบวนการขึ้นรูปโดยใช้โฟมแก๊ส [64]



รูปที่ 2.21 โครงสร้างจุลภาคเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังใช้กระบวนการขึ้นรูปโดยโฟมแก๊ส
 (ก, ข, ค, ง, จ และ ฉ) หลังใช้กระบวนการโฟมแก๊สได้ผิวที่มีความพรุนมากขึ้น
 และ (ช, ซ และ ฌ) ก่อนใช้กระบวนการโฟมแก๊สจะสังเกตเห็นว่าไม่มีความพรุนอยู่เลย [65]

2.4.1.6 การขึ้นรูปโดยการแยกเฟสโดยการเหนี่ยวนำความร้อน (Thermally-induced phase separation (TIPS))

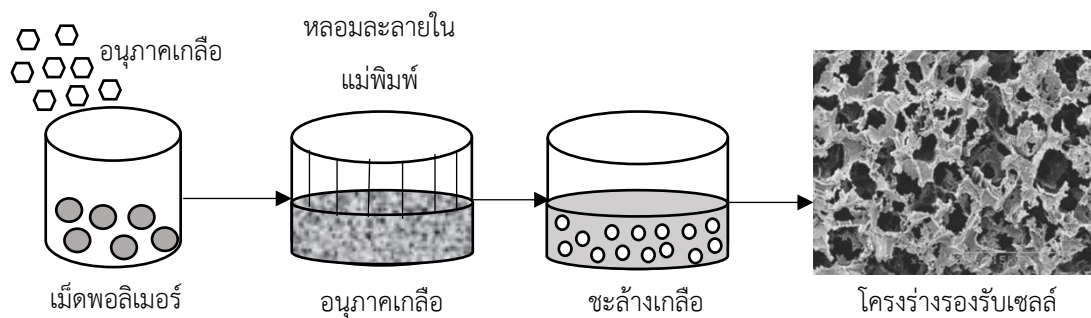
การแยกเฟสแบบเหนี่ยวนำความร้อน (TIPS) ขึ้นอยู่กับความสามารถในการชุบ (quenching) สารละลายพอลิเมอร์ภายใต้จุดเยือกแข็ง (TK) และการชักนำของเฟสการแยกของเหลวกับของเหลว (liquid-liquid separation) โดยเฟสในการขึ้นรูปแบ่งออกเป็น 2 เฟสคือ polymer-rich phase และ a polymer-poor phase ซึ่ง polymer rich phase จะเป็นเฟสของของแข็ง ในขณะที่ polymer-poor phase เป็นเฟสของการตกผลึก หลังจากนั้นเฟสที่ตกผลึกจะถูกกำจัดออกจนทำให้ได้เป็นโครงร่างที่มีรูพรุนเทคนิคนี้สามารถโครงร่างที่ได้อาจมีความพรุนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการจะเริ่มจากละลายเม็ดพอลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำอุณหภูมิของสารละลายให้น้อยกว่าอุณหภูมิของจุดเยือกแข็ง จากนั้นจะเกิดการแยกเฟสและตกผลึก จากนั้นนำโครงร่างที่ได้ไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกจนได้เป็นโครงร่างรองรับเซลล์ดังรูปที่ 2.22 ตามรายงานของ A. S. Rowlands et.al [66] กล่าวไว้ว่าโครงร่าง 3 มิติ ที่ได้จากกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวทำละลาย, อุณหภูมิในการชุบและอัตราเร็วในการชุบ อุณหภูมิในการชุบและอัตราเร็วในการชุบมีผลต่อกระบวนการตกผลึกของสารละลายพอลิเมอร์ ถ้าอุณหภูมิต่ำจะทำให้รูพรุนที่ได้มีขนาดเล็ก แต่ถ้าอุณหภูมิสูงรูพรุนที่ได้จะมีขนาดใหญ่ ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่สูงกว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายนำไปสู่การก่อตัวของผลึกที่ต่ำทำให้รูพรุนมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นความหนืดของสารละลายจะเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการก่อตัวของผลึกขนาดใหญ่ทำให้โครงสร้าที่ได้มีรูพรุนขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคการแยกเฟสโดยการเหนี่ยวนำความร้อน มันเป็นเรื่องยากที่จะสร้างโครงร่างที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 200 ไมโครเมตร โดยทั่วไปขนาดของรูพรุนโครงร่างที่ได้มักจะจำกัด และทำได้ยากในขั้นตอนของการขึ้นรูป [4]



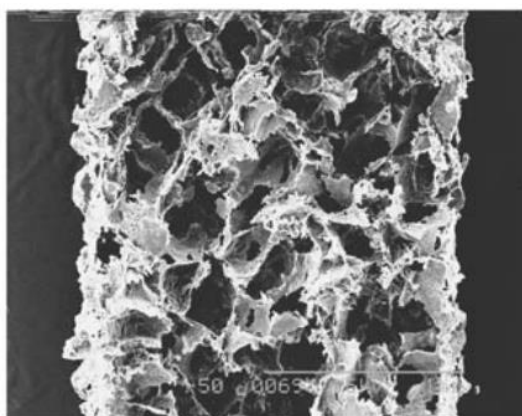
รูปที่ 2.22 กระบวนการขึ้นรูปโดยใช้การแยกเฟสโดยการเหนี่ยวนำความร้อน [4]

2.4.1.7 การขึ้นรูปโดยการหลอมเหลว (Melt moulding)

การขึ้นรูปโดยการหลอมเหลว จะเป็นการหลอมละลายพอลิเมอร์โดยใช้ความร้อน แล้วทำให้พอลิเมอร์ที่ถูกหลอมนั้นแข็งตัวภายในแม่พิมพ์ที่ได้จัดเตรียมไว้ ซึ่งการขึ้นรูปด้วยเทคนิคนี้ต้องใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าเพื่อให้เกิดรูพรุนภายในโครงสร้าง กระบวนการจะเริ่มจากการผสมพอลิเมอร์เหลวและอุณหภูมิของเกลือในแม่พิมพ์จากนั้นให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิหลอมเหลวของพอลิเมอร์โดยอุณหภูมิที่เลือกใช้จะต้องไม่หลอมละลายไปกับเนื้อพอลิเมอร์ เมื่อให้อุณหภูมิไปเรื่อยๆ อุณหภูมิของเกลือจะเกิดการกระจายตัวออกไปทั้งแม่พิมพ์ จนกระทั่งพอลิเมอร์หลอมละลายจนหมดก็ทำการชะล้างเกลือออกก็จะได้เป็นโครงสร้างที่มีรูพรุนออกมาดังรูปที่ 2.23 เทคนิคชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ควรเป็นชนิดเทอร์โมพลาสติกหรือพอลิเมอร์ที่สามารถหลอมละลายได้เมื่อเจอความร้อนและไม่เกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมเหลวของตัวมัน [16] ตามรายงานของ B. Subia et.al [60] กล่าวไว้ว่าแม่พิมพ์ที่ใช้ในกระบวนการขึ้นรูปนี้มักใช้แม่พิมพ์ชนิดเทฟลอนซึ่งเป็นแม่พิมพ์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ ในงานวิจัยของ S. H. OH et.al [67] ทำการสร้างโครงสร้างรองรับเซลล์จาก PLGA/PVA แบบไม่ใช้ตัวทำละลายโดยอาศัยการขึ้นรูปแบบการหลอมเหลวกับการชะล้างเกลือมาใช้ในการสร้าง มีการนำอุณหภูมิของเกลือชนิดโซเดียมคลอไรด์มาใช้เพื่อเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ผู้วิจัยได้สังเกตเห็นว่าการใช้เทคนิคชะล้างเกลืออย่างเดียวนั้นต้องอาศัยตัวทำละลายในการละลายเม็ดพอลิเมอร์ และคำนึงถึงความปลอดภัยต่อการนำไปใช้งานในกรณีที่ไม่สามารถระเหยออกได้หมด จึงได้ใช้เทคนิคหลอมเหลวในแม่พิมพ์เข้ามาช่วยแก้ปัญหาตรงนี้ ซึ่งผลที่ได้พบว่าสามารถสร้างรูพรุนได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นรูพรุนแบบเปิด ขนาดรูพรุนที่ได้ประมาณ 200 – 300 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 2.24 พบว่ารูพรุนที่ได้มีรูปร่างเป็นไปตามรูปร่างของอนุภาคเกลือที่ใช้ การเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับหนึ่งและมีความปลอดภัยเพราะปราศจากการใช้สารเคมี แต่ทั้งนี้ก็มีข้อจำกัดอยู่บางประการคือเทคนิคนี้ไม่สามารถสร้างโครงสร้างที่มีรูพรุนด้วยตัวเองได้จำเป็นจะต้องใช้เทคนิคอื่นมาช่วยทำให้เกิดรูพรุนซึ่งมักจะใช้คู่กับเทคนิคการชะล้างเกลือ เป็นเทคนิคที่จำกัดชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้คือต้องใช้พอลิเมอร์ชนิดเทอร์โมพลาสติกเท่านั้น เพราะเป็นพอลิเมอร์ชนิดที่สามารถหลอมละลายได้เมื่อได้รับความร้อน การเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุนนั้นไม่ดีเท่าที่ควรซึ่งอาจจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ในกรณีที่ชำระเกลือออกไม่หมดอาจทำให้เกิดการตกค้างของอนุภาคเกลือได้รูปร่างของรูพรุนเป็นไปตามรูปร่างของอนุภาคเกลือที่ใช้ และเป็นเทคนิคที่ใช้พลังงานความร้อนสูงส่งผลให้สิ้นเปลืองพลังงานได้ [60, 68]



รูปที่ 2.23 กระบวนการขึ้นรูปโดยใช้การแยกเฟสโดยการหลอมเหลว [4]



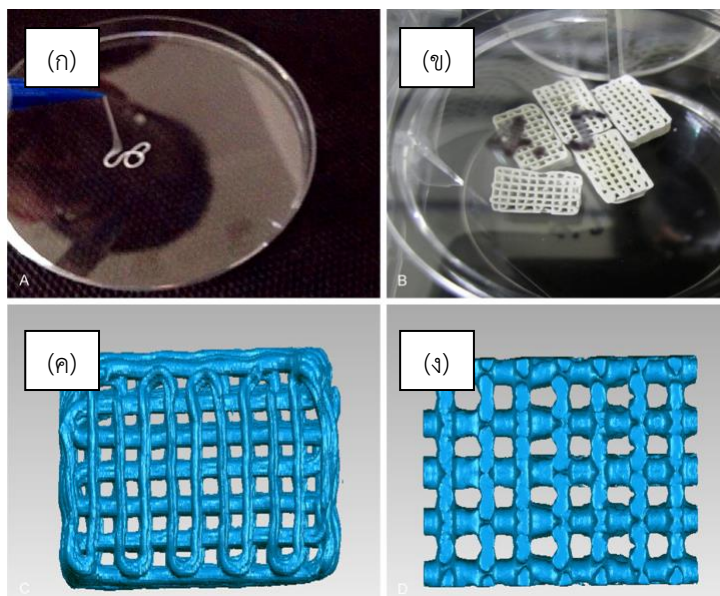
รูปที่ 2.24 โครงสร้างจุลภาคของโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ได้จากกระบวนการชะล้างเกลือและ
การหลอมเหลว สังเกตได้ว่ารูพรุนที่ได้มีรูปร่างเป็นไปตามรูปร่าง
ของอนุภาคเกลือที่ใช้ [68]

2.4.1.8 การขึ้นรูปโดยการสร้างต้นแบบ (Rapid prototyping)

ตามรายงานของ R. Pelzer et.al [69] กล่าวว่าโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ดีนั้นควรที่จะควบคุมการเชื่อมต่อกันภายในของรูพรุนได้ ดังนั้นจึงได้เสนอวิธีการขึ้นรูปแบบการสร้างต้นแบบขึ้นมา โดยกระบวนการขึ้นรูปแบบสร้างต้นแบบนี้ปกติแล้วประยุกต์ใช้กระบวนการขึ้นพิมพ์ขึ้นรูปแบบ 3 มิติ มาร่วมด้วยซึ่งกระบวนการสร้างต้นแบบจะเริ่มจากรวบรวมข้อบกพร่องต่างๆของผู้ป่วย จากนั้นทำการสร้างโครงร่าง 3 มิติโดยออกแบบรูปร่าง และรูปทรงผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์จากนั้นทำการแปลงเป็นไฟล์ Standard triangulated language (STL) จากนั้นก็จะอาศัยกระบวนการปรี้นขึ้นรูปดังกล่าวเข้ามาร่วม จนได้เป็นโครงสร้างรองรับเซลล์ออกมา สรุปคือกระบวนการสร้างต้นแบบ (Rapid prototyping) เป็นแค่เพียงกระบวนการที่ใช้สร้างต้นแบบโครงร่าง 3 มิติ ตามที่ผู้ใช้งานต้องการ

เท่านั้น แต่ถ้าต้องการขึ้นรูปเป็นชิ้นงานนั้นจะต้องอาศัยกระบวนการพิมพ์ขึ้นรูปแบบ 3 มิติ เข้ามาขึ้นรูปให้

(1) การพิมพ์ขึ้นรูปแบบ 3 มิติ กระบวนการนี้สร้างชิ้นงานโดยกระบวนการพิมพ์แบบเลเยอร์ (Parts by a layered) โดยการยึดเกาะระหว่างชั้นนั้นจะใช้วัสดุผงในการเชื่อมต่อ ซึ่งหลังจากโหลดไฟล์ STL เป็นไฟล์ที่ได้ทำการกำหนดรูปทรง และรูปทรงที่มีเชื่อมต่อกันแล้วเครื่อง Rapid Prototyping จะตัดข้อมูลสามมิติเป็นภาพสองมิติตามพื้นที่หน้าตัดของชิ้นงาน แล้วเครื่องก็จะทำการปริ้นชิ้นงานออกมาจนได้เป็นรูปร่างรูปทรงตามที่เราต้องการ กระบวนการพิมพ์นี้ต้องใช้วัสดุผงที่เฉพาะเจาะจงแล้วมีขนาดที่เหมาะสมต่อการเชื่อมต่อ งานวิจัยของ H. Y. He et.al [70] ได้ศึกษาการสร้างโครงสร้างรองรับเซลล์จากกระบวนการ Rapid Prototyping และ 3D printing จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยเริ่มจากการเขียนแบบที่ต้องการจากนั้นแปลงให้เป็นไฟล์ STL จากนั้นป้อนข้อมูลเข้าสู่เครื่องปริ้นสามมิติ ผสมพอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับวัสดุผง ซึ่งผงที่ใช้เป็นตัวประสานระหว่างชั้นคือ Sic ceramic powder นำวัสดุผสมใส่ไปในเครื่องปริ้นสามมิติ จากนั้นก็จะเริ่มพิมพ์เป็นรูปร่างตามที่ได้ป้อนข้อมูลไว้ขึ้นลงไปตามแกน X-Y พบว่าโครงสร้างที่ได้นั้นมีความปลอดภัยไม่เป็นพิษ มีรูปทรงกระจายอยู่ทั่วทั้งชิ้นงาน และมีการเชื่อมต่อกันระหว่างรูปทรงที่ดีมาก ซึ่งตัวอย่างกระบวนการขึ้นรูป และโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ได้จากกระบวนการนี้เป็นไปตามรูปที่ 2.25 และรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 กระบวนการขึ้นรูป และโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้ (ก) ภาพที่ได้จากการออกแบบผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์, (ข) โครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้, (ค) ภาพถ่ายโดยกล้องจุลทรรศน์ของโครงร่างรองรับเซลล์ และ(ง) โครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด [63]

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเป็นได้ว่าเทคนิคการสร้างรูปแบบนี้มีข้อเสียบางประการดังนี้ เป็นเทคนิคที่ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการอื่นไม่สามารถสร้างโครงร่างสามมิติได้ด้วยตัวเอง ต้องใช้ผงที่มีความจำเพาะเจาะจงในการเชื่อมระหว่างชั้นของโครงร่างที่ปริ้นได้ และอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง เป็นต้น [63]

จากข้อดีและข้อเสียของการขึ้นรูปโดยใช้เทคนิคดั้งเดิมที่กล่าวไปข้างต้น สามารถสรุปข้อได้เปรียบและข้อบกพร่องต่างๆ [71, 72] ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของกระบวนการขึ้นรูปแบบดั้งเดิม

กระบวนการขึ้นรูป (Manufacturing Method)	ข้อได้เปรียบ (Benefits)	ข้อเสียเปรียบ (Limitations)
กระบวนการหล่อด้วยตัวทำละลายและชำระล้างด้วยเกลือ (Solvent casting/particulate leaching)	<ul style="list-style-type: none"> • โครงสร้างที่ได้มีความพรุนสูงถึง 93 เปอร์เซ็นต์ • สามารถควบคุมรูปร่างและขนาดของรูพรุนได้จากรูปร่างของเกลือที่ใช้ 	<ul style="list-style-type: none"> • ยากที่จะสร้างโครงสร้างที่มีความหนาแน่นมากกว่า 3 มิลลิเมตร ขึ้นไป • อาจเกิดอันตรายจากตัวทำละลายอินทรีย์ และอนุภาคของเกลือที่หลงเหลืออยู่ในโครงสร้างในกรณีที่กำลังจัดออกไม่หมด
กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze drying)	<ul style="list-style-type: none"> • ไม่จำเป็นต้องใช้สารช่วยก่อให้เกิดรูพรุน • ตัวทำละลายอินทรีย์ไม่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการละลายเม็ดพอลิเมอร์ 	<ul style="list-style-type: none"> • สารลดแรงตึงผิวเป็นที่ต้องการในกระบวนการนี้ • ขนาดของรูพรุนที่ได้มีขนาดเล็กมาก • ระยะเวลาในการขึ้นรูปค่อนข้างนาน
การขึ้นรูปโดยการปั่นเป็นเส้นใย (Electrospinning)	<ul style="list-style-type: none"> • สามารถผลิตโครงสร้างที่มีพื้นผิวขนาดใหญ่ได้ทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ในจำนวนมาก • เทคนิคที่ง่ายและราคาไม่แพง 	<ul style="list-style-type: none"> • ตัวทำละลายอินทรีย์อาจจำเป็นต้องใช้ในกระบวนการซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ • มีสมบัติทางกลที่จำกัด • มีความลำบากในการควบคุมค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของอุปกรณ์ที่ใช้
การขึ้นรูปโดยใช้โฟมแก๊ส (Gas foaming)	<ul style="list-style-type: none"> • เป็นขึ้นรูปกระบวนการที่ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 	<ul style="list-style-type: none"> • ใช้แรงดันสูงในกระบวนการขึ้นรูป • ยากในการควบคุมความหนาแน่นของแก๊สเนื้อเยื่อที่ใช้

กระบวนการขึ้นรูป (Manufacturing Method)	ข้อได้เปรียบ (Benefits)	ข้อเสียเปรียบ (Limitations)
การหล่อขึ้นรูปโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent casting)	<ul style="list-style-type: none"> ● เป็นกระบวนการที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ใดๆ 	<ul style="list-style-type: none"> ● กระบวนการเกี่ยวข้องโดยตรงกับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และยากที่จะระเหยออกให้หมด ● โครงร่างที่ได้มักอยู่ในรูปของฟิล์ม ไม่นิยมสร้างเป็นโครงร่างที่มีรูพรุน
การขึ้นรูปโดยการแยกเฟสโดยการเหนี่ยวนำความร้อน (Thermally-induced phase separation (TIPS))	<ul style="list-style-type: none"> ● เป็นเทคนิคที่หลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ● สามารถขึ้นรูปพร้อมกับเทคนิคอื่นได้ 	<ul style="list-style-type: none"> ● ขนาดของรูพรุนที่ได้มีขนาดเล็ก นำไปใช้งานได้จำกัด ● ยากที่จะสร้างโครงร่างที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 200 ไมโครเมตร
การขึ้นรูปโดยการหลอมเหลว (Melt moulding)	<ul style="list-style-type: none"> ● สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของรูพรุนได้ 	<ul style="list-style-type: none"> ● ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงในการหลอมเหลวพอลิเมอร์ ● ต้องใช้ตัวช่วยที่ทำให้เกิดรูพรุนเช่น อนุภาคของเกลือ
การขึ้นรูปโดยการสร้างต้นแบบ (Rapid prototyping)	<ul style="list-style-type: none"> ● ได้รูปทรง 3 มิติ ที่ซับซ้อน มีความละเอียดสูง ควบคุมขนาดของรูพรุนได้ ● สามารถทำการดัดแปลงหรือปรับปรุงโครงสร้างภายในของโครงร่างได้ง่าย 	<ul style="list-style-type: none"> ● ต้องใช้เทคนิคอื่นมาช่วยในการขึ้นรูป ● ค่าติดตั้งเครื่อง และอุปกรณ์มีราคาสูงมาก

2.5. ทฤษฎีของการเกิดฟองและทฤษฎีของไมโครบับเบิล

2.5.1 การเกิดฟอง (Bubble generation)

โดยทั่วไปแล้วนั้นอุปกรณ์ที่ใช้ในการกำเนิดฟองจะอยู่ในรูปทรงกระบอกกลวงที่มีช่องว่างด้านล่างสำหรับเป็นทางให้อากาศผ่านเข้าไปในท่อนั้น ซึ่งเมื่อเราทำการเติมของเหลวไม่ว่าจะเป็นน้ำ สารละลาย หรือไม่ว่าอะไรก็ตามที่อยู่ในรูปของของไหลลงไปในท่อทรงกระบอกนั้นแล้วทำการปล่อย อากาศผ่านช่องว่างดังกล่าวก็จะทำให้เกิดฟองขึ้นภายในท่อทรงกระบอก โดยเราจะเรียกท่อ ทรงกระบอกนั้นว่า “Bubble column” ในปัจจุบันได้มีการนำ Bubble column มาใช้ในชีวิตประ จำวันมากมายดังเช่น ใช้เป็นเครื่องปฏิกรณ์ในงานทางด้านเคมี, ใช้ในงานปิโตรเลียม, ด้านชีวเคมี, บำบัดน้ำเสีย และอุตสาหกรรมโลหะเป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบ Bubble column กับเครื่องปฏิกรณ์ อื่นๆ พบว่ามีข้อได้เปรียบตรงที่มีสมบัติการถ่ายเทความร้อนและถ่ายเทมวลที่ดีเยี่ยม มีค่าการบำรุง และค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานต่ำ ซึ่งขนาดของฟองที่เกิดขึ้นนั้นจะขึ้นอยู่กับขนาดของตัวกลางที่เรา ทำการผ่านอากาศเข้าไป โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดฟองและขนาดของฟอง [73] มีดังนี้

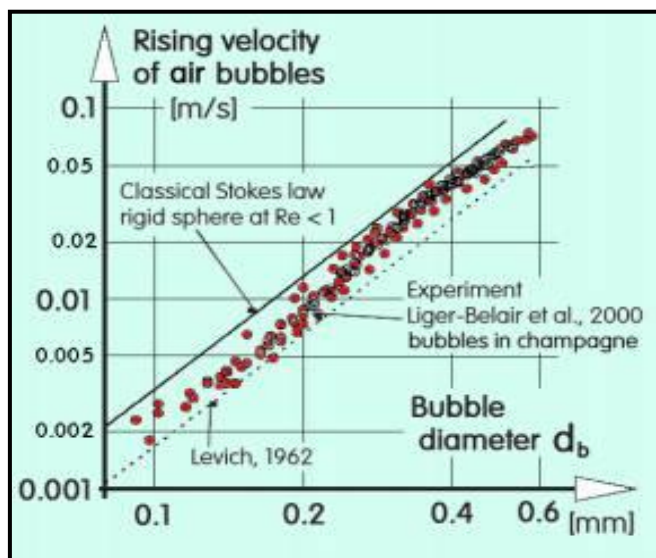
2.5.1.1 ความหนืดและแรงตึงผิวของของเหลว เกิดแรงตึงดูระหว่างกัน เป็นลักษณะของ ของเหลวที่ยึดเกาะอยู่บนผิวของของแข็ง (Wetting Force) ทำให้เกิดผิวที่มีลักษณะโค้งนูนขึ้นมา เกิด เป็นฟองบนพื้นผิวที่มีลักษณะแข็งกว่า [73]

2.5.1.2 แรงลอยตัว (Buoyant Force) เกี่ยวข้องกับความหนาแน่นของของเหลว ของเหลวที่ มีความหนาแน่นสูง จะทำให้ขนาดของฟองที่ได้เล็กลง [73]

2.5.1.3 อัตราการไหลเข้าของแก๊ส (Gas Phase) ถ้ามีแก๊สไหลเข้ามาอย่างรวดเร็วขนาดของ ฟองที่ได้จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและกว้างขึ้น แรงลอยตัวก็จะเพิ่มขึ้น ซึ่งจะต้องเกิดฟองบนพื้นผิวที่ไม่ชอบ น้ำ (Hydrophobic) [73]

2.5.2. ความเร็วในการลอยตัวของฟอง (Bubble rise velocity)

เป็นตัวแปรที่บอกถึงความสามารถในการลอยตัวของฟองในขณะที่อยู่คอลัมน์ ซึ่งปัจจัยที่ ส่งผลต่อการลอยตัวของฟอง เช่น ขนาดและรูปร่างของฟอง คือเมื่อฟองมีขนาดเพิ่มมากขึ้นใหญ่ขึ้น ความเร็วในการลอยตัวจะลดลง ดังรูปที่ 2.27 เป็นรูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของฟองและ ความเร็วในการลอยตัวของฟองพบว่าความเร็วในการลอยตัวจะเพิ่มขึ้นตามขนาดฟองที่เพิ่มขึ้น จึง สามารถคาดเดาได้ว่าการถ่ายโอนโมเมนตัมของฟองค่อนข้างจะคงที่ [73]



รูปที่ 2.27 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการลอยตัวของฟองกับขนาดของฟองที่เกิดขึ้นตามทฤษฎีของ Levich [73]

2.5.3. รูปแบบการไหลของฟองในบับเบิลคอลัมน์

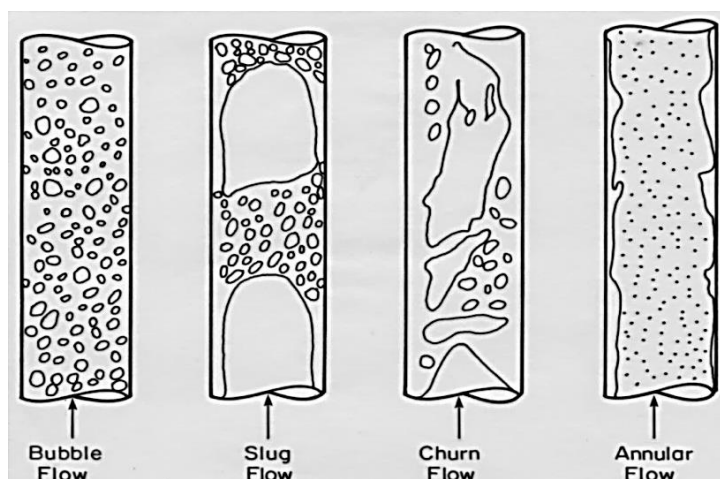
รูปแบบการไหลของบับเบิลคอลัมน์สามารถแยกได้ตาม ความเร็วเฉลี่ยของก๊าซ (Superficial gas velocity) ที่ไหลผ่านดิฟฟิวเซอร์ซึ่งก็คือ ปริมาณอัตราการไหลของแก๊สหารด้วยพื้นที่หน้าตัดของบับเบิลคอลัมน์ รูปแบบการไหลที่สามารถพบได้ทั่วไปมี 3 แบบ คือ homogeneous (bubbly flow) regime , heterogeneous (churn-turbulent) regime and slug flow regime [74] ดังแสดงในรูปที่ 2.28

2.5.3.1. การไหลแบบ homogeneous (bubbly flow) regime โดยทั่วไปการไหลแบบนี้จะเกิดขึ้นที่ความเร็วของก๊าซผิวเผินต่ำถึงปานกลาง มีค่าโดยประมาณคือน้อยกว่า 5 เซนติเมตร/วินาที ลักษณะของฟองที่เกิดขึ้นเป็นฟองอากาศขนาดเล็กที่สม่ำเสมอในแนวเดียวกับบับเบิลคอลัมน์แทบจะไม่มี การรวมตัวกันของฟองอากาศที่เกิดขึ้น และมีการกระจายของฟองและความเร็วในการลอยตัวที่สม่ำเสมอ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากพื้นที่หน้าตัดของบับเบิลคอลัมน์ ดังนั้นขนาดของฟองในการไหลแบบ homogeneous (bubbly flow) regime ค่อนข้างที่จะสมบูรณ์ ซึ่งฟองที่เกิดขึ้นจากการไหลแบบนี้เราจะเรียกฟองที่ได้นั้นว่า “Perfect bubble” [74]

2.5.3.2. การไหลแบบ churn-turbulent regime เรียกอีกอย่างว่า heterogeneous regime คือ higher superficial gas velocities เป็นการไหลที่เกิดขึ้นที่ความเร็วผิวเผินก๊าซสูงมีค่าโดยประมาณคือ มากกว่า 5 เซนติเมตร/วินาที ฟองอากาศที่อยู่ภายในจะถูกรบกวนจากการปั่นป่วนที่

เพิ่มขึ้นทำให้มีรูปแบบการไหลที่ไม่คงที่และเกิดการรวมตัวของฟองขนาดเล็ก ผลที่ตามมาคือมีฟองอากาศขนาดใหญ่เกิดขึ้นจากการเชื่อมต่อกันเนื่องจาก high gas throughputs การไหลแบบนี้บางครั้งเรียกว่า coalesced bubble flow จากขนาดที่แตกต่างกันของฟองอากาศ ซึ่งจะมีทั้งฟองอากาศขนาดใหญ่และฟองอากาศขนาดเล็ก [74]

2.5.3.3. การไหลแบบ slug flow regime เป็นการไหลที่มีเฉพาะในการทดลองที่ทำให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กที่ high gas flow rates การไหลแบบนี้จะทำให้เกิดการก่อดำของ bubble slugs ฟองอากาศขนาดใหญ่จะถูกทำให้เสถียรโดยผนังของบับเบิลคอลัมน์ การไหลชนิดนี้จะใช้บับเบิลคอลัมน์ที่มีความสูงประมาณ 15 เซนติเมตร เพื่อทดลองดูลักษณะของการไหลของฟองอากาศ [74]



รูปที่ 2.28 แผนภาพของระบบการไหลที่เป็นไปได้ในบับเบิลคอลัมน์ [74]

2.5.4. ลักษณะรูปร่างของฟอง (Bubble characteristics)

จำนวนของบับเบิล เป็นผลมาจากการควบคุมความเร็วในการลอยตัว ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ Hydrodynamics ความร้อน และ Mass transfer coefficients ในบับเบิลคอลัมน์ ซึ่งอิทธิพลที่มีผลต่อขนาดของฟองอากาศที่เกิดขึ้นในบับเบิลคอลัมน์ [75] มีดังนี้

2.5.4.1 Superficial gas velocity ความเร็วในการลอยตัวของบับเบิลขนาดเล็กจะค่อยๆ ลดลงตาม superficial velocity ที่เพิ่มขึ้นแต่การลอยตัวของบับเบิลขนาดใหญ่จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตาม superficial gas velocity ที่เพิ่มขึ้นหรือสามารถกล่าวได้ว่าเมื่อความเร็วในการลอยตัวเพิ่มมากขึ้นจะทำให้เกิดการสะสมของแก๊ส (Gas holdup) ภายในคอลัมน์มากขึ้นจะส่งผลกระทบต่อขนาดของฟองที่เกิดขึ้นคือฟองจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเอง [75]

2.5.4.2. Liquid phase properties and operating conditions สมบัติของของเหลวมีผลต่อสมบัติของบับเบิล ความเร็วในการลอยตัวของฟองอากาศหนึ่งฟองขึ้นอยู่กับสมบัติของของเหลว โดยขนาดของบับเบิลจะสะท้อนถึงความเร็วในการลอยตัวของบับเบิล ขนาดของบับเบิลขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของแก๊ส, แรงตึงผิว, ความหนืดของของเหลว, Sparer design, และเงื่อนไขในการดำเนินงาน ความหนืดของของเหลวหรือพื้นผิวของของเหลวที่ลดลงความเสถียรของเส้นผ่านศูนย์กลางของบับเบิลคอลัมน์, อิทธิพลของความดันและอุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิ และความดันมีผลในการลดขนาดของบับเบิล ดังเช่นการเพิ่มขึ้นของความหนืดของเฟสของเหลวส่งผลให้เกิดฟองขนาดใหญ่ขึ้น และแก๊สสะสมลดน้อยลง ซึ่งเราสามารถทำให้ฟองนั้นมีขนาดเล็กลงได้โดยการเพิ่มสารลดแรงตึงผิวลงไปปริมาณเล็กน้อยเป็นต้น [75]

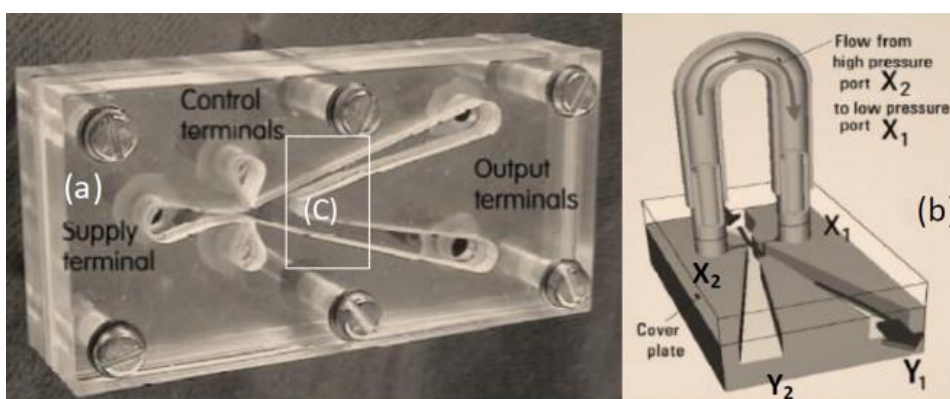
2.5.4.3. Column dimensions ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบับเบิลคอลัมน์เพิ่มขึ้น ความเร็วในการลอยตัวของบับเบิลคอลัมน์เพิ่มขึ้น วัดขนาดฟองเฉลี่ยของสองบับเบิลคอลัมน์โดยวัดความแตกต่างของเส้นผ่านศูนย์กลาง และค่าเฉลี่ยขนาดของบับเบิลสูงเนื่องจากเส้นผ่านศูนย์กลางของบับเบิลมีขนาดใหญ่ [75]

2.5.4.4. Solid concentration ส่งผลกระทบต่อสมบัติของบับเบิล การมีอยู่ของของแข็งนำไปสู่บับเบิลขนาดใหญ่ เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของค่าความหนืดของสารละลายด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย และถ้าความเร็วของแก๊สที่เข้าไปมีค่าความเร็วต่ำฟองที่ได้จะมีลักษณะที่ค่อนข้างเป็นทรงกลม [75]

2.5.5 ไมโครบับเบิล

ไมโครบับเบิลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 1-999 ไมโครเมตร มีวิธีการผลิต 3 วิธีคือ ใช้วิธีการอัดก๊าซเข้าไปในของเหลว, ใช้เทคนิคคูลตราซาวน์, ใช้ Fluidic oscillator โดยสองวิธีแรกจะใช้พลังงานมากในการผลิต ส่วนวิธีที่ 3 จะใช้พลังงานน้อยกว่า ซึ่งอุปกรณ์ที่สำคัญของไมโครบับเบิลที่ทำให้เกิดบับเบิลคือตัวดิฟฟิวเซอร์ (Diffuser) ซึ่งสมัยก่อนมีผู้วิจัยศึกษาและประดิษฐ์แผ่นดิฟฟิวเซอร์จากถ่านไม้ที่มีรู พบว่ามีประสิทธิภาพในการเกิดบับเบิลได้ดี จึงนำไปประยุกต์ใช้กับการบำบัดน้ำเสียพบว่าสามารถบำบัดได้ดีในระดับหนึ่ง จากนั้นก็ผู้วิจัยนำไมโครบับเบิลไปทดลองเรื่องกระจายตัวของบับเบิลน้ำที่ผสมน้ำมันพบว่าจะต้องใช้พลังงานมากในการปล่อยบับเบิลเข้าไป ประโยชน์ของไมโครบับเบิลคือ มีพื้นที่ผิวมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแก๊ส ได้บับเบิลที่มีขนาดเล็กกว่าเดิมเยอะมาก ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีไมโครบับเบิลไปประยุกต์ใช้งานมากมายดังเช่น ใช้ในกระบวนการคัดแยก เช่นแยกแร่ธาตุ, แยกน้ำออกจากน้ำมัน, แยกอนุภาคของของแข็งออกจากน้ำ, แยกอนุภาคละเอียด และอนุภาคหยาบออกจากกัน เป็นต้น ใช้ในด้านการแพทย์ เช่นระบบขนส่งยา, เครื่องปฏิกรณ์ทางชีวภาพ เป็นต้น, ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ เป็นต้น

Fluidic oscillator ดังแสดงในรูปที่ 2.29 เป็นอุปกรณ์ที่ออกแบบโดย Prof. William Zimmerman ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ต่อกับดีฟิวเซอร์ เมื่อมีแก๊สไหลผ่าน Fluidic oscillator และ ดีฟิวเซอร์จะทำให้ได้บับเบิลที่มีขนาดเท่ากับรูพรุนของดีฟิวเซอร์ เพราะโดยทั่วไปแล้วนั้นขนาดของฟองอากาศที่ได้จะใหญ่กว่าขนาดของดีฟิวเซอร์ประมาณ 10 - 20 เท่า นอกจากนี้ Fluidic oscillator ยังเป็นอุปกรณ์ที่มีข้อดีคือ เป็นอุปกรณ์ที่ไม่มีการเคลื่อนไหว ไม่มีผลต่อการสั่นสะเทือน จากนั้นได้ถูกนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียโดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ซึ่งเป็นผลทำให้น้ำเน่าเสีย และถูกนำมาใช้ในการกำจัดน้ำมันออกจากน้ำด้วย [73]



รูปที่ 2.29 Fluidic oscillator เป็นอุปกรณ์ที่ออกแบบโดย Prof. William Zimmerman [73]

บทที่ 3

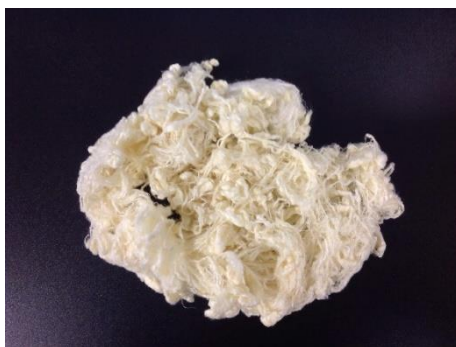
วัสดุ อุปกรณ์ ขั้นตอนการทดลอง และวิธีการวิเคราะห์

งานวิจัยนี้ทำการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิเมอร์ชนิดพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยกระบวนการขึ้นรูปที่ใช้คือกระบวนการไมโครบับเบิล สำหรับงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การสร้างโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยกระบวนการไมโครบับเบิล และการสร้างโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมโดยประยุกต์ใช้กระบวนการไมโครบับเบิล และทำแห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ซึ่งมีวัสดุ อุปกรณ์ ขั้นตอนการทดลอง และการวิเคราะห์ดังนี้

3.1. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

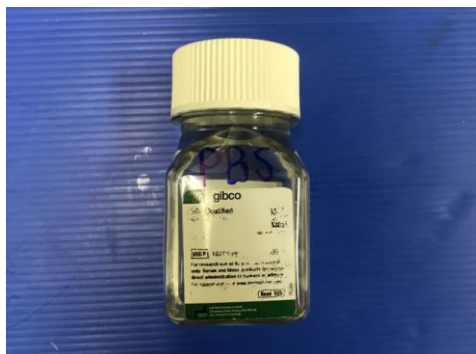
3.1.1. พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol): เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถละลายน้ำได้ดี โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการสั่งซื้อพอลิเมอร์ชนิดนี้มาจากบริษัท Fluka chemika มีเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิส 98 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 47,000 กรัมต่อโมล

3.1.2. ไหม (Silk fibroin): ไหมจัดเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดหนึ่งที่น่ามาใช้ในการขึ้นรูปเป็นโครงสร้างรองรับเซลล์ โดยในงานวิจัยนี้ชนิดของไหมที่ใช้คือไหมชนิดไฟโบรอิน ที่ได้มาจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา ดังแสดงในรูปที่ 3.1



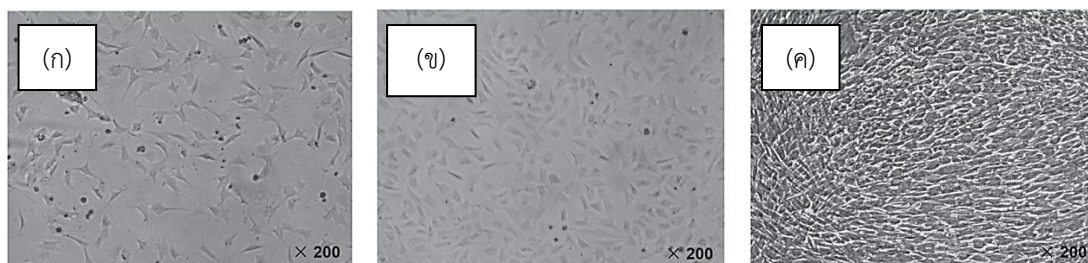
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างไหมชนิดไฟโบรอินจากกรรมหม่อนไหม

3.1.3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate-buffered saline): เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 7 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งจะใช้สารละลายนี้ในการจำลองสภาวะในร่างกายของมนุษย์ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน

3.1.4. เซลล์ MC3T3E1: เซลล์กระดูกที่ได้มาจากหนูทดลอง เป็นเซลล์ที่ถูกเลือกนำมาปลูกบนโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้สร้างขึ้น ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ ตัวอย่างเซลล์ MC3T3E1 แสดงดังรูปที่ 3.3 ซึ่งเป็นภาพที่เซลล์ถูกปลูกอยู่บนผิวของแผ่นไทเทเนียมที่ระยะเวลาต่างๆ [76]



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างของเซลล์กระดูกของหนูที่ปลูกอยู่บนแผ่นไทเทเนียม (ก) ปลูก 24 ชั่วโมง, (ข) ปลูก 48 ชั่วโมง และ (ค) ปลูก 72 ชั่วโมง ตามลำดับ [76]

3.1.5. เซลล์ L929 (Fibroblast cell): เซลล์เนื้อเยื่อที่ได้มาจากหนูทดลอง ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะนิ่ม เป็นเซลล์ที่ถูกเลือกนำมาปลูกบนโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้สร้างขึ้น ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ

3.1.6. Alpha MEM media: สารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ เกิดจากการผสม 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic และ 0.1% Fungizone® สั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich

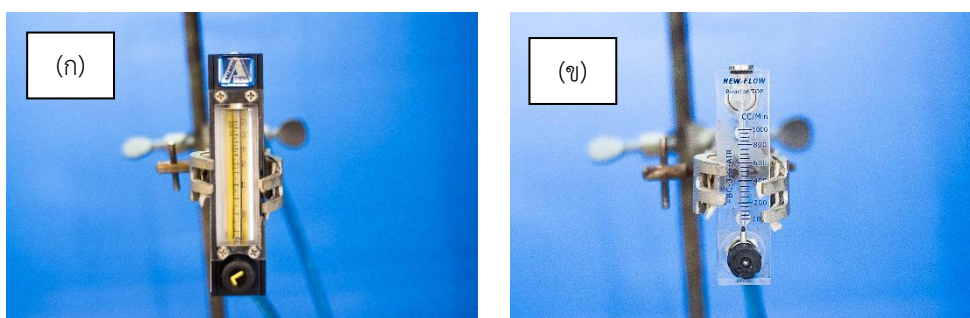
3.1.7. PrestoBlue cell reagent: สารที่ใช้ในการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ตัวอย่างสาร PrestoBlue cell reagent

3.1.8. Alkaline Phosphatase LiquiColor® Test kit: เป็นสัญญาณชนิดหนึ่งที่ใช้เปรียบเสมือนดัชนีชี้วัดของการเสริมสร้างกระดูกใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสของเซลล์ที่อยู่บนโครงร่างรองรับเซลล์ จากบริษัท Human, Germany ประเทศเยอรมนี

3.1.9. Bio-Rad Protein Assay Dry Reagent Concentrate: เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติการสังเคราะห์โปรตีนที่ช่วยในการเสริมสร้างกระดูกของเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนโครงร่างรองรับเซลล์ จากบริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc, USA ประเทศสหรัฐอเมริกา

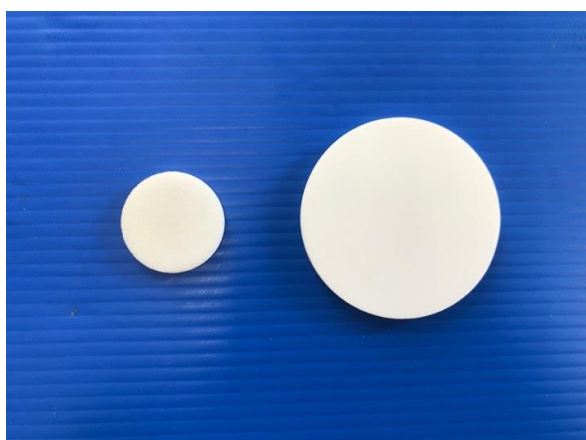
3.2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1. อุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหล (Flow meter): อุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหลเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการควบคุมอัตราการไหลของอากาศขาเข้าและอากาศขาออกให้มีอัตราการไหลที่คงที่ตรงหน้าปัดสามารถอัตราการไหลที่ต้องการได้ โดยในงานวิจัยนี้จะใช้อยู่ 2 ประเภทคือ ที่อัตราการไหลตั้งแต่ 0-120 ลิตร/นาที และที่อัตราการไหลตั้งแต่ 100-1000 มิลลิลิตร/นาที ยี่ห้อ Aalborg จากสหรัฐอเมริกาตั้งแสดงในรูปที่ 3.4 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการไหลที่ใช้ในการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์ของงานวิจัยนี้จะอยู่ที่ 20, 100, 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ



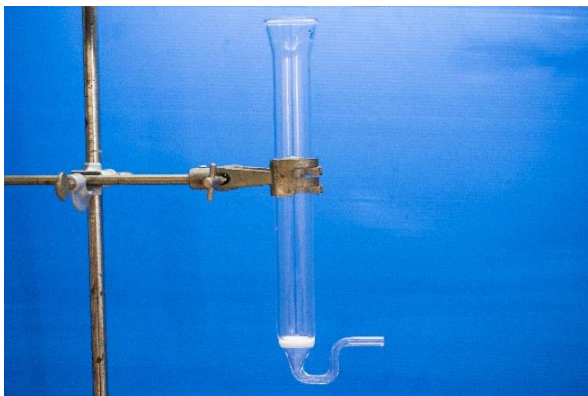
รูปที่ 3.4 ตัวอย่างอุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหลที่ใช้ในงานวิจัย (ก) อุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหลที่อัตราการไหล 0 -120 มิลลิลิตร/นาที และ (ข) อุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหลที่อัตราการไหล 100 -1000 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ

3.2.2. ดิฟฟิวเซอร์ (Diffuser): ดิฟฟิวเซอร์ คือแผ่นที่มีรูพรุนอยู่ภายใน มีลักษณะเป็นทรงกลมคล้ายแผ่นดิส ทำมาจากแก้วชนิดโบโรซิลิเกต (Borosilicate) เป็นวัสดุสำคัญที่ช่วยทำให้เกิดฟองอากาศเมื่อทำการเป่าอากาศผ่าน ทั้งนี้รูพรุนที่อยู่ภายในจะมีอยู่หลายขนาดซึ่งจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ต่อการนำไปใช้งาน โดยในงานวิจัยนี้จึงใช้ดิฟฟิวเซอร์ชนิด P4 ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 16 - 40 ไมโครเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 25 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ยี่ห้อที่ใช้คือ ROBU Glasfilter-Gerate GmbH



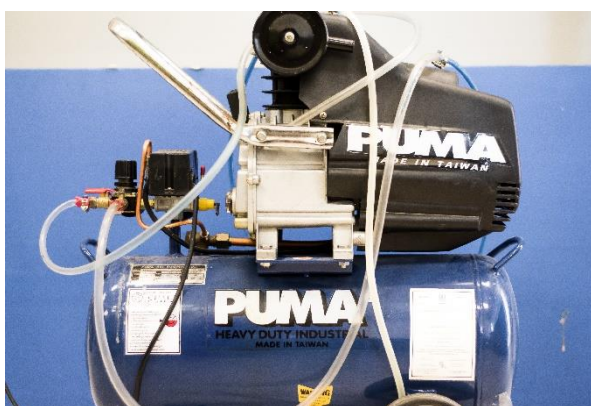
รูปที่ 3.5 ตัวอย่างดิฟฟิวเซอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกัน

3.2.3. บับเบิลคอลัมน์ (Bubble column): เป็นอุปกรณ์ที่ทำการเชื่อมให้ติดกับตัวดิฟฟิวเซอร์ เป็นที่กักเก็บฟองอากาศหลังจากทำการปล่อยอากาศผ่านตัวดิฟฟิวเซอร์ โดยตัววัสดุที่ใช้ทำบับเบิลคอลัมน์จะใช้แก้วชนิดโบโรซิลิเกต ซึ่งออกแบบให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 30 มิลลิเมตร โดยในงานวิจัยนี้สั่งทำบับเบิลคอลัมน์จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 ตัวอย่างบับเบิลคอลัมน์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.4. ปั๊มลม (Air pump): เป็นอุปกรณ์ที่ใช้เป็นปล่อยอากาศผ่านดิฟฟิวเซอร์จนเกิดเป็นฟองอากาศในบับเบิลคอลัมน์ ซึ่งยี่ห้อที่ใช้คือยี่ห้อพูมา (PUMA) ตัวถังสามารถเก็บอากาศได้ 25 ลิตร โดยควบคุมความดันให้คงที่ที่ประมาณ 1 บาร์ ดังแสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 ตัวอย่างปั๊มลมที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.5. แม่พิมพ์อะลูมิเนียม (Aluminium mold): แม่พิมพ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นแม่พิมพ์ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม รูปร่างเหมือนถ้วยขอบขนานที่ทำมาจากอะลูมิเนียม มีเส้นผ่านศูนย์กลางปากอยู่ที่ 70.7 มิลลิเมตร ก้นมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร และสูง 20.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 ตัวอย่างแม่พิมพ์อะลูมิเนียมที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.6. เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze drying machine): เป็นเครื่องที่ใช้ทำแห้งโดยอาศัยความเย็นในการทำแห้งให้แก่ชิ้นงาน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งอยู่ที่ -96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยยี่ห้อของเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็งที่ใช้คือ Scanvac coolsafe โดยตัวอย่างของเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง แสดงอยู่ในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 ตัวอย่างเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็งที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนของแสง (Optical density: OD): เป็นเครื่องที่ใช้วัดการดูดกลืนของแสงใช้ในการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยสังเกตจากการที่เซลล์เกิดการเปลี่ยนสี โดยตัวอย่างของเครื่องวัดการดูดกลืนแสง แสดงอยู่ในรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 เครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนของแสง

3.2.8. เครื่อง Biochrom Anthos Multiread 400 Microplate Reader: เป็นเครื่องที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณของกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) ที่มีอยู่บนเซลล์ที่ผ่านการปลูกบนโครงร่างรองรับเซลล์ โดยตัวอย่างของเครื่อง Biochrom Anthos Multiread 400 Microplate Reader แสดงอยู่ในรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.11 เครื่อง Biochrom Anthos Multiread 400 Microplate Reader

3.2.9. อุปกรณ์อื่นๆ

- (1) เครื่องกวนสารละลาย
- (2) เทอร์โมมิเตอร์
- (3) น้ำกลั่น
- (4) เตาอบ
- (5) ตู้ดูดควัน (Fume hood)
- (6) ชุดอุปกรณ์แลป (Labware)
- (7) ถาดหลุมใส่ชิ้นงานทดสอบ (Well plate)
- (8) จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Petri dish)
- (9) พาราฟิล์ม (Parafilm)

3.3. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.3.1. การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างรองรับเซลล์ถูกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM, JEOL, JSM-5800LV) ที่แรงดันไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ ภาพตัดขวางของโครงสร้างของชิ้นงานนั้นได้มาจากการตัดชิ้นงานด้วยใบมีดโกน โครงสร้างรองรับเซลล์จะถูกเคลือบด้วยทองคำก่อนการตรวจสอบ จากนั้นจะใช้โปรแกรม ImageJ Software ในการวัดขนาดของเซลล์และขนาดรูพรุนของโครงสร้างรองรับเซลล์

3.3.2. การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน

สำหรับการทดสอบสมบัติทางความร้อนนั้นใช้เครื่อง differential scanning calorimetry (DSC7, PerkinElmer, USA) เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความร้อนของตัวอย่างเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (หรือลดลง) ภายใต้บรรยากาศที่ควบคุม เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์จุดหลอมเหลว, วิเคราะห์ความร้อนจำเพาะ, วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของวัสดุ และวิเคราะห์การเปลี่ยนสถานะ เป็นต้น โครงสร้างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จะได้รับความร้อนจาก 25 ถึง 300 องศาเซลเซียส ที่อัตราการความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ตามลำดับ

3.3.3. การทดสอบสมบัติเชิงกล

สำหรับการทดสอบสมบัติเชิงกลนั้นทำการทดสอบแรงอัดโดยใช้เครื่อง universal testing machine (Tinius Olsen, H10KS) สมบัติเชิงกลมีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์บนโครงร่างดังเช่น การยึดเกาะของเซลล์บนโครงร่าง และความสามารถในการรับแรงของโครงร่างเมื่อใส่เข้าไปในร่างกายของมนุษย์ โดยในการทดสอบนั้นจะแบ่งออกเป็น 2 สภาวะจำลองคือ สภาวะตัวอย่างแห้งกับสภาวะตัวอย่างเปียก ทั้งนี้สภาวะตัวอย่างเปียกเป็นสภาวะจำลองของโครงร่างรองรับเซลล์เมื่อนำไปฝังอยู่ในร่างกายของผู้ป่วย โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกตัดเป็นรูปทรงลูกบาศก์ที่มีประมาณ $1 \times 1 \times 1$ ลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับสภาวะเปียกตัวอย่างจะถูกแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS) เป็นเวลาระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องก่อนการทดสอบทางกล ตัวอย่างของโครงร่างรองรับเซลล์ถูกโหลดแรงอัดตามแนวแกน ซึ่งโหลดที่ใช้ในการทดสอบมีค่าเท่ากับ 2.5 กิโลนิวตัน (สำหรับโครงร่างที่ผลิตจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์) และ 100 นิวตัน (สำหรับโครงร่างผสมไหม) ตามลำดับ ที่ความเครียด 1 มิลลิเมตรต่อนาที กดไปจนถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ของชิ้นงานแล้วหยุด ผลลัพธ์ของสมบัติเชิงกลจะถูกวัดโดยโปรแกรม Horizon Software ในตามทฤษฎีถ้าโครงร่างรองรับเซลล์มีความแข็งแรงสูงจะส่งผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยง เซลล์จะมีการเคลื่อนที่และกระจายตัวได้ดีกว่าโครงร่างที่มีความแข็งแรงน้อย [16]

3.3.4. การทดสอบความสามารถในการบวมตัว

สมบัติการบวมตัวเป็นสมบัติที่สำคัญต่อการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกล่าวคือ เมื่อนำโครงร่างเข้าสู่ร่างกาย โครงร่างจะไปพบกับของเหลวในร่างกาย โครงร่างก็จะเกิดการบวมตัวเนื่องจากการดูดซับน้ำเหล่านั้นเข้าไป สมบัติการบวมตัวนี้มีความสำคัญต่อเซลล์ตรงที่ยังโครงร่างสามารถดูดซับน้ำได้มากจะยิ่งทำให้สามารถดูดอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ได้มากตาม ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตได้มากขึ้น แต่ทั้งนี้กับขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ เพราะถ้าโครงร่างมีความสามารถในการดูดซับน้ำมากเกินไปจะส่งผลให้โครงร่างย่อยสลายเร็ว มีความเสถียรภาพไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ [16] สำหรับการทดสอบความสามารถในการบวมตัวของโครงร่างรองรับเซลล์ ในขั้นแรกโครงร่างรองรับเซลล์จะถูกตัดให้มีขนาดเท่ากับ 1×1 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปชั่งน้ำหนักให้ค่าที่ได้เป็นน้ำหนักแห้ง (W_d) จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffer saline) ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการชั่งน้ำหนักเมื่อเวลาผ่านไปซึ่งค่าที่ได้จะถูกบันทึกไว้เป็นน้ำหนักเปียก (W_s) จนครบ 12 ชั่วโมง สุดท้ายให้นำผลที่ได้ไปคำนวณหาอัตราส่วนการบวมโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{Swelling ratio (\%)} = [(W_s - W_d) \times 100] / W_d$$

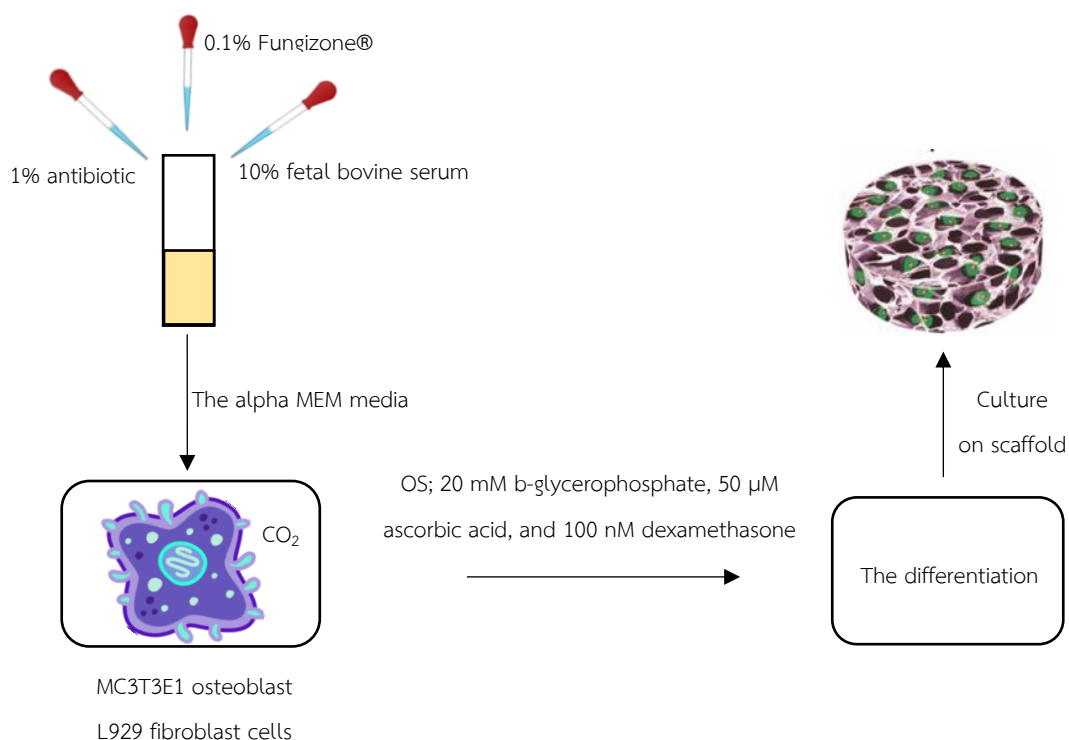
3.3.5. การทดสอบหาหมู่ฟังก์ชัน

การวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของโมเลกุลของไหมในโครงสร้างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) เป็นเทคนิคการกระตุ้นตัวอย่าง ด้วยพลังงานแสงช่วงแสงอินฟราเรด (Infrared light) ที่ความยาวคลื่นต่างๆ เพื่อหาหมู่ฟังก์ชันของสารที่เราทดสอบ จำนวนคลื่นของตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้งจะอยู่ในช่วง 4,000 ถึง 400 เซนติเมตร⁻¹ โดยใช้ Fourier transform infrared spectrometer (EQUINOX55, Bruker, Germany) ในโหมด ATR [77]

3.4. การวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ

3.4.1. การเพาะเซลล์ (Cell culture)

เซลล์ต้นแบบที่ถูกเลือกให้ทดสอบสมบัติทางชีวภาพคือ เซลล์ MC3T3E1 (Osteoblast cell) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกแข็ง และเซลล์ L929 (Fibroblast cell) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อที่มีลักษณะนิ่มตามลำดับ โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบนี้จะเริ่มจากการผสมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชื่อว่า Alpha MEM media โดยสารอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้เกิดจากการผสม 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic และ 0.1% Fungizone® ตามลำดับ จากนั้นใส่สารผสมทั้งหมดลงไปในเซลล์ต้นแบบ (เซลล์ MC3T3E1 และ เซลล์ L929) การเพาะเลี้ยงเซลล์ก็จะเกิดขึ้นแต่จะต้องทำภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากนั้นเซลล์ต้นแบบที่ถูกเพาะเลี้ยงจะเข้าสู่กระบวนการ Differentiation stage คือกระบวนการที่เปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดให้ไปทำหน้าที่ต่างๆ อย่างเฉพาะเจาะจง [78] กระบวนการนี้จะอาศัยการเติมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 20 mM b-glycerophosphate, 50 μ M ascorbic acid และ 100 nM dexamethasone (Osteogenic supplements medium: OS media) ตามลำดับ เพื่อให้เซลล์ต้นแบบเกิดการเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะเลี้ยงบนโครงสร้างรองรับเซลล์ ตัวอย่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นไปดังรูปที่ 3.12

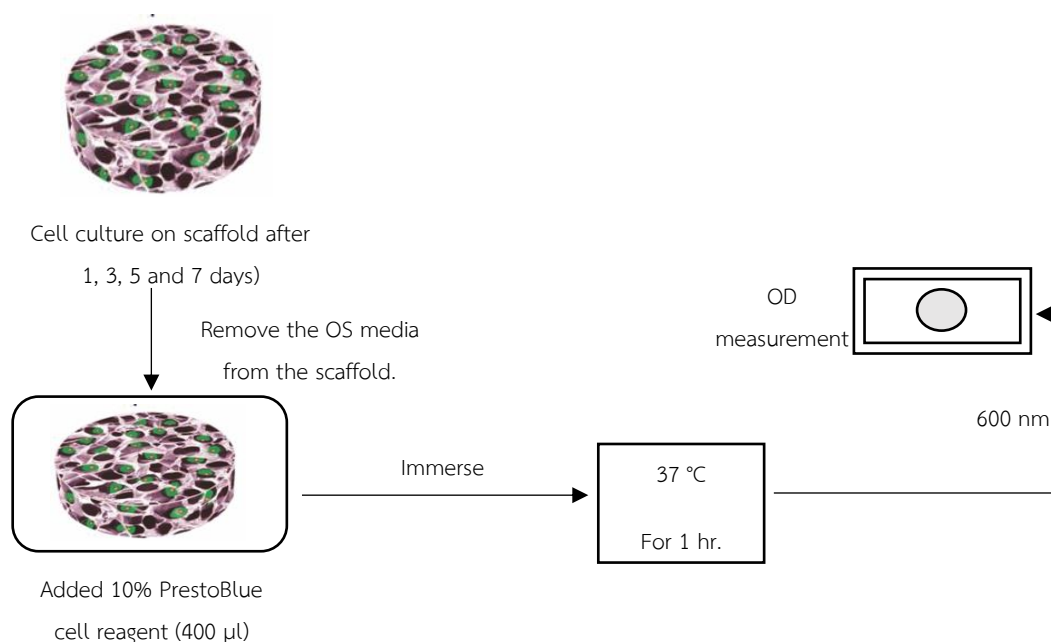


รูปที่ 3.12 ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ก่อนการนำไปปลูกบนโครงร่างรองรับเซลล์

3.4.2. การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation)

การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นแบบบนโครงร่างรองรับเซลล์ ปัจจุบันมีหลากหลายวิธีด้วยกันที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังเช่น การนับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น, การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น และศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ เป็นต้น ซึ่งการทดสอบจะอาศัยการดูการเปลี่ยนสีของเซลล์ผ่านเครื่องการวัดการดูดกลืนแสง (OD: Optical measurement) [79] ความสามารถทางชีวภาพ, การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่างถูกทดสอบด้วยเทคนิค PrestoBlue cell reagent (Thermo Fisher Scientific) หลังจากทำการเพาะเซลล์บนโครงร่าง ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ตามลำดับ โดยกระบวนการจะเริ่มจากนำโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์มาแล้ว 1, 3, 5 และ 7 วัน มากำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกไปโดยทำการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ให้เหลือแต่เซลล์เปล่าๆ บนโครงร่าง จากนั้นนำโครงร่างดังกล่าวไปบ่มในสารละลาย PrestoBlue cell reagent (400 μl) เพื่อวิเคราะห์ผล Cell proliferation ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อ

ครบกำหนดนำโครงสร้างดังกล่าวไปเข้าเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อดูการเปลี่ยนสีของเซลล์ ซึ่งถ้าเซลล์บนโครงร่างใดเปลี่ยนสีมากแสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากขึ้นตามลำดับ [80] รูปตัวอย่างแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เป็นไปดังรูปที่ 3.13

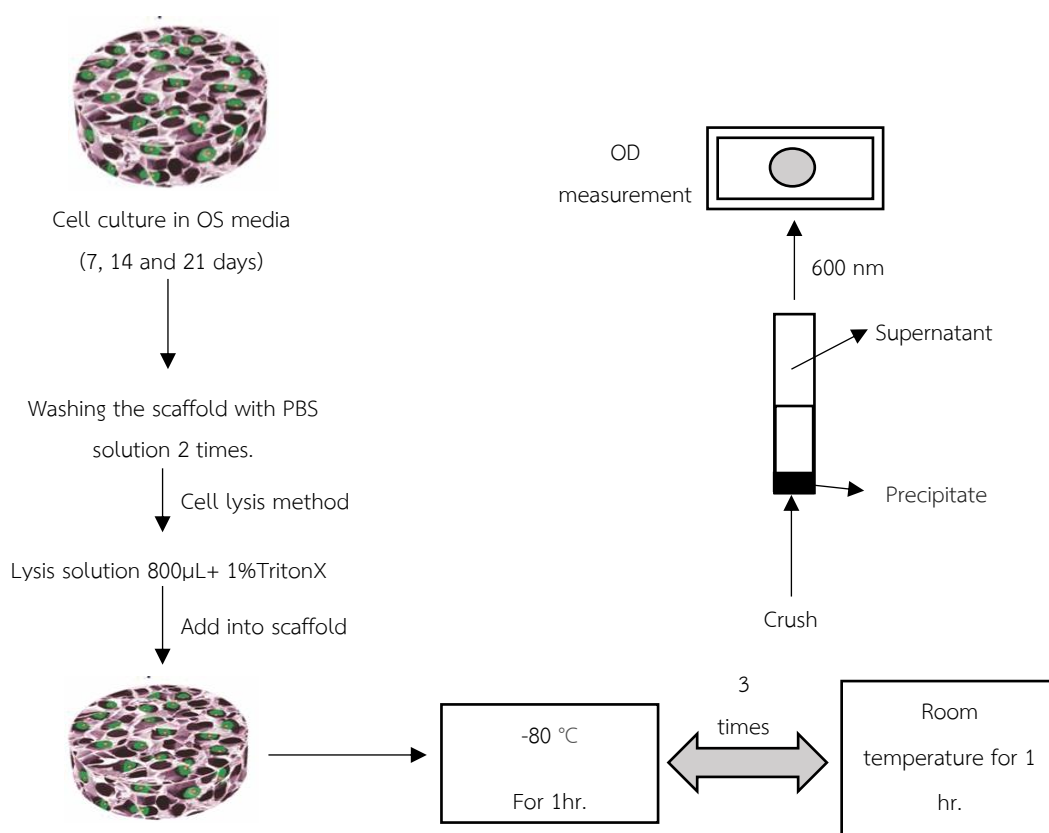


รูปที่ 3.13 แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์

3.4.3. กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase activity: ALP)

อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสเป็นสัญญาณชนิด Tetrameric ที่พบได้ในพลาสมาของเซลล์กระดูก ตามการศึกษาของ W. Withold et.al [81] กล่าวว่าสัญญาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสเป็นตัวชี้แจงในการก่อตัวของกระดูก และนอกจากนี้สัญญาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ยังเป็นตัวช่วยตรวจจับโรคกระดูกได้อีกด้วย สัญญาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสเปรียบเสมือนสัญญาณชนิดหนึ่งที่เป็นไบโอมาร์คเกอร์ (biomarker) ของกระดูกคือ กล่าวคือเป็นสัญญาณที่เปรียบเสมือนตัวชี้แจงในการก่อตัวของเซลล์กระดูกในสภาวะเริ่มต้น ซึ่งการวิเคราะห์จะเริ่มหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารเลี้ยงเซลล์ OS media บนโครงร่างรองรับเซลล์ เป็นเวลา 7, 14, และ 21 วัน ตามลำดับ โครงร่างรองรับเซลล์จะถูกล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ซาลีน เป็นจำนวน 2 ครั้ง การวิเคราะห์กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส เป็นไปตามทฤษฎีเซลล์ไลซิส (cell lysis) โดยการวิเคราะห์จะเริ่มจากนำสารละลายไลซิส (Lysis solution) 800 ไมโครลิตรผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TritonX จากนั้นนำสารผสมทั้งหมดนี้ใส่ลงในโครงร่างรองรับเซลล์ โครงร่างรองรับเซลล์ดังกล่าวถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็น

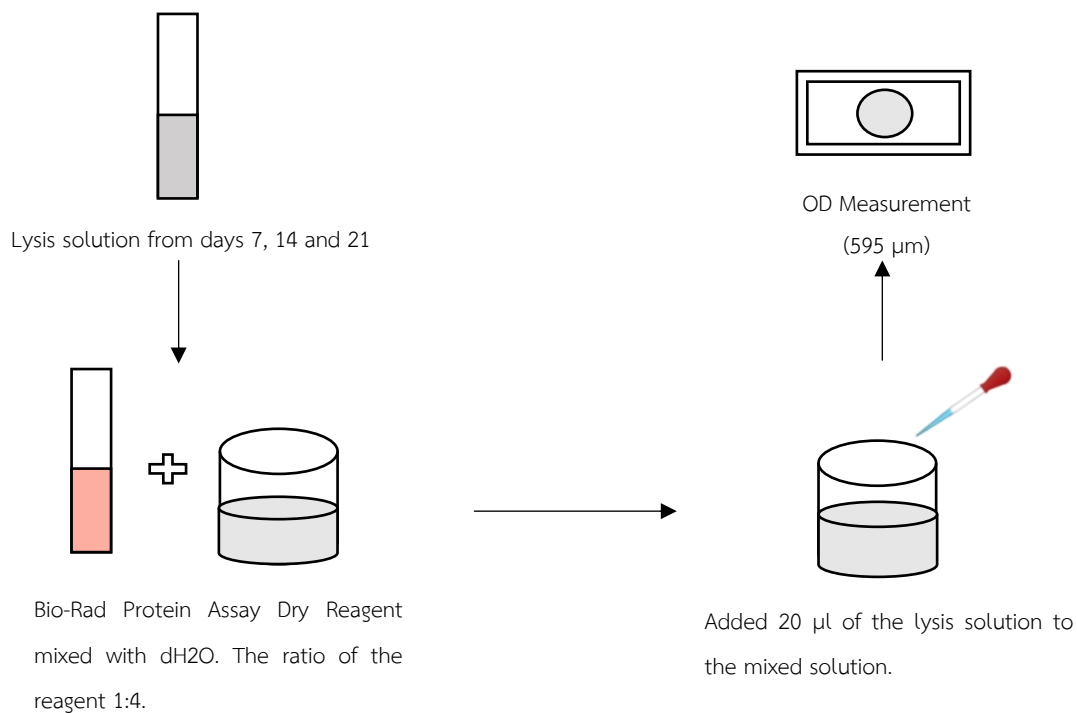
ระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้พักไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 ชั่วโมงซึ่งจะทำวนขั้นตอนนี้ประมาณ 3 รอบ หลังจากนั้นโครงร่างรองรับเซลล์จะถูกบดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงไปในน้ำเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกจากสารละลาย หลังจากหมุนเหวี่ยงจะทำให้เกิดการแยกให้นำส่วนที่เป็นน้ำใสๆหรือสารละลายไลซิส มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส โดยเข้าเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อดูการเปลี่ยนสีของเซลล์ที่เกิดขึ้น ถ้าเซลล์บนโครงร่างใดเปลี่ยนสีมากแสดงว่าบนโครงร่างนั้นเกิดกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสมากตามลำดับ [82] ตัวอย่างกระบวนการวิเคราะห์กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสแสดงดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส

3.4.4. การสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis)

เป็นการศึกษาการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ที่ปลูกบนโครงร่างรองรับเซลล์ ซึ่งโปรตีนเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเสริมสร้างกระดูก และซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ โปรตีนเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ที่สุดซึ่งช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ดังเช่น ในงานวิจัยของ Michael Polymenis et.al [83] นำเซลล์ยีสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนโครงร่างรองรับเซลล์ไปวิเคราะห์พบว่าเซลล์สามารถสังเคราะห์สารอาหารประเภทโปรตีนได้มากถึง 35 – 44 เปอร์เซ็นต์ ของสารอาหารทั้งหมดแต่ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าถ้าเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนโครงร่างรองรับเซลล์นั้นสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้มากจะส่งผลดีต่อการเสริมสร้างกระดูกตามไปด้วย โดยกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจะเริ่มจากการนำสารละลายไลซิส ซึ่งเป็นสารละลายชนิดเดียวกันจากการวิเคราะห์กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงร่างในวันที่ 7, 14 และ 21 วัน สารละลายดังกล่าวถูกนำมาวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ Bio-Rad Protein Assay Dry Reagent Concentrate ในอัตราส่วน 1:4 (น้ำกลั่น: Bio-Rad Protein Assay Dry Reagent Concentrate) จากนั้นหยดสารละลายไลซิส 20 ไมโครลิตร ลงไปในสารผสมข้างต้น จากนั้นนำเข้าเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (OD measurement) ที่ความยาวคลื่น 595 ไมโครเมตร และการดูการเปลี่ยนสีของเซลล์ถ้ามีการเปลี่ยนสีมากแสดงว่าเซลล์สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้มาก กระบวนการวิเคราะห์ความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีนแสดงดังรูปที่ 3.15



รูปที่ 3.15 แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์การสังเคราะห์โปรตีน

3.4.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกการทดสอบ ANOVA (ความแปรปรวน) และ Tukey's HSD tests (SPSS 16.0 software) สำหรับการประเมินข้อมูลทางสถิติทั้งหมด ผลลัพธ์จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้กำหนดไว้ที่ความแปรปรวนมากกว่า 0.05

3.5. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

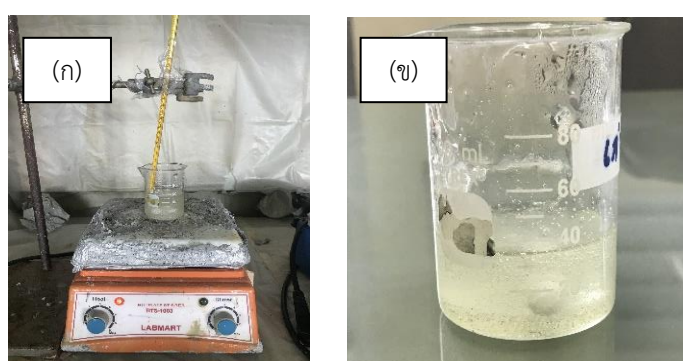
งานวิจัยนี้จะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนคือ การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยกระบวนการไมโครบับเบิล และการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมโดยกระบวนการไมโครบับเบิลและทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัยในแต่ละส่วนดังนี้

3.5.1 การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยกระบวนการไมโครบับเบิล

ขั้นตอนการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยกระบวนการไมโครบับเบิล สามารถสร้างได้เป็นลำดับขั้นตอนดังนี้

3.5.1.1. การเตรียมสารละลายพอลิเมอร์ก่อนการขึ้นรูปชิ้นงาน

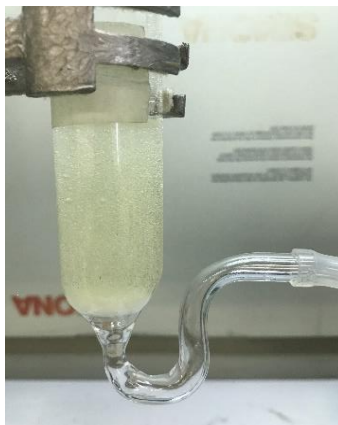
ทำการละลายผงพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 12.5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร (25% w/v) นำไปวางบนเครื่องกวน จากนั้นให้ความร้อนจนอุณหภูมิของสารผสมเป็น 80 องศาเซลเซียส จึงใส่แท่งกวนลงไปในสารผสมนั้น แล้วทำการกวนให้สารผสมรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เวลาในการกวน 2 ชั่วโมง และในระหว่างที่กวนต้องควบคุมให้อุณหภูมิอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส เสมอ จนได้เป็นสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ดังแสดงในรูป 3.16



รูปที่ 3.16 ขั้นตอนการละลายสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (ก) ผงพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมน้ำกลั่นวางอยู่บนเครื่องกวน และทำการให้อุณหภูมิจนถึง 80 องศาเซลเซียส และ (ข) สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์หลังจากกวนผสมครบ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.5.1.2. การนำสารละลายพอลิเมอร์ใส่ลงในบับเบิลคอลัมน์

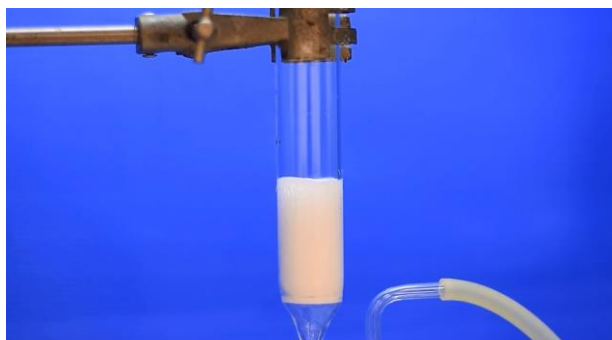
เมื่อทำการเตรียมสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เรียบร้อยแล้ว ให้นำแท่งกวนที่อยู่ในสารละลายออก จากนั้นให้เทสารละลายลงในอุปกรณ์ที่ชื่อว่าบับเบิลคอลัมน์ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 30 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.17 สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่บรรจุอยู่ในบับเบิลคอลัมน์

3.5.1.3. การขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

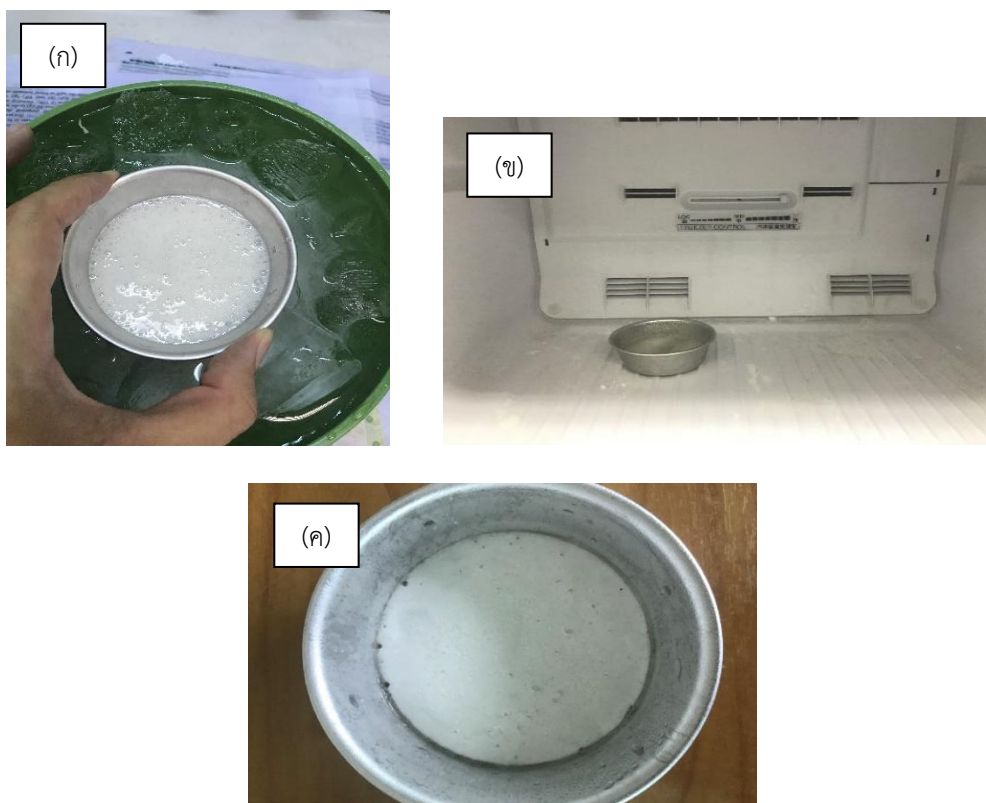
หลังจากเทสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ลงในบับเบิลคอลัมน์แล้วให้ทำการปล่อยอากาศจากเครื่องปั๊มอากาศผ่านตัวเครื่องวัดอัตราการไหล โดยอัตราการไหลที่ใช้ในแต่ละครั้งแตกต่างกันดังนี้ 20, 100, 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ โดยอากาศที่ถูกปล่อยออกมานี้จะผ่านตัวดิฟฟิวเซอร์จนเกิดเป็นฟองอากาศในบับเบิลคอลัมน์ ในการทดลองจะทำการปล่อยอากาศเป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที หรือเป่าจนฟองที่เกิดขึ้นขยายตัวอย่างเต็มที่คือไม่มีการเพิ่มหรือลดของปริมาณฟองที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.18 เป็นตัวอย่างของชิ้นงานที่ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 20 มิลลิลิตร/นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดให้เทฟองที่ได้ลงในแม่พิมพ์อะลูมิเนียม



รูปที่ 3.18 ฟองที่เกิดขึ้นในบับเบิลคอลัมน์หลังจากใช้อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาที
เห็นได้ว่าเป็นฟองขนาดเล็กขึ้นในบับเบิลคอลัมน์

3.5.1.4. การเปลี่ยนสถานะของสารละลายให้คงตัวอยู่ในรูปของของแข็ง

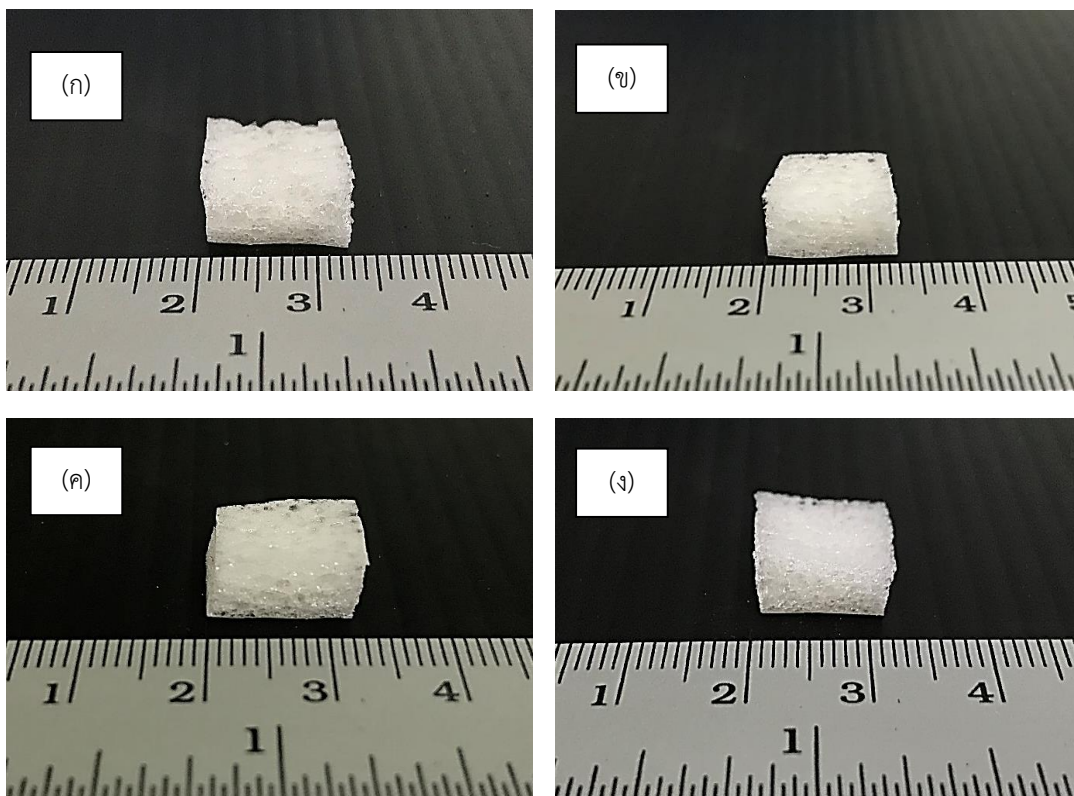
นำแม่พิมพ์ในข้อ 3.5.1.3. ไปทำให้ฟองที่อยู่ในแม่พิมพ์นั้นอยู่ในรูปของของแข็ง โดยการแช่ลงไปใต้น้ำแข็งที่มีเกลือผสมอยู่เพื่อเป็นการลดอุณหภูมิของสารละลายลงก่อนที่จะนำเข้าสู่ช่องแช่แข็งในตู้เย็นเป็นระยะเวลาประมาณ 15 นาที หลังจากครบกำหนดให้นำแม่พิมพ์ใส่เข้าไปในช่องแช่แข็งนาน 12 ชั่วโมง หลังครบ 12 ชั่วโมงจะเห็นได้ว่าฟองที่ได้จะคงตัวอยู่ในรูปของของแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 กระบวนการเปลี่ยนสถานะของสารละลายให้อยู่ในรูปของของแข็ง (ก) หลังจากเทสารลงละลายลงสู่แม่พิมพ์ทำการลดอุณหภูมิโดยการแช่แม่พิมพ์ลงในน้ำแข็ง (ข) แม่พิมพ์ถูกใส่เข้าไปในช่องแช่แข็งเพื่อให้ฟองที่เป่าได้อยู่ในรูปของของแข็ง และ (ค) โครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้หลังจากแช่แข็ง 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.5.1.5. การอบแห้งไล่ความชื้นในชิ้นงาน

นำแม่พิมพ์ออกจากช่องแช่แข็ง แล้วแช่ลงในน้ำที่อุณหภูมิห้องโดยในระหว่างที่แช่ห้ามให้น้ำถูกตัวเนื้อพอลิเมอร์ให้แช่เฉพาะตัวแม่พิมพ์โดยแช่ประมาณ 2 นาที หลังจากนั้นนำเข้าเตาอบเพื่อทำการอบแห้งและไล่ไอน้ำออกจากตัวชิ้นงาน โดยจะอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนได้เป็นโครงร่างรองรับเซลล์ออกมา ดังแสดงในรูปที่ 3.20



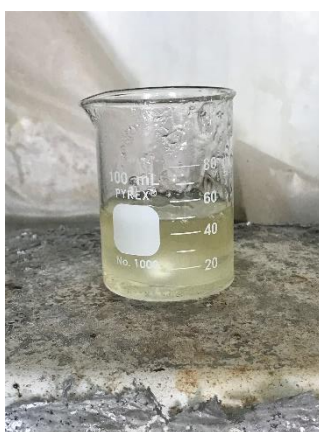
รูปที่ 3.20 ชิ้นงานโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้หลังจากทำการอบไล่ความชื้นที่อัตราการไหลแตกต่างกัน
(ก) 20 มิลลิลิตร/นาที, (ข) 100 มิลลิลิตร/นาที, (ค) 200 มิลลิลิตร/นาที
และ (ง) 300 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ

3.5.2. การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมโดยกระบวนการไมโครบับเบิลและกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง

ขั้นตอนการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมโดยกระบวนการไมโครบับเบิลและทำแห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ในกระบวนการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมนั้นจะใช้เพียงอัตราการไหลเดียวในการทำให้เกิดฟองอากาศคือ ที่อัตราการไหล 200 มิลลิลิตร/นาที แต่จะทำการเติมไหมลงไปปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ ที่ 1, 3 และ 5% w/v ตามลำดับ ซึ่งสามารถขึ้นรูปได้เป็นไปตามลำดับขั้นตอนดังนี้

3.5.2.1. การเตรียมสารละลายพอลิเมอร์ก่อนการขึ้นรูปชิ้นงาน

ทำการละลายผงพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร (20% w/v) แล้วนำไปวางบนเครื่องกวน จากนั้นให้ความร้อนจนอุณหภูมิของของผสมเป็น 80 องศาเซลเซียส จึงใส่แท่งกวนลงไปในของผสมนั้น แล้วทำการกวนให้ของผสมรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียวโดยใช้แท่งกวน โดยใช้เวลาในการกวนประมาณ 1 ชั่วโมง 15 นาที และในระหว่างที่กวนต้องควบคุมให้อุณหภูมิอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส หลังจากครบกำหนดให้ทำการลดอุณหภูมิของสารละลายลงให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องโดยการปิดปากบีกเกอร์ด้วยพาราฟิล์มประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ทั้งนี้เพื่อป้องกันการจับตัวกันเป็นก้อนของสารละลายไหมในขั้นตอนการผสมดังแสดงในรูป 3.21 แสดงสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์หลังการละลายเสร็จแล้วนำพาราฟิล์มมาปิดปากบีกเกอร์เพื่อทำการลดอุณหภูมิลง



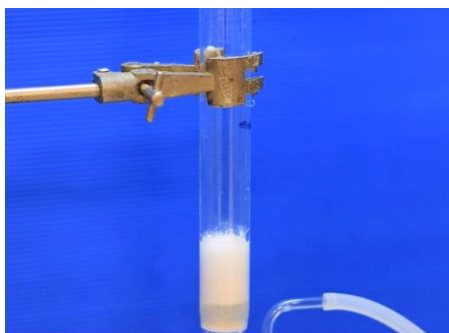
รูปที่ 3.21 สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 20 %w/v

3.5.2.2. การเตรียมสารละลายใหม่ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

สารละลายใหม่ที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้น 6 % w/v จากนั้นจะทำการเจือจางสารละลายใหม่ด้วยการเติมน้ำกลั่นลงไปให้เหลือความเข้มข้นอยู่ที่ 1, 3 และ 5% w/v ตามลำดับ

3.5.2.3. การเตรียมสารละลายใหม่ใส่ลงในบับเบิลคอลัมน์

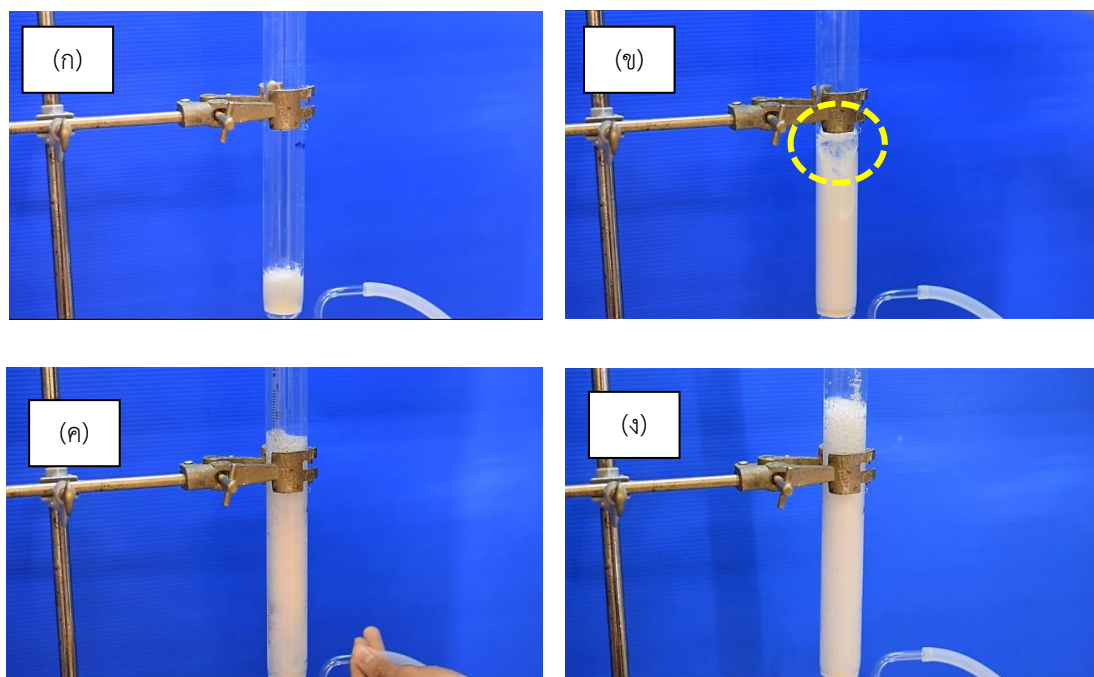
เมื่อทำการเตรียมสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และสารละลายใหม่เรียบร้อยแล้ว แบ่งสารละลายใหม่ในแต่ละความเข้มข้นออกมา 10 มิลลิลิตร จากนั้นเทใส่ลงในบับเบิลคอลัมน์โดยในกระบวนการขึ้นรูปชิ้นงานจะเริ่มจากการเติมสารละลายใหม่ลงไปก่อนแล้วจึงตามด้วยสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ดังแสดงในรูปที่ 3.22



รูปที่ 3.22 สารละลายใหม่ที่อยู่ในบับเบิลคอลัมน์

3.5.2.4 การขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมใหม่

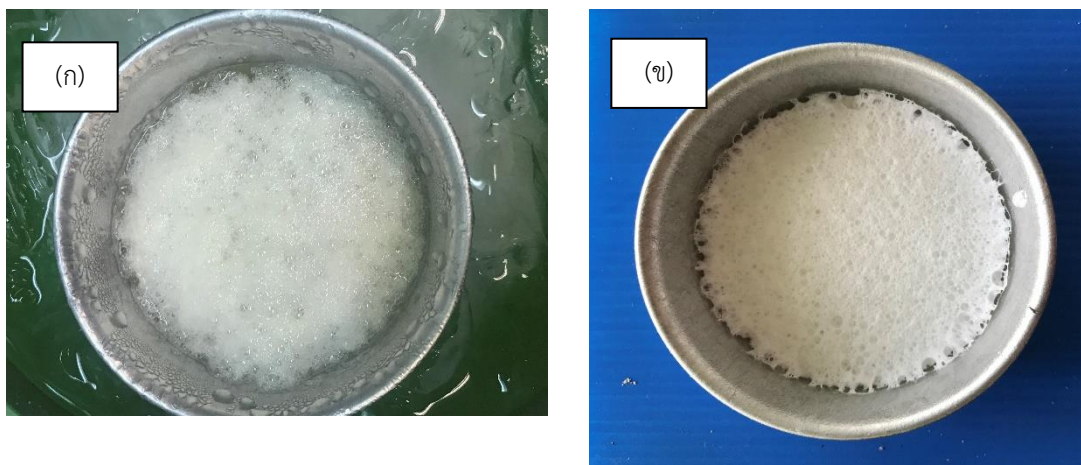
เริ่มจากการนำสารละลายใหม่ 10 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 1, 3 และ 5% w/v ตามลำดับ ใส่ลงในบับเบิลคอลัมน์ จากนั้นทำการปล่อยอากาศที่อัตราการไหล 200 มิลลิลิตร/นาที จนเกิดฟองของสารละลายใหม่ในบับเบิลคอลัมน์ ระยะเวลาที่ใช้ในการปล่อยอากาศอยู่ที่ประมาณ 1 นาที เมื่อครบกำหนดให้เทสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 40 มิลลิลิตร ตามลงไป แล้วทำการกวนด้วยแท่งกวนเพียงเล็กน้อยเพื่อให้สารละลายทั้งสองผสมกัน ในการทดลองจะทำการปล่อยอากาศเป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที หรือเป่าจนฟองที่เกิดขึ้นขยายตัวอย่างเต็มที่คือไม่มีการเพิ่มหรือลดของปริมาณฟองที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.23 เป็นตัวอย่างของการเติมสารละลายใหม่ที่มีความเข้มข้น 3% w/v จากนั้นทำการเทสารผสมทั้งหมดลงในแม่พิมพ์อะลูมิเนียม



รูปที่ 3.23 ฟองพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมที่เกิดขึ้นในบับเบิลคอลัมน์หลังจากใช้อัตราการไหล 200 มิลลิลิตร/นาที่ (ก) ปล่อยอากาศผ่านสารละลายไหมจนเกิดฟองในบับเบิลคอลัมน์, (ข) สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ถูกเทลงไปในบับเบิลคอลัมน์ที่มีสารละลายไหมบรรจุอยู่ภายในดังแสดงในวงกลมคือสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์, (ค) กวนผสมเล็กใช้แท่งแก้วกวน และ (ง) ฟองสารผสมที่เกิดขึ้นในบับเบิลคอลัมน์ ตามลำดับ

3.5.2.5. การเปลี่ยนสถานะของสารละลายให้คงตัวอยู่ในรูปของของแข็ง

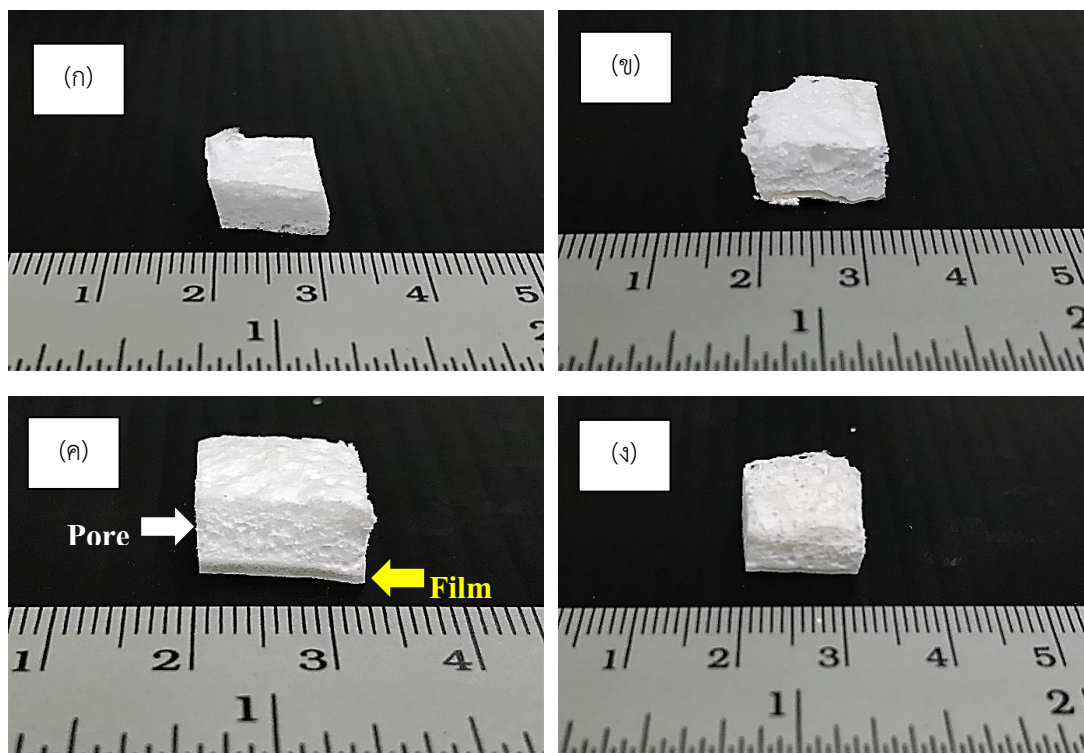
นำแม่พิมพ์ในข้อ 3.4.2.4. ไปทำให้ฟองที่อยู่ในแม่พิมพ์นั้นอยู่ในรูปของของแข็ง โดยการแช่ลงในน้ำแข็งที่มีเกลือผสมอยู่เพื่อเป็นการลดอุณหภูมิของสารละลายลงก่อนที่จะนำเข้าสู่ช่องแช่แข็งในตู้เย็นเป็นระยะเวลาประมาณ 15 นาที หลังจากครบกำหนดให้นำแม่พิมพ์ใส่เข้าไปในช่องแช่แข็งนาน 12 ชั่วโมง หลังครบ 12 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าฟองที่ได้จะคงตัวอยู่ในรูปของของแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 3.24



รูปที่ 3.24 กระบวนการเปลี่ยนสถานะของสารละลายให้อยู่ในรูปของของแข็ง (ก) หลังจากเทสารละลายลงสู่แม่พิมพ์ทำการลดอุณหภูมิโดยการแช่แม่พิมพ์ลงในน้ำแข็ง และ (ข) โครงร่างรองรับเซลล์ผสมใหม่ที่ได้หลังจากแช่แข็ง 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

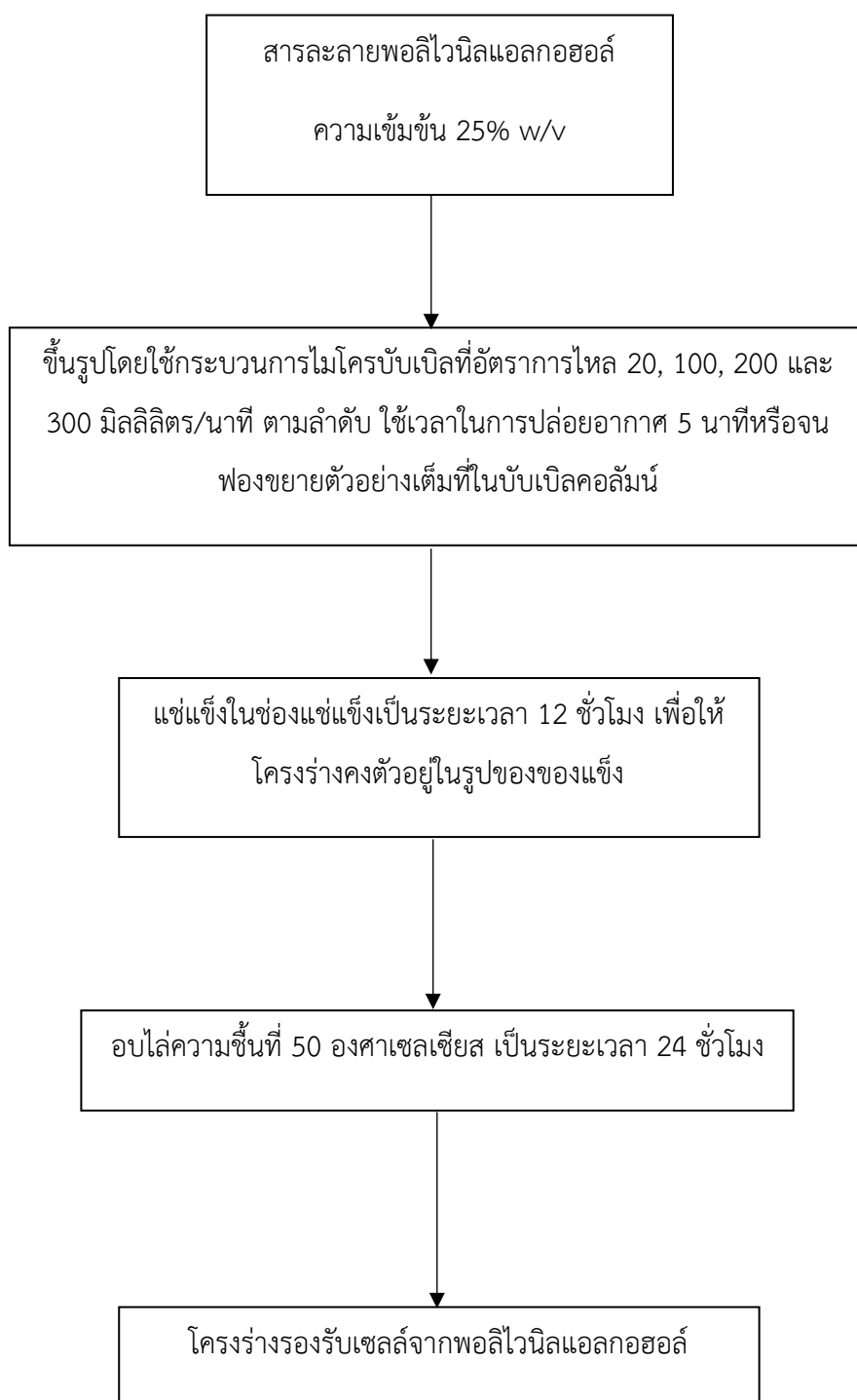
3.5.2.6. การทำแห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง

นำแม่พิมพ์บรรจุใส่ภาชนะที่สามารถเก็บความเย็นได้ แล้วนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็งที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยในการทดลองจะอาศัยการทำแห้ง 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เพื่อทำการไล่น้ำออกจากโครงร่างรองรับเซลล์ให้โครงร่างที่ขึ้นรูปได้มีความคงตัวเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้แช่ลงในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 50% v/v เพื่อให้ไหมที่อยู่ในโครงร่างเปลี่ยนโครงสร้างจากนิ่มเป็นแข็งเป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากแช่เสร็จให้นำโครงร่างที่ได้ล้างน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสารละลายเมทานอลออก แล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็งเป็นครั้งที่ 2 เพื่อกำจัดน้ำและสารละลายเมทานอลที่หลงเหลืออยู่อีกครั้งนาน 12 ชั่วโมง จนได้เป็นโครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมตามที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 3.25 ทั้งนี้ในงานวิจัยจะทำการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์แบบไม่ผสมอีกชิ้นหนึ่งเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับโครงร่างแบบผสม โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 20% w/v และทำแห้งโดยการใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง ตามลำดับ



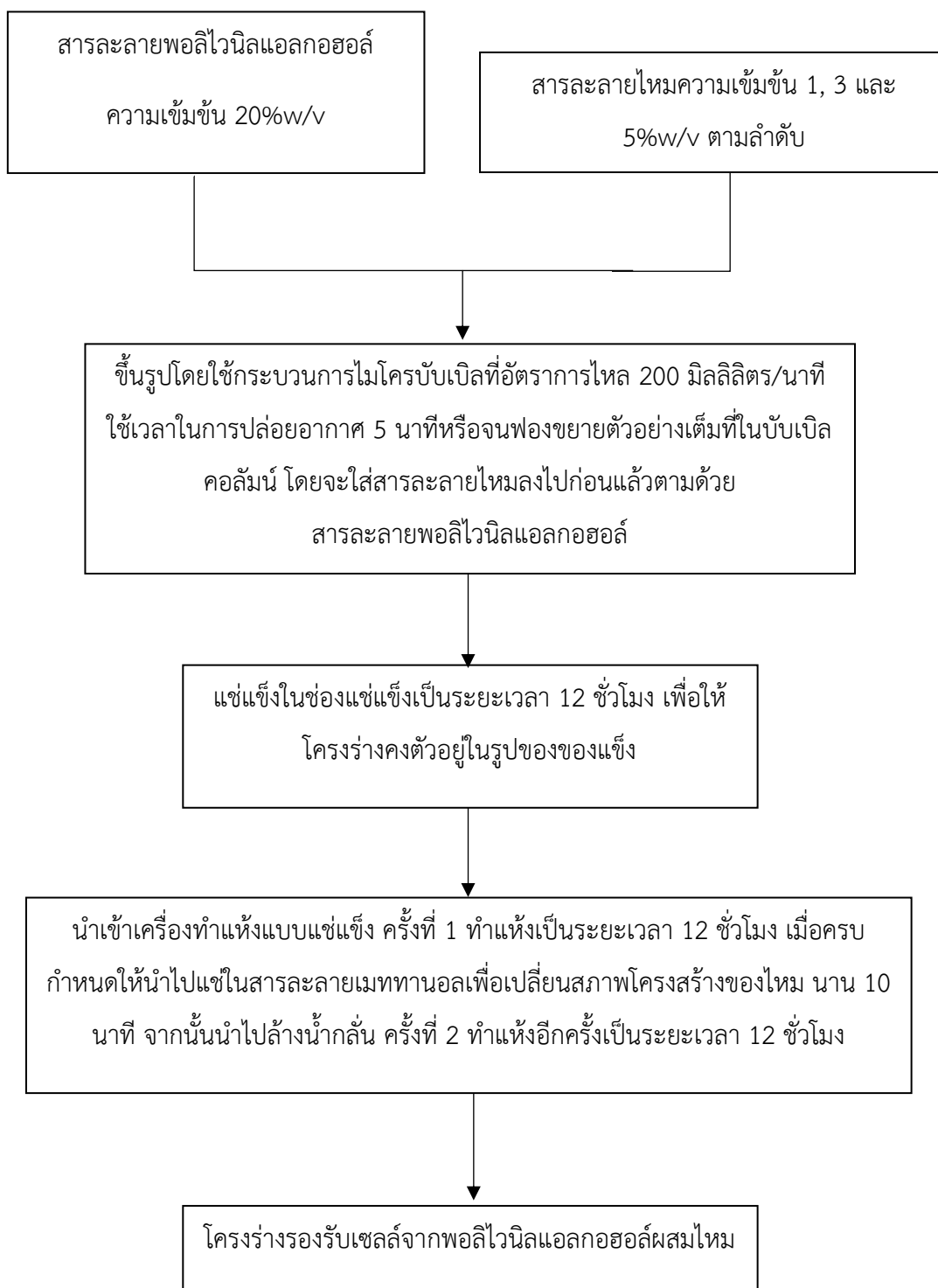
รูปที่ 3.25 ชิ้นงานโครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมที่ได้หลังจากทำการทำแห้งแบบแช่แข็งที่ความเข้มข้นของสารละลายไหมแตกต่างกัน มีทั้งส่วนที่เป็นฟิล์ม และส่วนที่เป็นรูพรุน (ก) โครงร่างรองรับเซลล์ที่ไม่ผสมไหม, (ข) โครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมที่ได้จากสารละลายไหมความเข้มข้น 1%w/v, (ค) โครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมที่ได้จากสารละลายไหมที่ความเข้มข้น 3%w/v และ (ง) โครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมที่ได้จากสารละลายไหมที่ความเข้มข้น 5%w/v ตามลำดับ

3.6. แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์



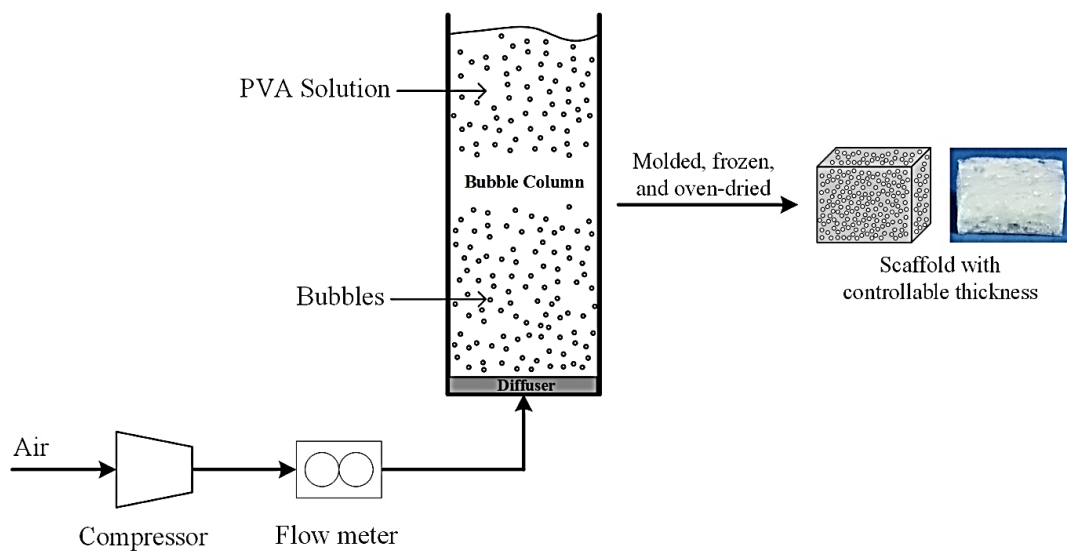
รูปที่ 3.26 แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

3.7. แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม



รูปที่ 3.27 แผนผังสรุปขั้นตอนการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

3.8. ตัวอย่างชุดการทดลองไมโครบับเบิล



รูปที่ 3.28 ตัวอย่างชุดทดลองไมโครบับเบิลที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในส่วนของผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง ในงานวิจัยเล่มนี้แบ่งออกเป็น 2 วัตถุประสงค์คือ การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งโครงร่างที่ได้จะนำไปทดสอบสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพ ผลที่ได้มีดังนี้

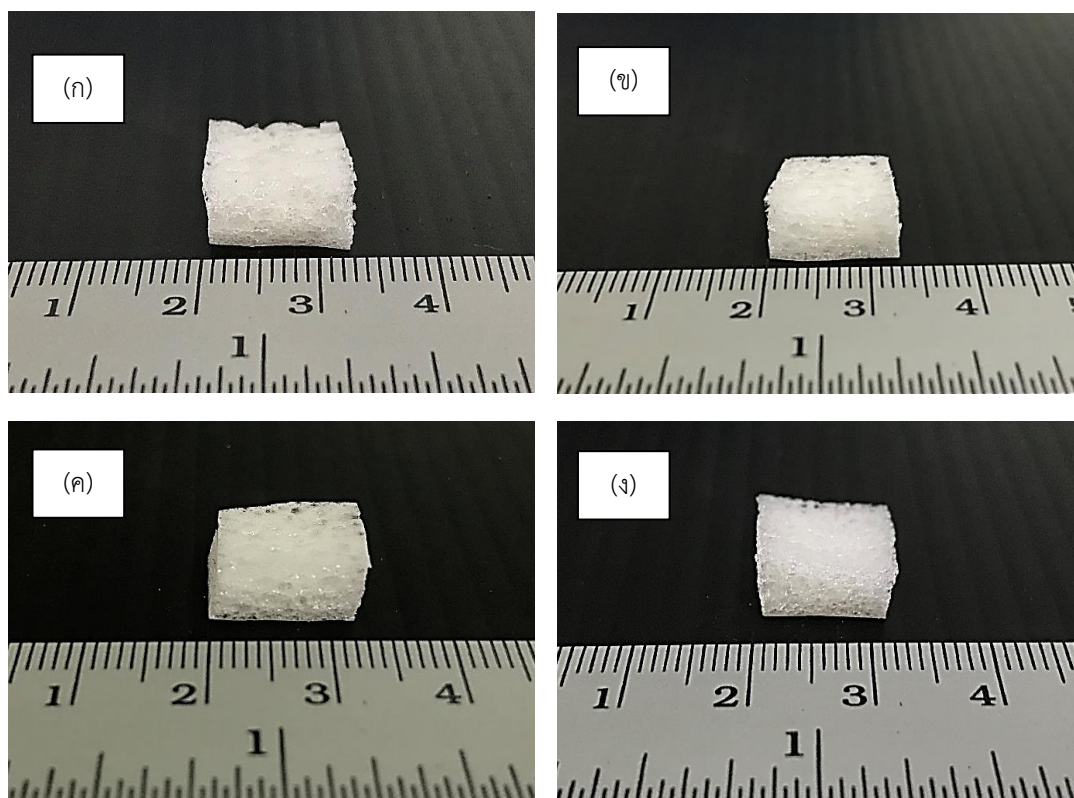
4.1. ผลการวิเคราะห์และการอภิปรายผลของการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยกระบวนการไมโครบับเบิลนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ปัญหาข้อบกพร่องของวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการผลิตโครงร่างรองรับเซลล์ ดังเช่น ปรับปรุงเรื่องการใช้สารหรืออนุภาคที่ช่วยทำให้เกิดรูพรุน, การนำสารละลายอินทรีย์มาใช้ในการกระบวนการผลิต, ราคาของอุปกรณ์ และความยากในกระบวนการขึ้นรูป เป็นต้น โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางชีวภาพมีดังนี้

4.1.1. สมบัติทางกายภาพของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

(1) โครงสร้างทางมหภาคของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

ในทางทฤษฎีโครงร่างควรเป็นโครงสร้างที่มีรูพรุนพร้อมด้วยมีการเชื่อมต่อกันของรูพรุนอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้การลำเลียงอากาศ และสารอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นไปได้อย่างสะดวก เพื่อส่งเสริมให้เกิดการก่อตัวของเนื้อเยื่อใหม่ เทคนิคไมโครบับเบิลนั้นนำไปสู่การเกิดโครงร่างสามมิติจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีรูพรุนจำนวนมากและมีโครงสร้างคล้ายโฟมดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยความเข้มข้นของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ใช้จะคงที่อยู่ที่ 25% w / v ไม่มีสารเคมีหรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการขึ้นรูป แต่อัตราการไหลของอากาศเข้าที่ใช้นั้นแตกต่างกัน ดังนี้ 20, 100, 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ โครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้นั้นจะได้รับหลังจากแช่แข็งในช่องแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและผ่านกระบวนการอบแห้งในเตาอบเพื่อให้โครงร่างนั้นยังสามารถคงรูปทรงอยู่ได้โดยไม่ทำให้รูพรุนภายในเกิดความเสียหาย

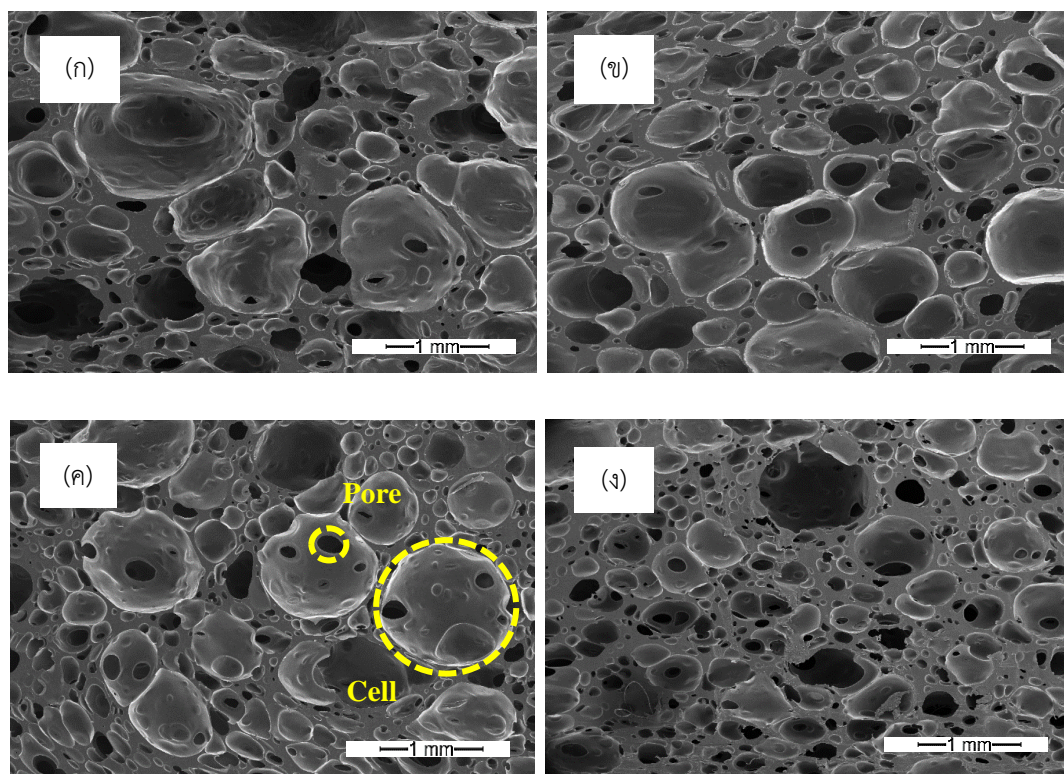


รูปที่ 4.1 ตัวอย่างภาพถ่ายของโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากอัตราการไหลต่างๆ (ก) 20 มิลลิลิตร/นาที, (ข) 100 มิลลิลิตร/นาที, (ค) 200 มิลลิลิตร/นาที และ (ง) 300 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ

(2) โครงสร้างทางจุลภาคของโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

รูปที่ 4.2 แสดงภาพโครงสร้างทางจุลภาคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากอัตราการไหลที่แตกต่างกัน พบว่าโครงสร้างที่ได้นั้นมีรูพรุนเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และภายในของรูพรุนมีการเชื่อมต่อถึงกัน ซึ่งเป็นสมบัติที่จำเป็นสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ลักษณะเซลล์ที่ได้มีลักษณะค่อนข้างเป็นทรงกลมและกระจายอย่างสม่ำเสมอบนโครงสร้าง นอกจากนี้แต่ละเซลล์นั้นยังประกอบด้วยรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมากอยู่ภายใน และมีการเชื่อมต่อถึงกันของรูพรุน ซึ่งเป็นผลดีคือจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวที่ขรุขระให้แก่โครงสร้าง โครงสร้างของโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ผลิตด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลนี้หาได้ยากในโครงสร้างที่ผลิตจากเทคนิคอื่น ๆ เช่น กระบวนการหล่อในแม่แบบ (Melt molding), การหล่อด้วยตัวทำละลาย / การชะอนุภาค (Solvent casting/particulate leaching) และการเกิดฟองก๊าซ (Gas foaming) นอกจากนี้รูพรุนที่ได้ยัง

ปราศจากสิ่งสกปรกหรืออนุภาคอื่น ๆ ซึ่งแตกต่างจากเทคนิคการหล่อด้วยตัวทำละลาย / การชะล้าง อนุภาคที่มีอนุภาคตกค้างอยู่ภายในรูพรุน เช่นอนุภาคของเกลือ [84] เป็นต้น



รูปที่ 4.2 โครงสร้างทางจุลภาคของโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากอัตราการไหลต่างๆ

(ก) 20 มิลลิลิตร/นาที่, (ข) 100 มิลลิลิตร/นาที่, (ค) 200 มิลลิลิตร/นาที่

และ (ง) 300 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ

ในทางทฤษฎีขนาดของฟองอากาศที่เกิดขึ้นในระหว่างการไหลของอากาศเข้าขึ้นอยู่กับพารามิเตอร์หลายอย่างซึ่งรวมไปถึงขนาดรูพรุนของดิฟฟิวเซอร์ที่ใช้ ความหนืดของสารละลายและอัตราการไหลของอากาศเข้า [73, 75, 85] ตามลำดับ ในการทดลองนี้เนื่องจากขนาดรูพรุนของดิฟฟิวเซอร์ที่ใช้มีขนาดเท่ากับ 10–16 ไมโครเมตร ความเข้มข้นของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 25% w / v และอัตราการไหลของอากาศเข้าที่แตกต่างกัน ทำให้โครงสร้างของโครงร่างที่ได้มีทั้งเซลล์และรูพรุนที่มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กปะปนกันอยู่ โดยขนาดรูพรุนและขนาดของเซลล์โดยเฉลี่ยของโครงร่างที่อัตราการไหล 20, 100, 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาที่ แสดงดังตารางที่ 2 ตามลำดับ

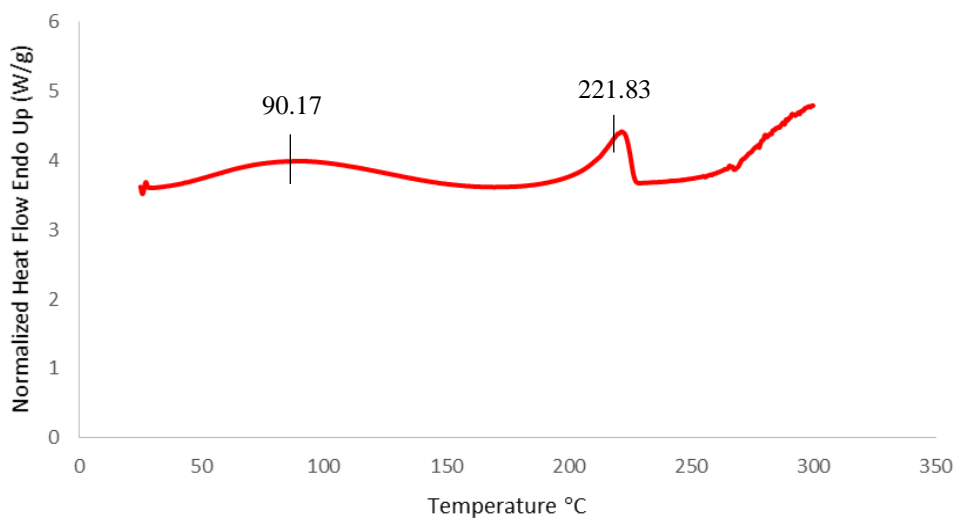
ตารางที่ 2 ขนาดเซลล์และขนาดรูพรุนของโครงร่างรองรับเซลล์ที่อัตราการไหลแตกต่างกัน

โครงร่างรองรับเซลล์ (มิลลิเมตร/นาท)	ขนาดของรูพรุน (ไมโครเมตร)	ขนาดของเซลล์ (ไมโครเมตร)
20	282	508
100	273	493
200	233	470
300	158	458

ความแตกต่างของขนาดเซลล์มีสาเหตุมาจากผลกระทบทางด้านความเร็วของอากาศที่ไหลเข้า สำหรับของเหลวที่มีความหนืดและอัตราการไหลของอากาศเข้าที่สูง ขนาดของฟองที่ได้จะเล็กลง และฟองจะมีรูปร่างลักษณะเป็นทรงกลมตามรายงานของ Harkins [73, 86]

(3) สมบัติทางความร้อนของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

เทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้ พบว่าจากผลที่ได้มีเพียงสองพีคเท่านั้นที่ปรากฏในการทดสอบนี้ คือที่ 90.17 และ 221.83 องศาเซลเซียส ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 4.3 โดยพีคแรกนั้นเกิดจากการปลดปล่อยความชื้นของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้ และพีคหนึ่งเกิดจากอุณหภูมิหลอมเหลวหรือจุดหลอมเหลวของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเห็นได้ชัดว่าโครงร่างที่ผลิตโดยเทคนิคไมโครบับเบิลนี้ไม่มีสิ่งเจือปนอื่นๆ เช่น พีคของตัวทำละลายอื่นๆ ที่มักปรากฏพร้อมกับพีคของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น [87, 88]



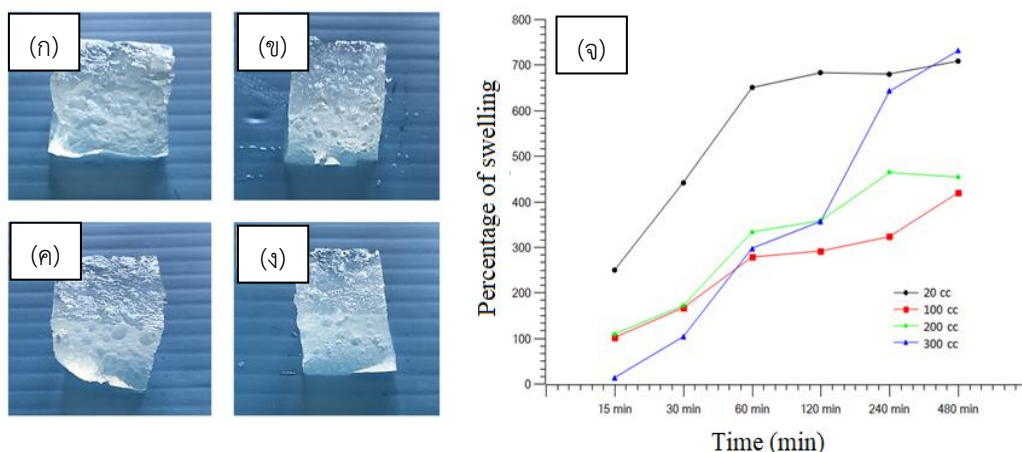
รูปที่ 4.3 สมบัติทางความร้อนของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากกระบวนการไมโครบับเบิล

(4) สมบัติการบวมตัวของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

การทดสอบสมบัติการบวมจะเริ่มทดสอบจาก 15 นาที ถึง 480 นาที โดยการบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การบวมตัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง 15 นาทีแรกจนถึง 60 นาที แต่พบว่าโครงร่างที่มีเปอร์เซ็นต์การบวมตัวมากที่สุดคือโครงร่างที่สร้างจากอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาที โครงร่างที่อัตราการไหล 100 และ 200 มิลลิลิตร/นาที มีเปอร์เซ็นต์การบวมตัวที่ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมากและมีค่าสูงกว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาที โดยแนวโน้มการบวมตัวของโครงร่างใน 15 ถึง 30 นาที แรกของทุกโครงร่างมีแนวโน้มค่อนข้างไปในแนวเดียวกันไม่แตกต่างกันมาก แต่จะเริ่มเปลี่ยนแปลงที่ช่วงเวลา 60 นาที โดยโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาที เริ่มมีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์การบวมที่สูงกว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 100 และ 200 มิลลิลิตร/นาที แต่ในทางกลับกันโครงร่างที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาที มีเปอร์เซ็นต์การบวมที่สูงสุดในทุกช่วงเวลายกเว้นที่ 480 นาที เปอร์เซ็นต์การบวมต่ำกว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาที ซึ่งเปอร์เซ็นต์การบวมของโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาที นั้นเพิ่มขึ้นอย่างมากที่ 120 นาที ตามลำดับ

จากการกล่าวข้างต้นสามารถวิเคราะห์ผลได้ว่าโดยทั่วไปแล้วนั้นประสิทธิภาพการบวมตัวเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องมาจากเพื่อแสดงให้เห็นถึงความสามารถของโครงร่างที่ยอมให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ และความสามารถในการยอมให้อากาศและสารอาหารแทรก

ซึมผ่านเข้าไปในโครงร่างเพื่อกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโต โดยที่โครงร่างอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาทีก มีความสามารถในการบวมตัวที่รวดเร็วกว่าโครงร่างที่อัตราการไหลอื่นเป็นอย่างมากนั้น ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะถือว่าเป็นผลเสียเพราะการบวมตัวในลักษณะนี้อาจจะไปทำลายโครงสร้างรูพรุนภายในโครงร่างได้ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อการยึดเกาะและยึดติดของเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ [89] เพราะจะไปขัดขวางความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์เป็นต้น โดยสาเหตุที่ทำให้โครงร่างที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาทีก สามารถดูดซึมน้ำได้มากก็เพราะมีขนาดเซลล์และขนาดของรูพรุนที่ค่อนข้างใหญ่ จึงทำให้สามารถกักเก็บน้ำได้มากตามจึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การบวมที่ค่อนข้างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ตามลำดับ แต่ทั้งนี้จะต้องดูผลวิเคราะห์ทางชีวภาพตามไปด้วยว่าโครงร่างใดเหมาะสมสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ



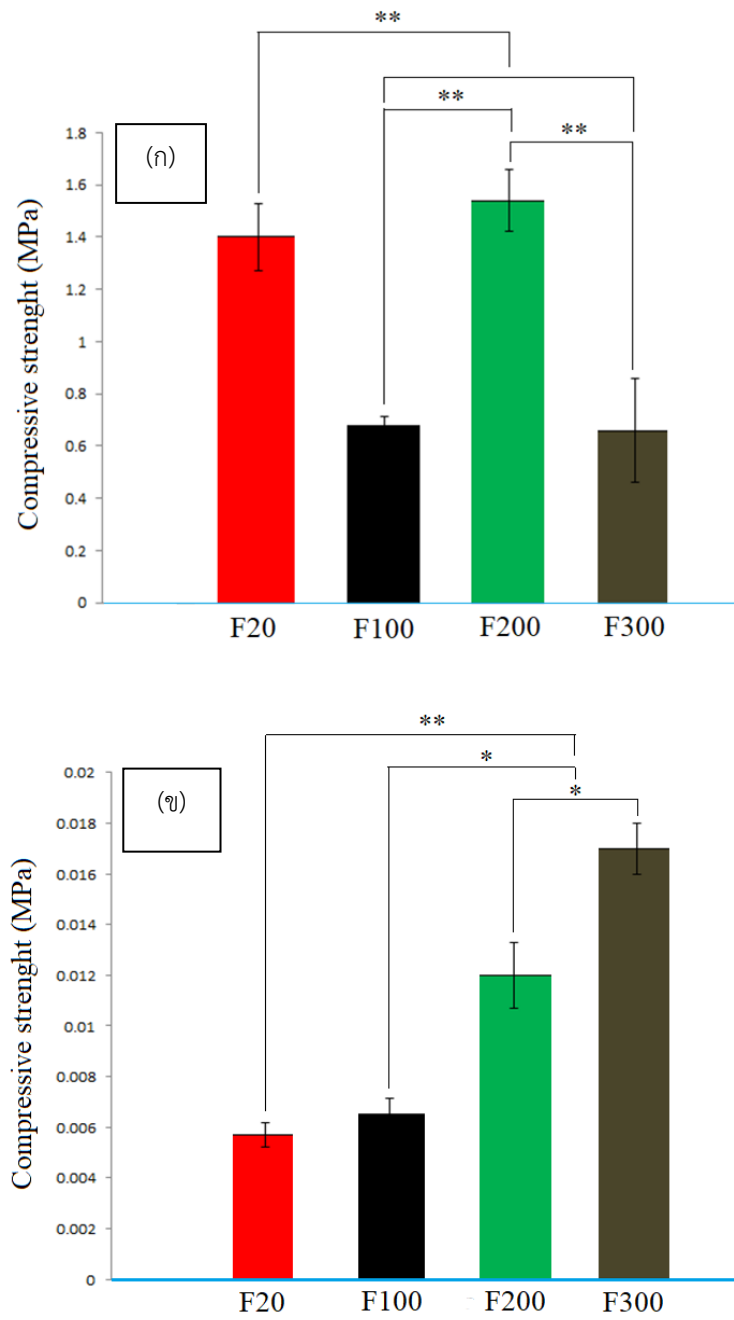
รูปที่ 4.4 โครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่อัตราการไหล (ก) 20, (ข) 100, (ค) 200, (ง) 300 มิลลิลิตร/นาทีก และ (จ) กราฟเปอร์เซ็นต์การบวมตัว หลังจากบ่มในสารละลาย PBS เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง

(5) สมบัติทางกลของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

สมบัติเชิงกลของโครงร่างนั้นนับว่าเป็นตัวชี้แจงสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของกระดูก ในงานวิจัยนี้ได้ทำการประเมินสมบัติเชิงกลของโครงร่างทั้งในสภาวะแห้งและเปียก ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.5 ในสภาวะแห้งโครงร่างที่อัตราการไหล 20 และ 200 มิลลิลิตร/นาทิจ มีความสามารถในการรับแรงอัดสูงกว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 100 และ 300 มิลลิลิตร/นาทิจ เนื่องจากการเชื่อมต่อกันของรูพรุนอยู่ในระดับต่ำทำให้มีความพรุนต่ำ และนอกจากนี้ความหนาของผนังรูพรุนที่เพิ่มมากขึ้นของโครงร่างที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาทิจ นั้นช่วยเพิ่มสมบัติทางกลของโครงร่างทำให้โครงร่างมีความแข็งแรงอัดได้มากขึ้น [90] ตามลำดับ แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อความพรุนเพิ่มมากขึ้นของโครงร่างที่อัตราการไหล 100 และ 300 มิลลิลิตร/นาทิจ นั้นจะทำให้คุณสมบัติเชิงกลลดลง [43] ตามไปด้วย

ความแข็งแรงเชิงกลของโครงร่างในสภาวะเปียกนั้นทำขึ้นเพื่อจำลองสภาพภายในร่างกายของมนุษย์เมื่อนำโครงร่างเข้าสู่ร่างกาย ในสภาวะเปียกโครงร่างทั้งหมดจะมีความสามารถในการทนแรงอัดที่ต่ำกว่าโครงร่างแบบแห้ง เนื่องจากโครงร่างได้มีการดูดซับของเหลวเข้าไป โดยกำลังอัดสูงสุดและต่ำสุดสำหรับโครงร่างแบบเปียกคือ 0.017 และ 0.006 MPa ซึ่งเป็นผลของโครงร่างที่อัตราการไหล 300 และ 20 มิลลิลิตร/นาทิจ ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของอัตราการไหลที่มีผลต่อสมบัติเชิงกลของโครงร่างแบบแห้งและแบบเปียก ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้างรูพรุนและขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกัน โดยค่าแรงอัดต่ำนั้นเกิดจากการที่โครงร่างดูดซึมซับน้ำเข้าไปจำนวนมาก และโครงร่างอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาทิจ มีค่าทนแรงอัดต่ำสุดก็เพราะมีขนาดของรูพรุนและเซลล์ที่ค่อนข้างใหญ่ทำให้ดูดซับของเหลวได้มากตาม ดังนั้นจากผลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าโครงร่างที่มีความแข็งที่พอเหมาะจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเสริมสร้างเนื้อเยื่อได้ [91, 92] แต่ทั้งนี้จะต้องวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพเพิ่มเติมด้วย



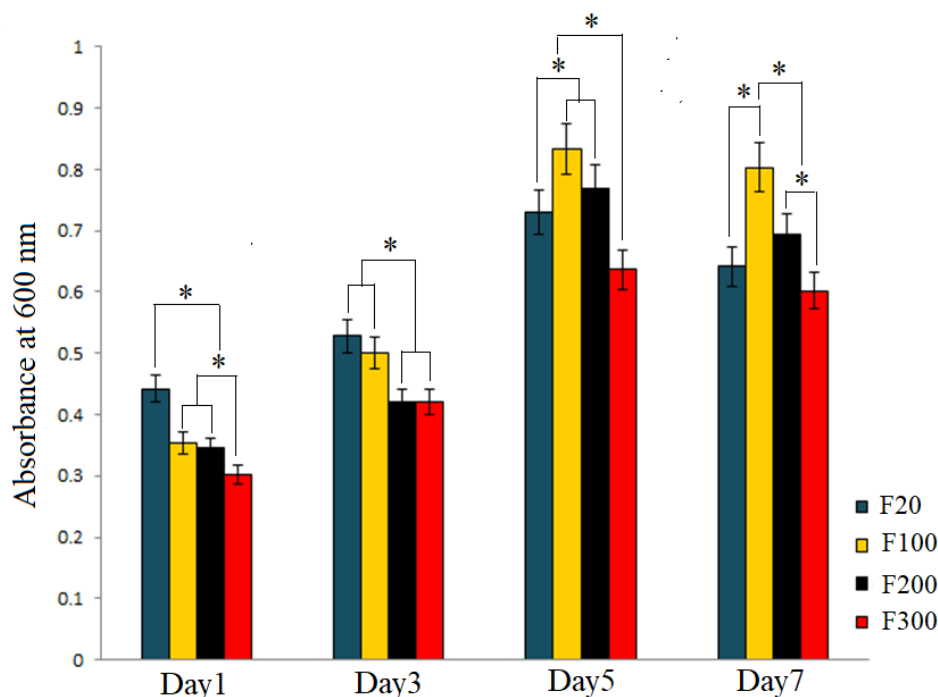
รูปที่ 4.5 ผลกำลังอัดของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากอัตราการไหลต่างๆ ภายใต้ (ก) สภาวะแห้ง และ (ข) สภาวะเปียก ตามลำดับ

4.1.2. สมบัติทางชีวภาพของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

(1) การเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างที่ผลิตโดยกระบวนการไมโครบับเบิล โครงร่างจะถูกทดสอบด้วยสาร PrestoBlue reagent หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงร่างมาแล้ว 1, 3, 5 และ 7 วันตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 1 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ของโครงร่างที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาที่ นั้นสูงกว่าโครงร่างชนิดอื่น และโครงร่างที่อัตราการไหล 300 ลิตร/นาที่ มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ต่ำที่สุด ตามลำดับ ในวันที่ 3 การเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างที่อัตราการไหล 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาที่ มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โครงร่างอัตราการไหล 20 และ 100 มิลลิลิตร/นาที่ ยังมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์อย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับวันที่ 1 และสูงกว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ ในวันที่ 5 โครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์บนโครงร่างอื่นๆ และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่ำที่สุดบนโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ และในวันที่ 7 ผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์นั้นมีค่าใกล้เคียงกับวันที่ 5 การเพิ่มจำนวนเซลล์ในโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ นั้นสูงกว่าโครงร่างอื่นๆ อย่างเด่นชัด แต่ในขณะที่โครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาที่ นั้นยังคงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ต่ำกว่าโครงร่างแบบอื่น ตามลำดับ

จากผลข้างต้นพบว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในวันที่ 5 และ 7 ของโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่าโครงร่างอื่นๆ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ มีขนาดของเซลล์และรูพรุนที่มีขนาดใหญ่ [93] และการเชื่อมต่อระหว่างกันของรูพรุนที่ดี ทำให้ส่งผลดีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ [94] ซึ่งสามารถนำไปสู่การฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่ดีขึ้น [88] ผลการวิเคราะห์จึงสรุปได้ว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ นั้นเหมาะสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก แต่อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันสมมติฐานนี้จะต้องมีการทดสอบสมบัติทางชีวภาพอย่างอื่นเพิ่มเติมด้วย

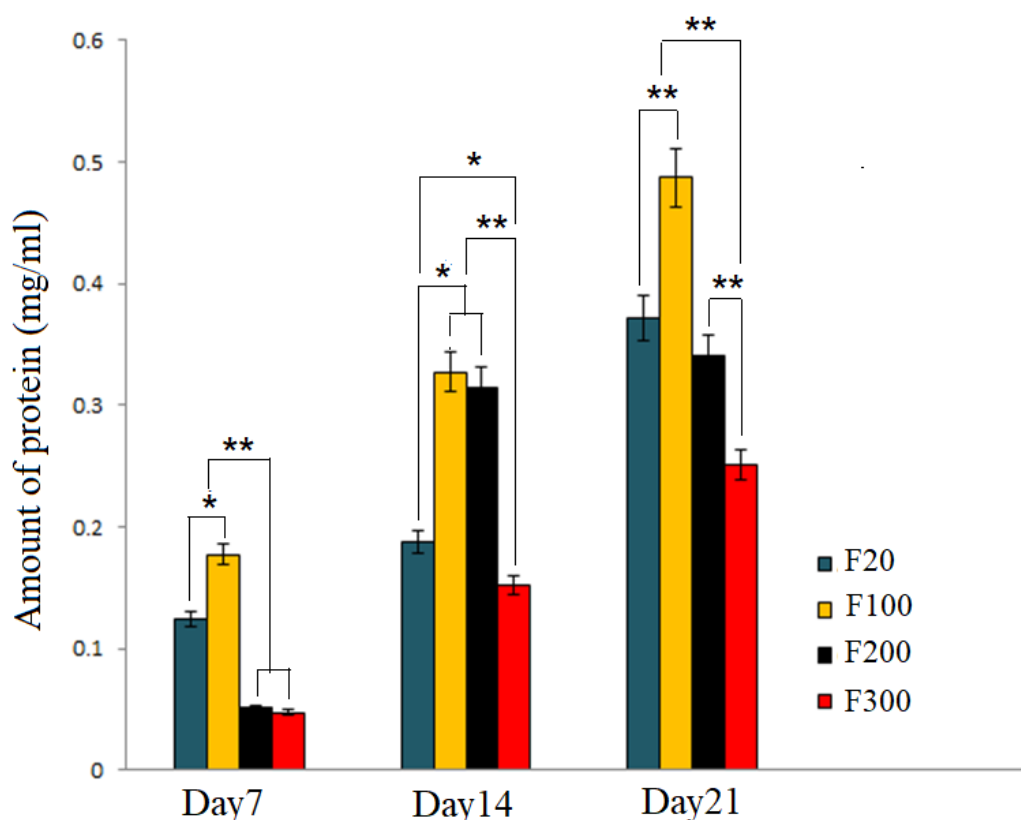


รูปที่ 4.6 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ 1, 3, 5 และ 7 วันตามลำดับ หลังจากการทดสอบด้วยสารละลาย PrestoBlue reagent

(2) การสังเคราะห์โปรตีนของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

การสังเคราะห์โปรตีนได้รับการวิเคราะห์หลังจากการเลี้ยงเซลล์บนโครงร่างมาแล้ว 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ โดยผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.7 โครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาท เป็นโครงร่างที่มีการสังเคราะห์โปรตีนสูงกว่าโครงร่างที่อัตราการไหลอื่นอย่างชัดเจนโดยเฉพาะเมื่อเทียบกับโครงร่างที่อัตราการไหล 200 และ 300 มิลลิลิตร/นาท ในวันที่ 7 การสังเคราะห์โปรตีนดำเนินการวิเคราะห์เรื่อยมาจนถึงวันที่ 14 พบว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาท มีการสังเคราะห์โปรตีนที่สูงกว่าโครงร่างอื่นๆ เช่นกัน แต่ไม่สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับโครงร่างที่อัตราการไหล 200 มิลลิลิตร/นาท ในวันที่ 7 แต่ในทางกลับกันการสังเคราะห์โปรตีนของโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาท ในวันที่ 7 และ 14 ยังคงมีความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีนที่ต่ำที่สุดเหมือนเดิม โครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาท มีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 21 ซึ่งสูงกว่าโครงร่างอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาท ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าขนาดเซลล์และขนาดรูพรุนที่มีขนาดใหญ่ และมีที่รูพรุนเชื่อมต่อกันอย่าง เป็นเอกลักษณ์ของโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ นั้นช่วยเพิ่มการแพร่กระจายของอาหารเลี้ยงเซลล์ไปสู่พื้นผิวทั้งหมดของโครงร่างรองรับเซลล์ [22] การแพร่กระจายของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มากขึ้นจะช่วยเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน และเพิ่มการสะสมโปรตีนในรูพรุน [16] ซึ่งโปรตีนที่ถูกสะสมในโครงร่างที่มีรูพรุนนั้นจะเป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดพฤติกรรมต่างๆของเซลล์ดังเช่น การยึดเกาะ, การย้ายถิ่นของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นต้น [95] โดยพฤติกรรมต่างๆ ของเซลล์เหล่านี้นำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ผลจากการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ มีความเหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก



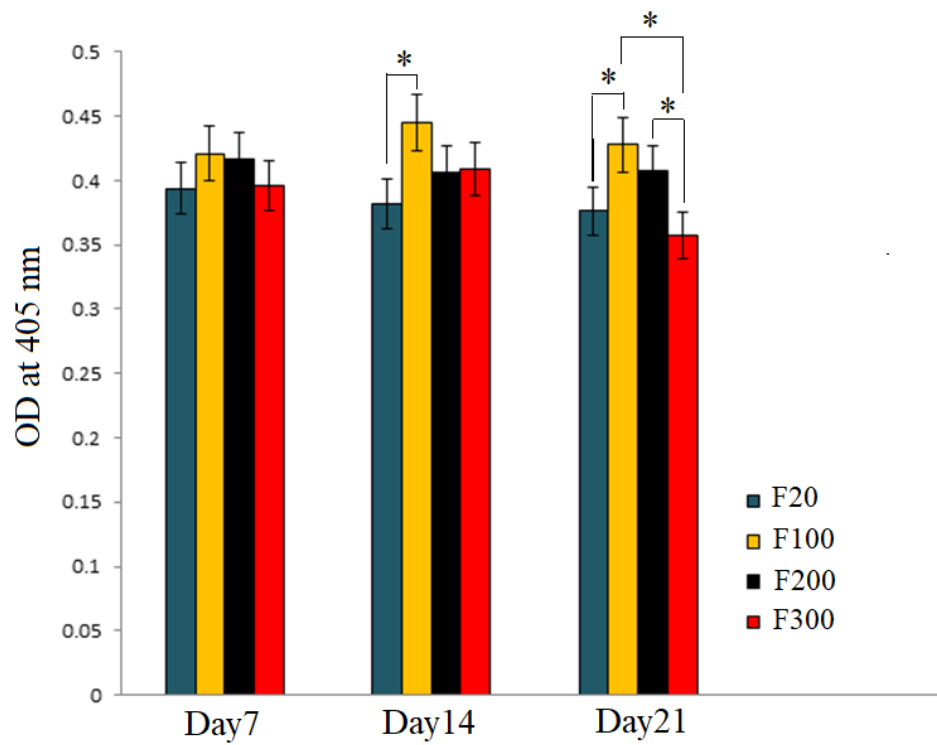
รูปที่ 4.7 การสังเคราะห์โปรตีนในวันที่ 7, 14 และ 21 ตามลำดับหลังจากการทดสอบด้วยสารละลาย Bio-Rad Protein Assay Dry Reagent Concentrate

(3) กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส(Alkaline phosphatase) บนโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

การวิเคราะห์กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสได้รับการวิเคราะห์หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงร่างรองรับเซลล์มาแล้ว 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ผลที่แสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่าในวันที่ 7, 14 และ 21 กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสของเซลล์บนโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ นั้นสูงกว่าโครงร่างที่อัตราการไหลอื่น ตามลำดับ โดยในวันที่ 7 กิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสของโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ ไม่ได้สูงกว่าโครงร่างอื่นอย่างชัดเจนแต่เริ่มเห็นได้ชัดในวันที่ 14 และ 21 ตามลำดับ และโครงร่างที่อัตราการไหล 300 มิลลิลิตร/นาที่ นั้นเป็นโครงร่างที่มีกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสต่ำที่สุดในทุกๆวันยกเว้นวันที่ 14 เป็นเช่นเดียวกับโครงร่างที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/นาที่

สัญญาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส เปรียบเสมือนไบโอมาร์คเกอร์ (Biomarker) ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพทางสมบัติชีวภาพ [96] หรือกล่าวได้ว่ากิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส เป็นสัญญาณทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับสถานะเริ่มต้นของการสร้างกระดูก เป็นต้น

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ของโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ เซลล์มีการเกิดกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสมากกว่าโครงร่างชนิดอื่น เพราะเป็นผลมาจากเป็นโครงร่างที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มาก และมีการสะสมของโปรตีนในรูพรุนสูง จึงทำให้เกิดกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสมากขึ้นตามไปด้วย จึงสามารถสรุปได้ว่าโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที่ มีสมรรถนะทางชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกมากที่สุด



รูปที่ 4.8 กิจกรรม ALP ในวันที่ 7, 14 และ 21 ตามลำดับ หลังจากการทดสอบ
ด้วยสารละลาย the Alkaline Phosphatase LiquiColor® Test kit

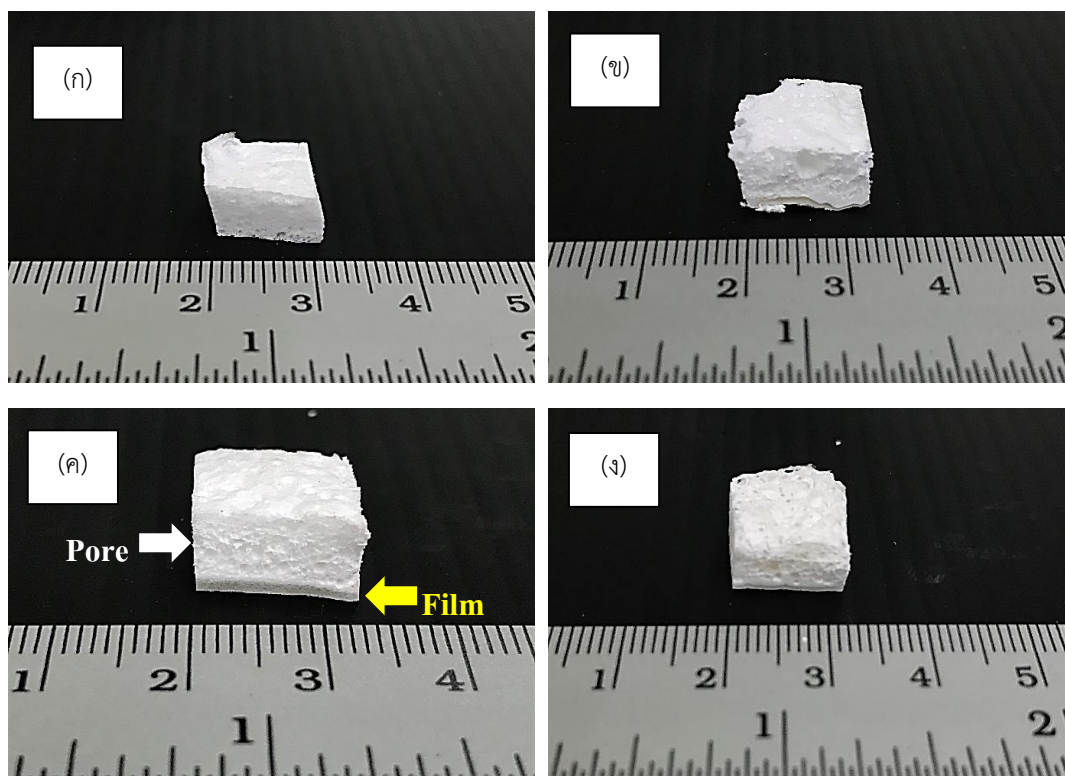
4.2. ผลการวิเคราะห์และการอภิปรายผลของการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

การสร้างโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมโดยกระบวนการไมโครบับเบิลนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของไหมที่เติมลงไปในการละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์แล้วขึ้นรูปเป็นโครงร่างรองรับเซลล์แบบผสมเพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพ โดยปริมาณความเข้มข้นของไหมที่เติมลงไปมีดังนี้ 1, 3 และ 5% w/v ตามลำดับ ไหมไฟโบรอินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้ในงานทางด้านชีวการแพทย์ เนื่องจากมีสมบัติทางกลและสมบัติทางกายภาพที่ยืดหยุ่น นอกจากนี้โครงร่างที่สร้างจากไหมไฟโบรอินสามารถคงรูปอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อที่บ่งชี้เมื่อเรานำไปปลูกซึ่งเป็นผลดีต่อการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ด้วยเหตุผลนี้งานวิจัยนี้จึงเลือกไหมชนิดไฟโบรอินมาใช้เป็นพอลิเมอร์ที่ผสมลงไปในการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์ [79] โครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้จากการผสมไหมนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นฟิล์มกับส่วนที่เป็นรูพรุน แต่ทั้งนี้ในส่วนของการวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพนั้นจะแบ่งชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ เซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell) หรือเซลล์เนื้อเยื่อที่มีลักษณะนิ่ม นอกจากนี้ในการผลิตยังมีการประยุกต์ใช้วิธีการทำแห้งแบบแช่แข็งมาใช้ในการทำแห้งโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้ ซึ่งวิธีดังกล่าวจะมีข้อจำกัดตรงที่ขนาดของรูพรุนที่ผลิตได้นั้นมีขนาดเพียง 20 – 200 ไมโครเมตรเท่านั้น ซึ่งนับว่าเป็นรูพรุนที่มีขนาดเล็กมาก จึงเป็นสาเหตุที่ต้องนำกระบวนการไมโครบับเบิลเข้ามาช่วย ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถควบคุมขนาดของรูพรุนได้ และสามารถสร้างรูพรุนได้อย่างง่ายดาย ดังนั้นโครงร่างผสมไหมที่ผลิตได้นั้นจึงมีลักษณะของรูพรุนที่ผลิตได้จากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง และจากกระบวนการไมโครบับเบิลผสมกันอยู่ และเหตุผลอีกประการหนึ่งที่น่ากระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งมาประยุกต์ใช้คือ โดยธรรมชาติไหมไม่สามารถทนต่อความร้อนได้เนื่องจากไหมจัดอยู่ในรูปของโปรตีนชนิดหนึ่ง เมื่อทำแห้งโดยใช้ความร้อนจะทำให้ไหมเกิดการหดตัว โครงร่างที่ได้ก็จะไม่สามารถคงรูปอยู่ได้ ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพมีดังนี้

4.2.1. สมบัติทางกายภาพของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

(1) โครงสร้างทางมหภาคของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

ในทางทฤษฎีโครงร่างควรมีโครงสร้างและทำหน้าที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกับโครงร่างภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) กล่าวคือโครงสร้างภายนอกเซลล์เป็นโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยโปรตีน (Protein) ที่มีความซับซ้อน และมีหน้าที่ที่สำคัญคือเป็นโครงร่างให้เซลล์เกิดการยึดเกาะหรือเปรียบเสมือนที่อยู่อาศัยของเซลล์ โดยไหมถือว่าเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่าไฟโบรอินโปรตีน จึงทำให้ไหมมีโครงสร้างภายในที่คล้ายคลึงกับโครงร่างภายนอกเซลล์ [16, 97] ตามลำดับ ดังนั้นการเติมไหมลงไปโครงร่างรองรับเซลล์ที่สร้างจากกระบวนการไมโครบับเบิลจึงนำไปสู่การเกิดเป็นโครงร่างสามมิติจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมที่ลักษณะจำลอง และเลียนแบบโครงร่างภายนอกเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ซึ่งโครงร่างที่ผลิตได้จะมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ 2 ลักษณะ คือ ส่วนที่มีลักษณะเป็นโพนที่ติดอยู่กับส่วนที่มีลักษณะเป็นฟิล์ม โดยความเข้มข้นของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ใช้จะคงที่อยู่ที่ 21% w/v ไม่มีสารเคมีหรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการขึ้นรูป และความเข้มข้นของสารละลายไหมจะแตกต่างกันคือ 1, 3 และ 5% w/v ตามลำดับ โครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้นั้นจะได้รับหลังจากแช่แข็งในช่องแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการทำแห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เพื่อให้โครงร่างนั้นยังสามารถคงรูปทรงอยู่ได้โดยไม่ทำให้รูพรุนภายในเกิดความเสียหายและไม่ให้ไหมเกิดการหดตัว

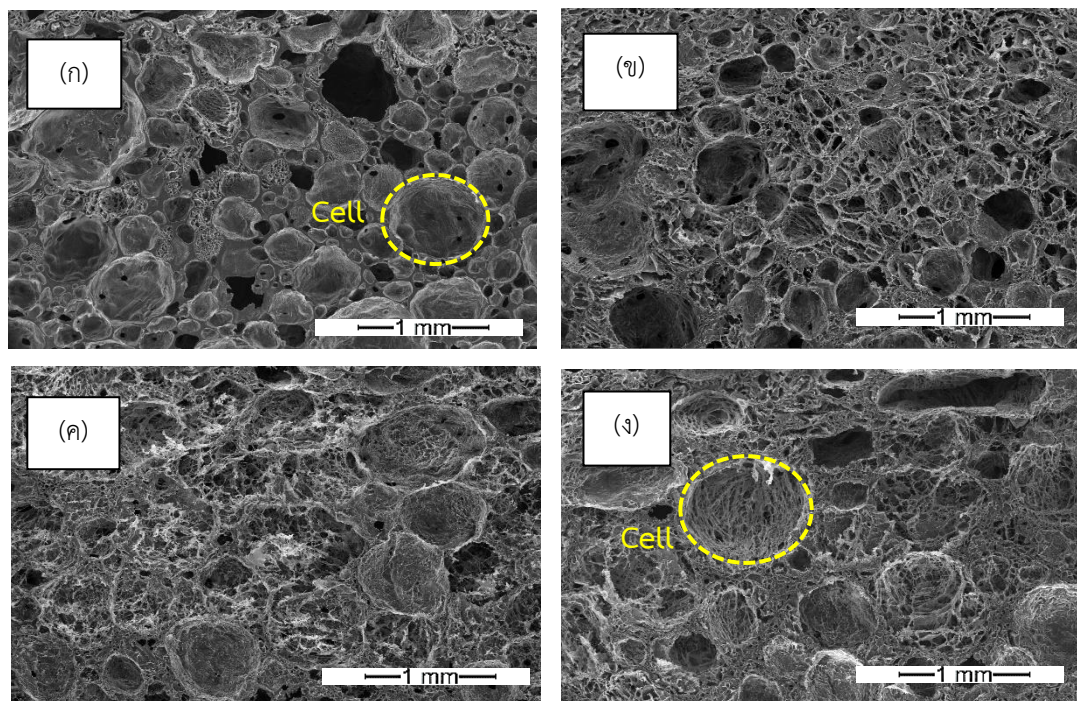


รูปที่ 4.9 ตัวอย่างภาพถ่ายของโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมไหมที่ผลิตได้จากความเข้มข้นต่างๆ
 (ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม 3% w/v
 และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v ตามลำดับ

(2) โครงสร้างทางจุลภาคของโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

รูปที่ 4.10, 4.11 และ 4.12 แสดงภาพโครงสร้างทางจุลภาคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมไหมที่ผลิตได้จากความเข้มข้นของสารละลายไหมที่แตกต่างกัน พบว่าโครงสร้างที่ได้นั้นมีรูพรุนเกิดขึ้นจำนวนมากและรูพรุนภายในมีการเชื่อมต่อกัน โดยแต่ละเซลล์นั้นยังประกอบด้วยรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมากอยู่ภายใน และลักษณะของโครงสร้างไม่ได้มีความแตกต่างกันมากคือ มีทั้งส่วนที่เป็นฟิล์มและส่วนที่เป็นรูพรุนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมกับไหม (รูปที่ 4.11, ก, ข, ค และ ง) จากผลที่ได้สังเกตได้ว่าเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายไหมเพิ่มขึ้นผิวของเซลล์และรูพรุนที่เกิดขึ้นนั้นมีความขรุขระมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.10 (ก และ ง) จากภาพเห็นได้ชัดว่าเมื่อมีการเติมสารละลายไหมลงไปผิวของเซลล์และรูพรุนมีความขรุขระมากขึ้น และมีลักษณะเหมือนเส้นใยมาเกาะอยู่บนผิว ซึ่งนับว่าเป็นผลดีคือจะช่วยเพิ่มพื้นผิวที่ขรุขระให้แก่โครงสร้างทำให้เซลล์มีพื้นที่ในการยึดเกาะมากขึ้นและการที่พื้นผิวมีเส้นใยของไหมมาเกาะนั้นยังสามารถแก้ปัญหา

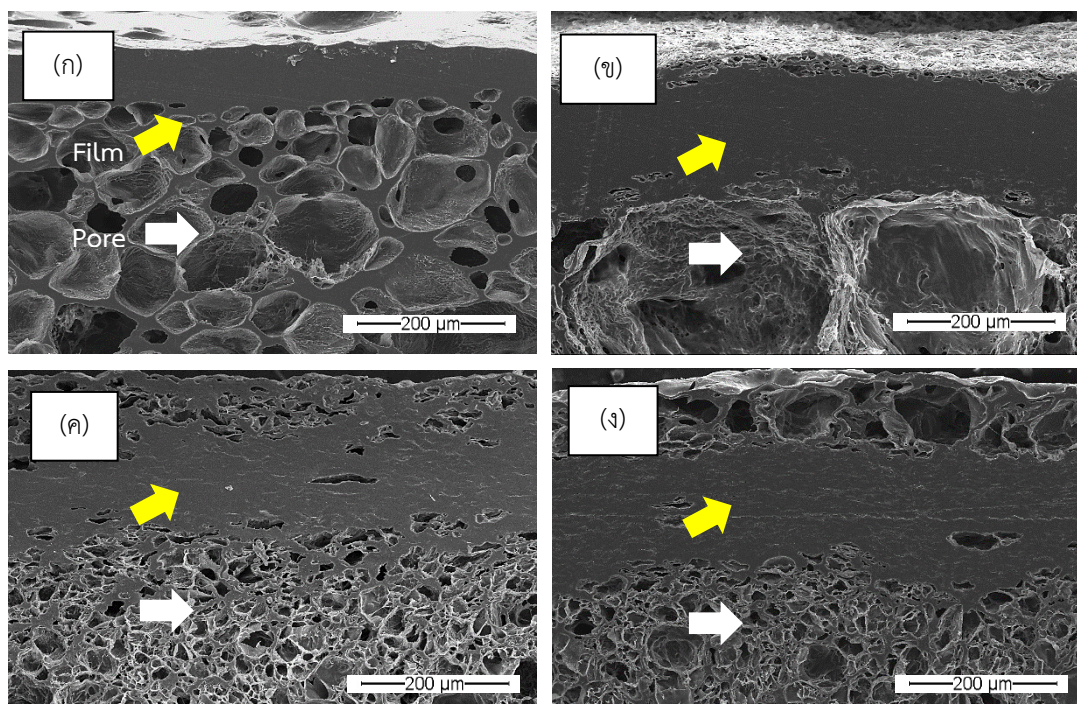
ข้อบกพร่องของผนังเซลล์รูพรุนได้ [18] การผลิตโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมไหมลักษณะเซลล์ที่ได้มีลักษณะค่อนข้างเป็นทรงกลม และกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 ภาพตัดขวางโครงสร้างทางจุลภาคของโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมไหมที่ผลิตได้จากความเข้มข้นต่างๆ (ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม 3% w/v และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v วงกลมสีเหลืองแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของเซลล์ของโครงสร้างที่ไม่ผสมไหมกับโครงสร้างที่ผสมไหม ตามลำดับ

โดยหลังจากการเติมไหมลงไปนั้นจะช่วยให้ลักษณะของเซลล์และรูพรุนของโครงสร้างเป็นทรงกลมมากขึ้นกว่าโครงสร้างที่ไม่ได้เติมไหมลงไป ซึ่งโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นทรงกลมนี้เกิดจากการยึดเกาะของไหมไฟโบรอินที่บริเวณผนังของเซลล์และรูพรุน (รูปที่ 4.10, ข, ค และ ง) แสดงให้เห็นว่าลักษณะของเซลล์และรูพรุนของโครงสร้างเป็นทรงกลมมากขึ้นเมื่อเทียบกับโครงสร้างที่ไม่ได้เติมไหม (รูปที่ 4.10, ก) ตามลำดับ นอกจากนี้การเติมไหมไฟโบรอินลงไปในโครงสร้างยังทำให้เกิดเป็นเครือข่ายที่จับตัวกันอย่างหลวมๆ ในเซลล์และรูพรุน และจับตัวกันระหว่างเซลล์ ตามลำดับ ซึ่งโครงข่ายหลวมๆ นี้แสดงลักษณะเหมือนโครงสร้างภายนอกเซลล์ของเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์ที่ทำหน้าที่เปรียบเสมือนโครงสร้างให้เซลล์ยึดเกาะและเป็นพื้นที่ให้เซลล์เกิดการเคลื่อนย้ายถิ่นฐาน โดยโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ความเข้มข้นของสารละลายไหม 5% w/v แสดงให้เห็นถึงโครงข่ายที่หนาแน่นที่ครอบคลุมทั้งเซลล์

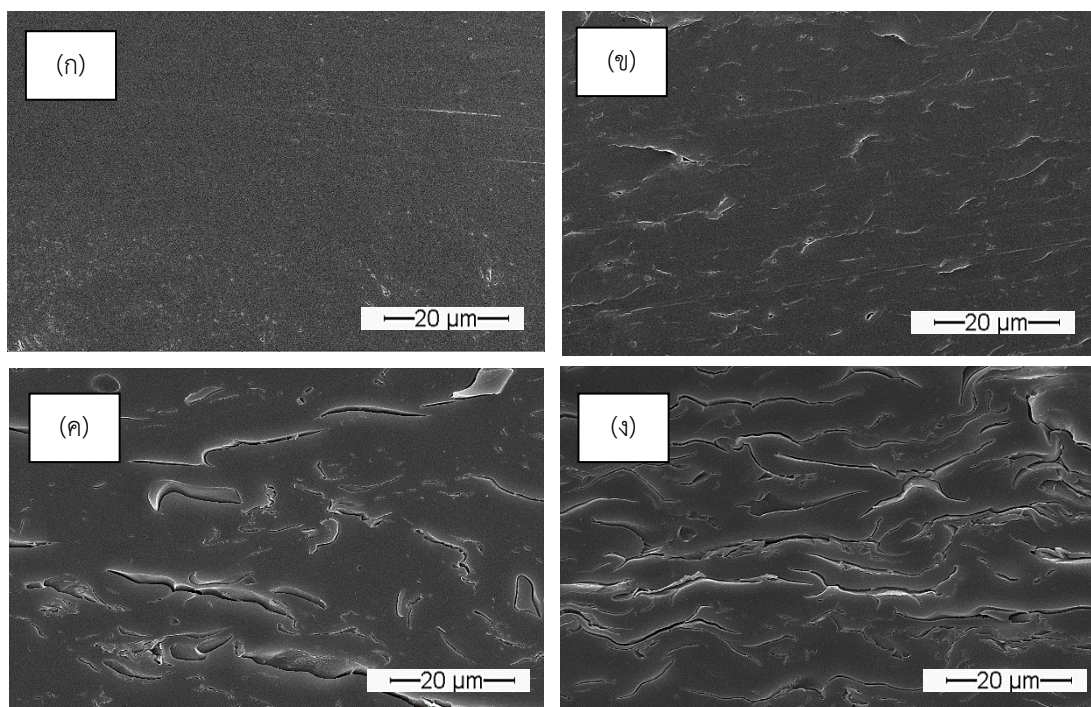
และรูพรุน เพราะฉะนั้นจึงถือได้ว่าเป็นโครงสร้างที่มีการเลียนแบบโครงสร้างภายนอกเซลล์ได้ดีกว่าที่โครงสร้างที่ความเข้มข้นอื่นๆ (รูปที่ 4.10, ง) และเมื่อนำไปประยุกต์ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ กระดูกโครงสร้างที่มีลักษณะดังกล่าวนี้จะนับว่าเป็นผลดีต่อการยึดเกาะของเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่บนโครงสร้างรองรับเซลล์ [77]



รูปที่ 4.11 ภาพตัดขวางของโครงสร้างทางจุลภาคของโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมไหมที่แบ่งออกเป็นสองส่วน (ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม 3% w/v และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v ลูกศรแสดงส่วนที่เป็นชั้นฟิล์ม และส่วนที่เป็นรูพรุน ตามลำดับ

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถบ่งชี้ได้ว่าโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมไหมไฟเบอร์อินที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไหมเพิ่มขึ้นจะทำให้พื้นผิวของเซลล์และรูพรุนมีความขรุขระมากขึ้น และเกิดเป็นโครงข่ายอย่างหลวมๆ เชื่อมต่อกันภายในโครงสร้าง โดยการประยุกต์ใช้กระบวนการไมโครบับเบิลในการขึ้นรูปโครงสร้างรองรับเซลล์นั้นสามารถทำให้ไหมเกิดการกระจายตัวอย่างทั่วถึงทั้งชิ้นงานไม่ว่าจะเป็นส่วนที่เป็นฟิล์มหรือส่วนที่เป็นรูพรุน (รูปที่ 4.12, ก, ข, ค และ ง)

ตามลำดับ และนอกจากนี้การเชื่อมต่อกันระหว่างส่วนที่เป็นฟิล์มและส่วนที่เป็นรูพรุนนั้นสามารถเชื่อมต่อกันได้โดยไม่ต้องใช้สารตัวอื่นช่วยในการยึดติด [80]



รูปที่ 4.12 ภาพตัดขวางของโครงสร้างทางจุลภาคของโครงร่างรองรับเซลล์ผสมไหมในส่วนที่เป็นฟิล์ม
(ก) ไม่เติมไหม, (ข) ความเข้มข้นไหม 1% w/v, (ค) ความเข้มข้นไหม
3% w/v และ (ง) ความเข้มข้นไหม 5% w/v ตามลำดับ

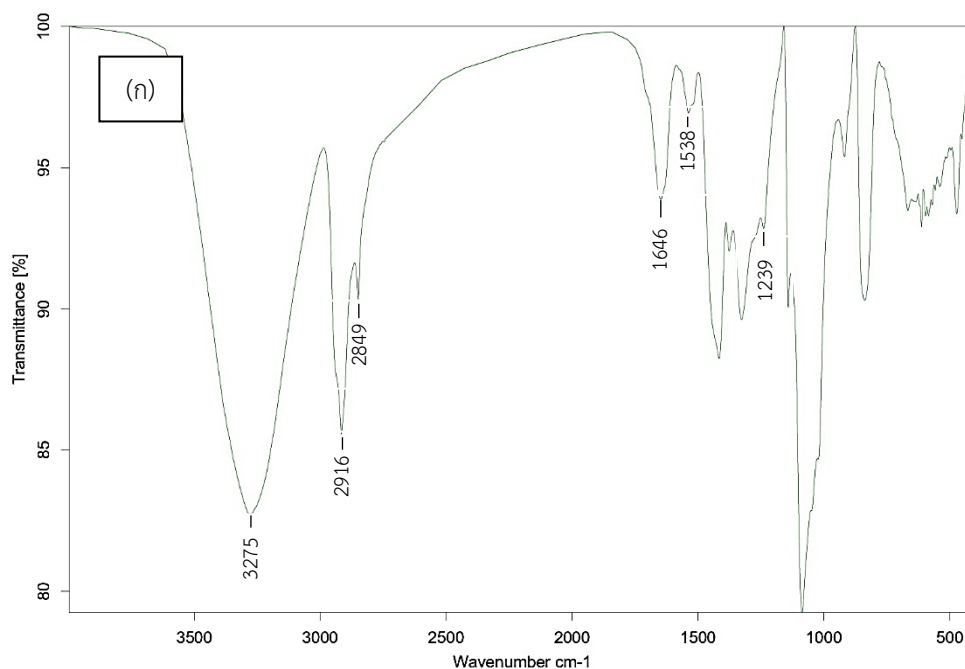
(3) การวิเคราะห์การกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสงช่วงอินฟราเรดของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม (Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR))

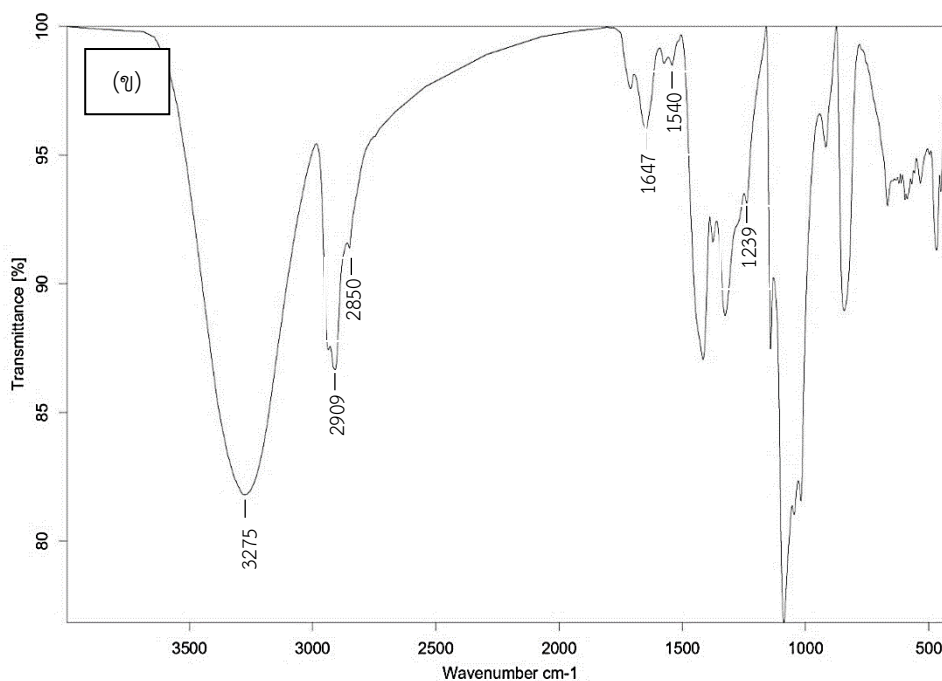
การวิเคราะห์การกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสงช่วงอินฟราเรดเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาหาหมู่ฟังก์ชันของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม โดยการวิเคราะห์จะเลือกวิเคราะห์โครงร่างที่ผสมไหมลงไป 5% w/v แบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วนคือ วิเคราะห์ส่วนที่เป็นฟิล์มและวิเคราะห์ส่วนที่เป็นรูพรุน ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดง ดังรูปที่ 4.13 (ก และ ข) สำหรับการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ปรากฏพีคสัญญาณ (Vibration peak) ที่สำคัญอยู่ 2 ช่วงดังนี้ ช่วงแรกคือช่วงเลขคลื่น (Wavenumber) ที่ $3550 - 3200$ เซนติเมตร⁻¹ เป็นสัญญาณที่

ได้มาจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) [98] ช่วงสัญญาณที่สองคือช่วงเลขคลื่นที่ 3000 – 2840 เซนติเมตร⁻¹ เป็นสัญญาณที่ได้มาจากหมู่แอลคิล (Alkyl) ซึ่งเกิดจากพันธะคาร์บอนเชื่อมกับไฮโดรเจน (C – H) ตามลำดับ

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไหมที่ผสมลงไปในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาว่าไหมได้ผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์จริงหรือไม่ โดยปกติไหมจัดว่าเป็นสารประกอบที่อยู่ในรูปของโปรตีน ซึ่งพิกสัญญาณที่ปรากฏจะเป็นหมู่ฟังก์ชันจำพวกอะมิโน (Amino) โดยมีสารประกอบอินทรีย์ที่ปรากฏพิกสัญญาณเป็นช่วงดังนี้ ช่วงเลขคลื่นที่ 1650 – 1630 เซนติเมตร⁻¹ เป็นสารประกอบจำพวกเอไมด์ปฐมภูมิ (Primary amide), ช่วงเลขคลื่นที่ 1540 – 1520 เซนติเมตร⁻¹ เป็นสารประกอบจำพวกเอไมด์ทุติยภูมิ (Secondary amide) และช่วงเลขคลื่นที่ 1270 – 1230 เซนติเมตร⁻¹ เป็นสารประกอบจำพวกเอไมด์ตติยภูมิ (Tertiary amide) [99 , 100] ตามลำดับ

จากผลข้างต้นเห็นได้อย่างชัดเจนว่าโครงสร้างรองรับเซลล์ทั้งสองส่วนคือส่วนฟิล์มกับส่วนรูพรุนมีหมู่ฟังก์ชันที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันมาก (รูปที่ 4.13, ก และ ข) และการที่ปรากฏช่วงพิกสัญญาณหรือช่วงหมู่ฟังก์ชันระหว่างไหมและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ในโครงสร้างยังช่วยยืนยันได้ว่า พอลิไวนิลแอลกอฮอล์และไหมได้ผสมกันอยู่ในโครงสร้างรองรับเซลล์ที่สร้างขึ้น ตามลำดับ





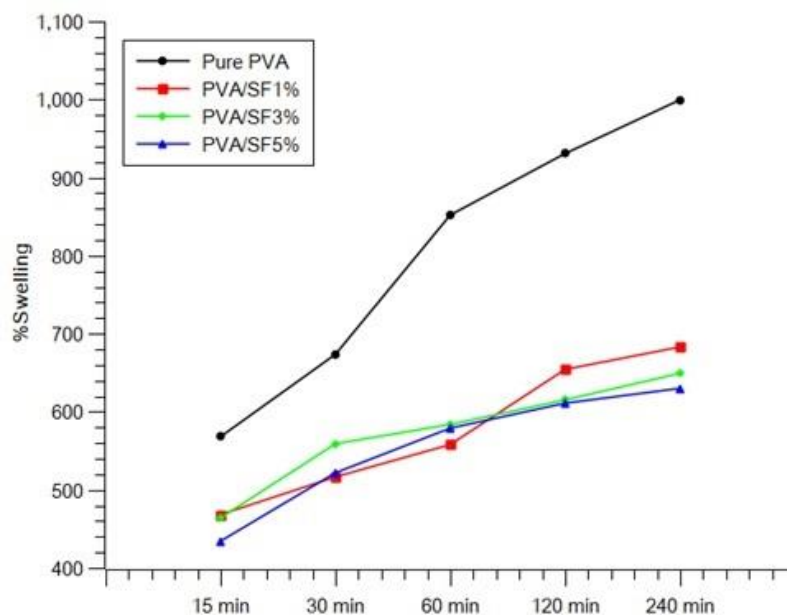
รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างรองรับเซลล์ผสมไหม
(ก) ส่วนที่เป็นฟิล์ม และ (ข) ส่วนที่เป็นรูพรุน ตามลำดับ

(4) สมบัติการบวมตัวของโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

การทดสอบสมบัติการบวมจะเริ่มทดสอบจาก 15 นาทีถึง 240 นาที โดยการบ่มโครงสร้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.14 พบว่าเปอร์เซ็นต์การบวมตัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง 15 นาทีแรกจนถึง 30 นาที แต่พบว่าโครงสร้างที่มีเปอร์เซ็นต์การบวมตัวมากที่สุดคือโครงสร้างที่ไม่ได้ผสมไหม โครงสร้างที่ความเข้มข้นไหม 1 และ 5% w/v มีเปอร์เซ็นต์การบวมตัวที่ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมาก แต่มีค่าต่ำกว่าโครงสร้างที่ความเข้มข้นไหม 3% w/v โดยแนวโน้มการบวมตัวของโครงสร้างในระยะเวลา 15 ถึง 30 นาทีแรกๆของทุกโครงสร้างมีแนวโน้มค่อนข้างไปในทางเดียวกันคือ มีค่าเปอร์เซ็นต์การบวมตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 60 นาที พบว่าโครงสร้างที่ความเข้มข้นไหม 1% w/v กลับมีค่าเปอร์เซ็นต์การบวมที่ลดลงต่ำกว่าโครงสร้างที่ความเข้มข้นไหม 3 และ 5% w/v แต่กลับมีค่าเปอร์เซ็นต์การบวมตัวเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อระยะเวลาผ่านไป 120 นาที จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าโครงสร้างที่ไม่ผสมไหมนั้นมีเปอร์เซ็นต์การบวมที่สูงสุดเมื่อเทียบกับโครงสร้างกลุ่มอื่นในทุกช่วงเวลา และโครงสร้างที่

ผสมใหม่ความเข้มข้น 5% w/v เป็นโครงสร้างที่มีเปอร์เซ็นต์การบวมตัวที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับโครงสร้างกลุ่มอื่น ตามลำดับ

จากการกล่าวข้างต้นสามารถวิเคราะห์ผลได้ว่า โดยทั่วไปแล้วนั้นโครงสร้างภายในของใหม่ประกอบไปด้วยโปรตีนที่มีสายโซ่โมเลกุลหลักๆ อยู่ 2 ชนิดคือ สายโซ่โมเลกุลหนัก (Heavy chain: H - chain) มวลโมเลกุลประมาณ 390 กิโลดัลตัน และสายโซ่โมเลกุลเบา (Light chain: L - chain) มวลโมเลกุลประมาณ 26 กิโลดัลตัน และนอกจากนี้ในสายโซ่โมเลกุลดังกล่าวยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เด่นๆ อยู่ 3 ชนิดคือ ไกลซีน (Glycine), อะลานีน (Alanine) และเซอรีน (Serine) ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะเป็นส่วนประกอบที่อยู่ในสายโซ่โมเลกุลของใหม่ สายโซ่โมเลกุลหนักกรดอะมิโนจะเรียงตัวกันแบบซ้ำไปซ้ำมา จึงส่งผลให้ใหม่แสดงลักษณะที่ไม่ชอบน้ำออกมา ซึ่งตรงกันข้ามกับสายโซ่โมเลกุลเบาที่กรดอะมิโนจะเรียงตัวกันแบบไม่ซ้ำ จึงทำให้ใหม่แสดงลักษณะที่ชอบน้ำออกมา แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากมวลโมเลกุลของสายโซ่โมเลกุลในใหม่แล้วนั้นพบว่าสายโซ่โมเลกุลหนักมีมวลโมเลกุลที่มากกว่า ด้วยสาเหตุนี้ใหม่จึงแสดงลักษณะที่ไม่ชอบน้ำออกมามากกว่า ดังนั้นโครงสร้างที่ความเข้มข้นใหม่ 5% w/v จึงมีความสามารถในการบวมตัวที่ต่ำที่สุด เพราะเป็นโครงสร้างที่มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายใหม่มากกว่าโครงสร้างกลุ่มอื่น จึงทำให้โครงสร้างมีความสามารถในการบวมตัวน้อยที่สุดตามไปด้วย [101, 102] ในทางทฤษฎีงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะถือว่าโครงสร้างที่บวมตัวได้ดีจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถของโครงสร้างที่ยอมให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ และความสามารถในการยอมให้อากาศและสารอาหารแทรกซึมผ่านเข้าไปในโครงสร้างเพื่อกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโต โดยทั้งนี้จะต้องดูผลวิเคราะห์ทางชีวภาพตามไปด้วยว่าโครงสร้างใดเหมาะสมสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ



รูปที่ 4.14 กราฟเปอร์เซ็นต์การบวมตัวของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากบ่มในสารละลายฟอสเฟส บัฟเฟอร์ซาลีนเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

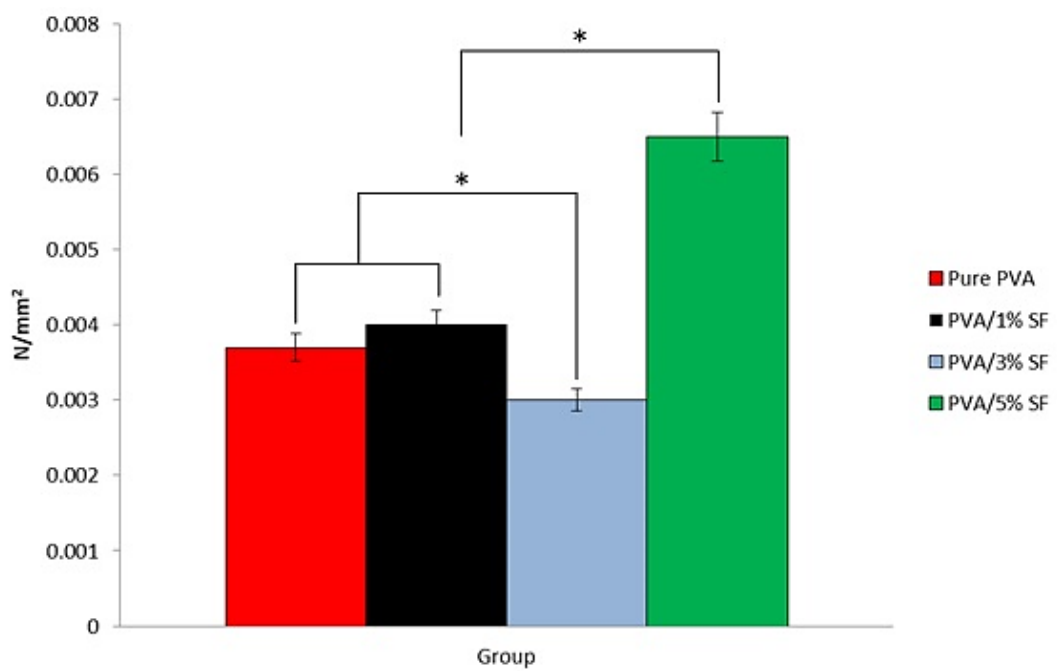
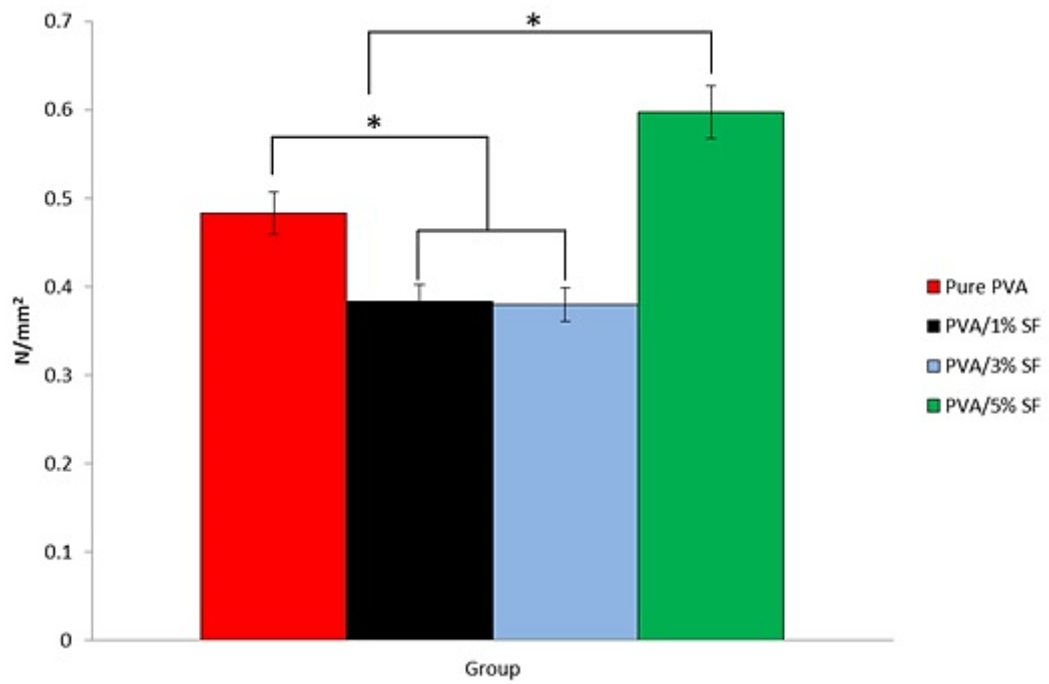
(5) สมบัติทางกลของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

สมบัติเชิงกลของโครงร่างนั้นนับว่าเป็นตัวชี้แจงสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของกระดูก โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างโครงร่างรับเซลล์ผสมไหมเพื่อทำการปรับปรุงสมบัติทางกลของโครงร่างให้มีประสิทธิภาพในการใช้งานมากขึ้น ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ทั้งในสภาวะแห้งและสภาวะเปียก ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.14 ในสภาวะแห้งโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 5% w/v มีความสามารถในการรับแรงอัดสูงกว่าโครงร่างที่ความเข้มข้นไหมอื่นอย่างเห็นได้ชัด และโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 1 และ 3% w/v มีความสามารถในการรับแรงอัดเท่ากัน ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการรับแรงอัดเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไหมเพิ่มขึ้น [77] แต่ในทางกลับกันโครงร่างที่ไม่ผสมไหมกลับมีความสามารถในการรับแรงอัดที่สูงกว่าโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 1 และ 3% w/v ตามลำดับ เนื่องจากโครงร่างที่ไม่ผสมไหมเป็นโครงร่างที่มีเชื่อมต่อกันของรูพรุนอยู่ในระดับต่ำทำให้มีความพรุนต่ำมีความยืดหยุ่นน้อย จึงส่งผลให้ความสามารถในการรับแรงอัดที่ได้สูงกว่าโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 1 และ 3% w/v แม้ว่าความพรุนต่ำนี้จะช่วยเพิ่มสมบัติทางกลของ

โครงสร้างทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรงอัดได้มากขึ้น [91] แต่เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่ความเข้มข้นใหม่ 5%w/v กลับพบว่าความสามารถในการทนแรงอัดมีค่ามากกว่าอย่างเห็นได้ชัด ตามลำดับ

ความแข็งแรงเชิงกลของโครงสร้างในสภาวะเปียกนั้นทำขึ้นเพื่อจำลองสภาพภายในร่างกายของมนุษย์เมื่อนำโครงสร้างเข้าสู่ร่างกาย ในสภาวะเปียกโครงสร้างทั้งหมดจะมีความสามารถในการทนแรงอัดที่ต่ำกว่าโครงสร้างแบบแห้ง เนื่องจากโครงสร้างได้มีการดูดซับของเหลวเข้าไป โดยกำลังอัดสูงสุดสำหรับโครงสร้างแบบเปียกคือ โครงสร้างที่ความเข้มข้นใหม่ 5% w/v เป็นโครงสร้างที่มีกำลังอัดสูงชันอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับโครงสร้างกลุ่มอื่น ดังนั้นการเติมใหม่ที่ความเข้มข้น 5% w/v สามารถเพิ่มความสามารถในการทนแรงอัดได้ทั้งในสภาวะแห้งและสภาวะเปียก ในทางตรงกันข้ามในสภาวะเปียกโครงสร้างที่ความเข้มข้นใหม่ 3% w/v เป็นโครงสร้างที่มีค่ากำลังแรงอัดต่ำที่สุด ทั้งนี้สามารถสันนิษฐานได้ว่าโครงสร้างดังกล่าวสามารถดูดซับของเหลวได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงสร้างในกลุ่มอื่น จึงทำให้มีค่ากำลังอัดที่ต่ำตามลงไปด้วย [77]

ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของความเข้มข้นของสารละลายใหม่ไฟโบรอินที่มีผลต่อสมบัติเชิงกลของโครงสร้างแบบแห้งและแบบเปียก ซึ่งเป็นผลมาจากเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายใหม่ที่ได้ผสมลงไปในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันโดยค่าแรงอัดต่ำนั้นเกิดจากการที่โครงสร้างดูดซับน้ำเข้าไปจำนวนมาก ซึ่งสาเหตุที่โครงสร้างที่ผสมใหม่มีความโดดเด่นทางด้านสมบัติเชิงกลเพราะโครงสร้างภายในของใหม่เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเอกลักษณ์กล่าวคือเป็นโครงสร้างที่เป็นผลึกแบบเบต้าชีท (β - sheet crystalline rich structure) ส่งผลให้ใหม่ไฟโบรอินนั้นมีความแข็งแรงสูง (High stiffness) และมีความเหนียวมาก (High toughness) ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้โครงสร้างที่ผสมใหม่ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นสูงจึงมีค่าสมบัติเชิงกลที่สูงกว่าโครงสร้างแบบอื่น [103] ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างที่มีการผสมใหม่นั้นจะช่วยเพิ่มหรือปรับปรุงสมบัติเชิงกลของโครงสร้างรองรับเซลล์ได้ [100, 104] แต่ทั้งนี้จะต้องวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพเพิ่มเติมด้วยเพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานนี้



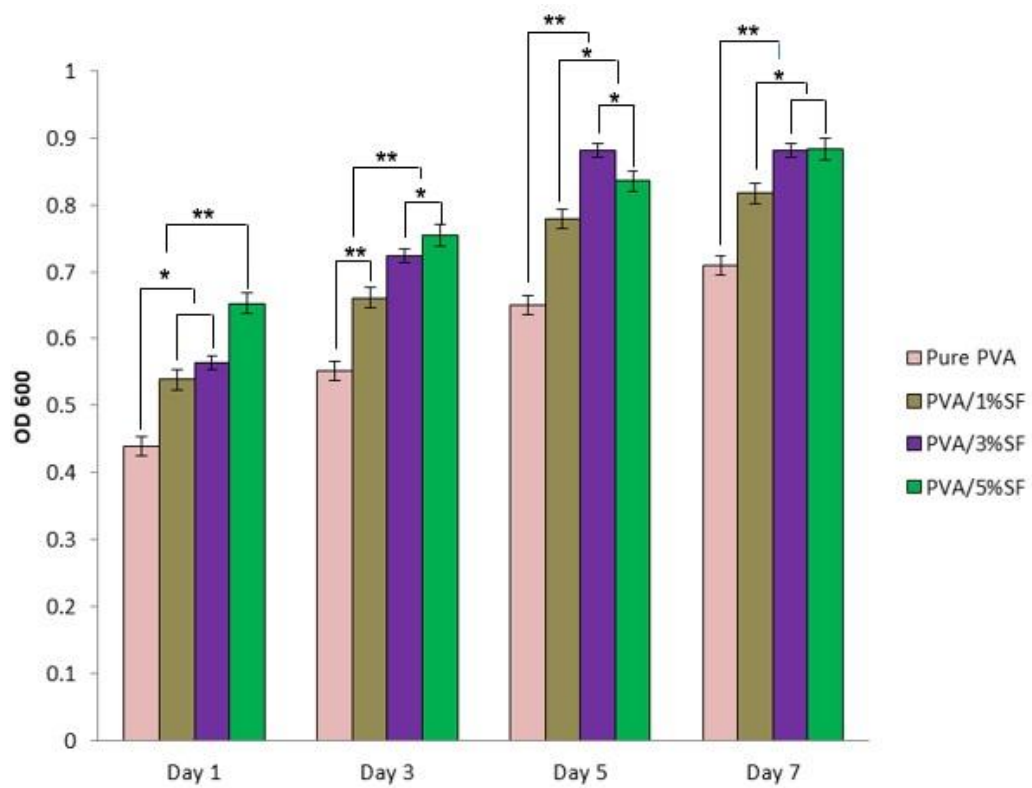
รูปที่ 4.15 ผลกำลังอัดของโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผลิตได้จากความเข้มข้นไหมที่แตกต่างกัน
ภายใต้ (ก) สภาวะแห้ง และ (ข) สภาวะเปียก ตามลำดับ

4.2.2. สมบัติทางชีวภาพของโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

(1) การเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

การเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างรองรับเซลล์ผสมไหมที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการวิเคราะห์หลังจากผ่านการเลี้ยงเซลล์บนโครงร่างแล้วในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ตามลำดับ วิเคราะห์ด้วยสาร PrestoBlue reagent ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.15 ผลที่ได้มีดังนี้ ในวันที่ 1 โครงร่างที่ไม่ผสมไหม แสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่ำกว่าโครงร่างกลุ่มอื่นและโครงร่างที่ผสมไหม 5% w/v มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงกว่าโครงร่างกลุ่มอื่น โครงร่างที่ผสมไหม 1 และ 3% w/v จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันมาก ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 โครงร่างที่ไม่ผสมไหมยังคงมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับโครงร่างกลุ่มอื่น และการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุดพบในโครงร่างที่ผสมไหม 5%w/v ในทางกลับกันการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์บนโครงร่างที่ผสมไหม 5% w/v กลับลดลงในวันที่ 5 โครงร่างที่ผสมไหม 3% w/v กลายเป็นโครงร่างที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุดอย่างเห็นได้ชัด และในวันที่ 7 โครงร่างที่ผสมไหม 3 และ 5% w/v มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ที่ไม่แตกต่างกันมาก โดยที่โครงร่างที่ผสมไหม 5% w/v มีค่าสูงกว่าเพียงเล็กน้อย และสูงกว่าโครงร่างในกลุ่มอื่น (0, 1 และ 3% w/v) ตามลำดับ ซึ่งจากการทดสอบพบว่าโครงร่างที่ไม่ได้มีการผสมไหมนั้นไฟโบรอินนั้นมีค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่ำที่สุดในทุกๆวันของการวิเคราะห์

จากผลข้างต้นพบว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในทุกๆ วันยกเว้นวันที่ 5 ของโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 5% w/v แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่าโครงร่างในกลุ่มอื่นๆ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 5% w/v มีปริมาณความเข้มข้นของไหมมากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงร่างในกลุ่มอื่น ทำให้เกิดเป็นโครงข่ายของไหมที่เชื่อมต่อถึงกันได้ดี และการที่เติมไหมลงไปนั้นจะทำให้โครงร่างที่ได้มีสภาพจำลองเหมือนโครงสร้างภายนอกเซลล์ในร่างกายมนุษย์ และช่วยเพิ่มความขรุขระตรงบริเวณพื้นผิวของรูพรุนและเซลล์ ทำให้ช่วยเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ [105] ส่งผลดีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ [106] ที่ซึ่งสามารถนำไปสู่การฟื้นฟูหรือสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่ดีขึ้นกว่าเดิม [107] ผลการวิเคราะห์จึงสรุปได้ว่าการเติมไหมลงไปโครงร่างรองรับเซลล์นั้นช่วยเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงร่างได้ [77] ดังแสดงในโครงร่างที่ความเข้มข้นไหม 5% w/v ซึ่งเป็นโครงร่างที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในงานฟื้นฟูกระดูกในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ



รูปที่ 4.16 การเพิ่มจำนวนเซลล์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 หลังจากการวิเคราะห์ด้วยสาร PrestoBlue reagent ของโครงสร้างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยที่ได้จัดทำขึ้นนี้แบ่งออกเป็น 2 วัตถุประสงค์ด้วยกันคือ การผลิตโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิล และการผลิตโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลและกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ซึ่งผลการวิจัยที่ได้มีข้อสรุปและข้อเสนอแนะดังนี้

5.1. การผลิตโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการไมโครบับเบิล

ในงานวิจัยนี้ได้เสนอเทคนิคแบบใหม่โดยใช้วิธีการไมโครบับเบิลสำหรับการสร้างโครงร่างรองรับเซลล์แบบ 3 มิติแบบที่มีรูพรุนอยู่ภายในโดยใช้อัตราการไหลที่แตกต่างกัน สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.1.1. วิธีการไมโครบับเบิลนั้นมีศักยภาพในการสร้างโครงร่างแบบรูพรุนโดยการควบคุมอัตราการไหลของอากาศเข้าในพอลิเมอร์หลอมเหลว โดยที่อัตราการไหลเข้าเท่ากับ 100 มิลลิลิตร/นาที หรือโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที เซลล์และรูพรุนที่ได้มีขนาดใหญ่และรูพรุนภายในมีการเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนที่ดี จึงทำให้โครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที แสดงพฤติกรรมบวมและสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

5.1.2. โครงสร้างภายในของโครงร่างที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์, การสังเคราะห์โปรตีน และกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ซึ่งเหมาะสมสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก งานวิจัยแสดงให้เห็นว่าโครงร่างแบบสามมิติที่มีรูพรุนแบบเจาะของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่โครงร่างอัตราการไหลที่ 100 มิลลิลิตร/นาที ที่ใช้เทคนิคไมโครบับเบิลเป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดฟองประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

5.2. การผลิตโครงสร้างรองรับเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหมด้วยกระบวนการไมโครบับเบิลและกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง

ในงานวิจัยนี้ได้เสนอเทคนิคแบบใหม่โดยใช้วิธีการไมโครบับเบิล และวิธีทำแห้งแบบแช่แข็ง สำหรับการสร้างโครงสร้างรองรับเซลล์แบบ 3 มิติที่เกิดจากพอลิเมอร์ 2 ชนิดผสมกันคือพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมกับไหมไฟโบรอินที่มีรูพรุนอยู่ภายในโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายไหมที่แตกต่างกัน สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.2.1. วิธีการไมโครบับเบิลนั้นมีศักยภาพในการสร้างโครงสร้างแบบรูพรุนโดยการควบคุมอัตราการไหลของอากาศเข้าในพอลิเมอร์หลอมเหลวให้อยู่ที่ 200 มิลลิลิตร/นาที และใช้ความเข้มข้นของสารละลายไหมที่เติมลงไปแตกต่างกัน โครงสร้างที่ความเข้มข้นของสารละลายไหม 5% w/v โครงสร้างภายในมีการกระจายตัวของไหมทั่วทั้งชิ้นงานทั้งที่ผิวของเซลล์และผิวของรูพรุนมีความขรุขระสามารถเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ เพราะการใช้กระบวนการไมโครบับเบิลนั้นทำให้ไหมเกิดการกระจายตัวได้อย่างทั่วถึง ขนาดของรูพรุนที่ได้มีขนาดใหญ่และขนาดเล็กปะปนกัน ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อีกทั้งโครงสร้างที่ผลิตได้ยังมีรูปร่างของรูพรุนที่ได้จากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง และจากกระบวนการไมโครบับเบิลผสมกัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังปรากฏหมู่ฟังก์ชันของไหม และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ในโครงสร้างที่ผลิตได้ มีสมบัติการบวมตัว และสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกทั้งชิ้นงานในส่วนของฟิล์มและส่วนของรูพรุน

5.2.2. ความเข้มข้นของสารละลายไหมที่ 5%w/v ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งเหมาะสมสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก งานวิจัยแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างแบบสามมิติที่มีรูพรุนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมไหม โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่โครงสร้างที่ความเข้มข้นไหม 5%w/v ที่ใช้เทคนิคไมโครบับเบิลเป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดฟองและทำแห้งโดยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่แข็ง ประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

5.3. ข้อเสนอแนะ

5.3.1. การละลายสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ก่อนการนำมาขึ้นรูปขึ้นงานควรจะควบคุมอุณหภูมิให้คงที่อยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส และกวนให้อยู่ในระดับความเร็วที่คงที่อยู่เสมอเพื่อให้เม็ดพอลิเมอร์สามารถละลายได้ทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน

5.3.2. เพื่อความปลอดภัยในการนำโครงร่างรองรับเซลล์ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น ควรหลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารเติมแต่งอื่นๆ มาผสมในการขึ้นรูปโครงร่างรองรับเซลล์

5.3.3. ในส่วนของการเติมสารละลายใหม่ลงไปโครงร่างรองรับเซลล์ควรทำการไล่ความชื้นหรือน้ำในโครงร่างรองรับเซลล์โดยวิธีทำแห้งแบบแช่แข็งไม่ควรใช้วิธีอบแห้งโดยเตาอบเพราะทำให้ใหม่ไม่สามารถคงรูปอยู่ได้เมื่อเจอความร้อนทำให้โครงร่างที่ได้หดรตัวไม่สามารถคงรูปอยู่ได้

บรรณานุกรม

- [1] ไผ่ ทิมาศาสตร์. 2555. การเตรียมและการศึกษาวัสดุเสริมองค์ประกอบระหว่างพอลิเมอร์ผสม และ Bioglass สำหรับการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก, วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ, มหาวิทยาลัยศิลปากร
- [2] K. K. G. Lizárraga, C. F. Morales, M. L. D. P. Audelo, M. A. Á. Pérez, M. C. P. Barba and C. Escobedo. 2017. Polycaprolactone - and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioplotted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. *Materials Science and Engineering C* 79: 326-335
- [3] X. Liu and P. X. Ma. 2004. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering* 32 (3): 477-486
- [4] H. Janik, and M. Marzec: A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds, *Materials Science and Engineering C* Vol. 48 (2015), p. 586-591
- [5] H. W. Kim, J. C. Knowles and H. E. Kim. 2004. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *Wiley Periodicals, Inc*: 136-145
- [6] E. Reverchon and S. Cardea. 2014. Nanostructured polymers for scaffolding applications: 1-4
- [7] J. Wu and Y. Hong. 2016. Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration. *Bioactive Materials*: 56-64
- [8] T. Parivatphun, B. Nooklay, R. Kokoo, J. Meesane, K. Kooptarnond and M. Khangkhamano. 2019. Fabrication of Bioscaffolds Using Bubbling Technique for Bone Tissue Engineering. *Materials Science Forum*: 125-128
- [9] www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials (สืบค้นเมื่อ 29 มกราคม 2562)
- [10] www.orzo.union.edu/.../L1%20-%20Introduction%20to%20Biomaterials.pdf (สืบค้นเมื่อ 29 มกราคม 2562)
- [11] H. F. Hildebrand. (2013). Biomaterials – a history of 7000 years. *BioNanoMat* 14: 119 - 133

- [12] [https://secant.com/technology/biomedical technology/implantable - biomaterials](https://secant.com/technology/biomedical%20technology/implantable%20-%20biomaterials) (สืบค้นเมื่อ 29 มกราคม 2562)
- [13] <https://www.slideshare.net/manishamanoharan/biomaterials-an-overview> (สืบค้นเมื่อ 29 มกราคม 2562)
- [14] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa and D. Sakthi Kumar. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*: 1-19
- [15] ประสงค์ สีหนาม. 2552. วัสดุที่ย่อยสลายด้วยกระบวนการชีวภาพสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 14(2): 118-127
- [16] จิรัฐ มีเสน. 2558. โครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อจากวัสดุพอลิเมอร์. สงขลา: หสม.บัยตุลพรีนติ้ง.
- [17] L. W. Chow. 2015. An Introduction to Tissue Engineering, (October). https://www.lehigh.edu/~inbios21/PDF/Fall2015/Chow_10302015.pdf
- [18] W. Sangsirinakagul and T. Damrongrungruang: Fabrication of Three-dimensional Scaffold from Thai Silk Fibroin by Solvent Casting and Particulate Leaching Technique with Sucrose as a Porogen. <https://gsbooks.gs.kku.ac.th/51/gradresearch10/file/MMO1.pdf>
- [19] เบญจารีย์ พุ่มศิริ: An In-vitro Study of Coating Bioactive Agents onto Scaffolds Prepared from Poly (butylene succinate) and Comparative Study and Simulation of Rapid Prototyping Technique, ภาควิชาวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- [20] I. Sabree, J. E. Gough and B. Derby. 2015. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions. *Ceramics International* 41: 8425-8432
- [21] H. Patel, M. Bonde and G. Srinivasan. 2011. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. *Trends Biomater. Artif. Organs* 25(1): 20-29
- [22] F. J. O. Brien. 2011. Biomaterial and scaffolds for tissue engineering. *Materialstoday* 14(3): 88-95
- [23] G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond and D. L. Kaplan. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401-416
- [24] สุธิดา คงทอง. 2552. ไคติน-ไคโตซาน. *วารสารวิชาการอุตสาหกรรมศึกษา* 3 (1): 1-7

- [25] M. E. Hoque, T. Nuge, T. K. Yeow, N. N. and R. G. S. V. Prasad. 2015. Gelatins based scaffold for tissue engineering- A review. *Polymer Research Journal* 9(1): 15-32
- [26] E. Göktü and H. Erdal. 2017. Biomedical applications of polyglycolic acid (PGA). *Sakarya University Journal of Science* 21(6): 1237-1244
- [27] <https://en.wikipedia.org/wiki/Polyglycolide> (สืบค้นเมื่อ 5 กุมภาพันธ์ 2562)
- [28] M. Savioli Lopes, A. L. Jardini and R. Maciel Filho. 2012. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. *Procedia Engineering* 42: 1402-1413
- [29] <https://enchemcom1po.wordpress.com/bioplastics-pla-polylactic-acid> (สืบค้นเมื่อ 5 กุมภาพันธ์ 2562)
- [30] นพวรรณ ชัญญพานิช. 2557. แผ่นเส้นใยนาโนจากพอลิคาโพรแลคโตน. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ* 24(1): 189-197
- [31] X. Qin and D. Wu. 2012. Effect of different solvents on poly (caprolactone) (PCL) electrospun nonwoven membranes. *J Therm Anal Calorim* 107: 1007-1013
- [32] <http://www.polysciences.com> (สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2562)
- [33] J. Zhu. 2010. Bioactive modification of poly (ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 31: 4639-4556
- [34] www.lib.ku.ac.th/KUCONF/2555/KC4905060.pdf (สืบค้นเมื่อ 13/2/2562)
- [35] <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=46793> (สืบค้นเมื่อ 13/2/2562)
- [36] M. S. Enayati, T. Behzad, P. Sajkiewicz, M. Rafienia, R. Bagheri, L. G. Mobarakeh, D. Kolbuk, Z. Pahlevanneshan and S. H. Bonakdar. **2018**. Development of electrospun poly (vinyl alcohol)-based bionanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Society for biomaterials* 106A: 1111-1120
- [37] S. Jiang, S. Liu and W. Feng. 2011. PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 4: 1228-1233
- [38] I. M. E. Sherbiny and M. H. Yacoub. 2013. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice* 38: 317-342
- [39] www.extremetech.com/extreme/215033-new-hydrogel-can-keep-stem-cells-alive-for-heart-repair (สืบค้นเมื่อ 27 กุมภาพันธ์ 2562)

- [40] M. Hosseinkhani, D. Mehrabani, M. H. Karimfar, S. Bakhtiyari, A. Manaf and R. Shirazi. 2014. Tissue Engineered Scaffolds in Regenerative Medicine. *www.wjps.ir* 3(1): 3-7
- [41] C. Xu, F. Yang, S. Wang and S. Ramakrishna. 2004. In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. *Wiley InterScience*: 154-161
- [42] J. Liu, B. D. Lawrence, A. Liu, I. R. Schwab, L. A. Oliveira and M. I. Rosenblatt. 2012. Silk Fibroin as a Biomaterial Substrate for Corneal Epithelial Cell Sheet Generation. *IOVS* 53(7): 4130-4138
- [43] Q. Li Loh, and C. Choong. 2013. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *TISSUE ENGINEERING: Part B* 19(6): 485-502
- [44] A. R. P. D. Silva, T. L. Macedo, D.J. Coletta, S. Feldman and M. D. M. Pereira. 2016. Synthesis, characterization and cytotoxicity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Bioactive Glass hybrid scaffolds obtained by lyophilization. *Revista Matéria* 21(4): 964 – 973
- [45] S. U. Maheshwari, S. V. Kumar, N. Nagiah and T. S. Uma. 2013. Electrospinning of polyvinylalcohol–polycaprolactone composite scaffolds for tissue engineering applications. *Polym. Bull.* 70: 2995–3010
- [46] D. Elamparithi and V. Moorthy. 2017. On Various Porous Scaffold Fabrication Methods. *Mapana Journal of Sciences* 16(4): 47-52
- [47] N. Zhu and X. Chen. 2013. Biofabrication tissue scaffolds. *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl.* 12: 315–328
- [48] D. C. Sin, X. Miao, G. Liu, F. Wei, G. Chadwick, C. Yan and T. Friis. 2010. Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. *Materials Science and Engineering C* 30: 78-85
- [49] R. Huang, X. Zhu, H. Tu and A. Wan. 2014. The crystallization behavior of porous poly (lactic acid) prepared by modified solvent casting/particulate leaching technique for potential use of tissue engineering scaffold. *Materials Letters* 136: 126-129

- [50] K. Whang, C. H. Thomas and K. E. Healy. 1995. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer* 36(4): 837-842
- [51] X. Jiang, F. Yu, Z. Wang, J. Li, H. Tan, M. Ding and Q. Fu. 2010. Fabrication and Characterization of Waterborne Biodegradable Polyurethanes 3-Dimensional Porous Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Science* 21: 1637-1652
- [52] O. Im, J. Li, M. Wang, L. G. Zhang and M. Keidar. 2012. Biomimetic three-dimensional nanocrystalline hydroxyapatite and magnetically synthesized single-walled carbon nanotube chitosan nanocomposite for bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine* 7: 2087-2099
- [53] Q. P. Pham, U. Sharma and A. G. Mikos. 2006. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *TISSUE ENGINEERING* 12(5): 1197-1211
- [54] I. Jun, H. S. Han, J. R. Edwards and H. Jeon. 2018. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1-14
- [55] A. Haider, S. Haider and I. K. Kang. 2015. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* 11: 1165–1188
- [56] B. Tarus, N. Fadel, A. A. Oufy and M. E. Messiry. 2016. Effect of polymer concentration on the morphology and mechanical characteristics of electrospun cellulose acetate and poly (vinyl chloride) nanofiber mats. *Alexandria Engineering Journal* 55: 2975-2984
- [57] <http://www.neotherix.com/technology.php> (สืบค้นเมื่อ 11 มีนาคม 2562)
- [58] G. Darko, S. Chigome, S. Lillywhite, Z. Tshentu, J. Darkwa and N. Torto. 2013. Sorption of toxic metal ions in aqueous environment using electrospun polystyrene fbres incorporating diazole ligands. *Water SA* 39 (1): 39-46
- [59] A. Koski, K. Yim and S. Shivkumar. 2004. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters* 58: 493–497

- [60] B. Subia, J. Kundu and S. C. Kundu. B. Subia, J. Kundu and S. C. Kundu (2010). Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications, Tissue Engineering, Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/biomaterial-scaffold-fabrication-techniques-forpotential-tissue-engineering-app>
- [61] Z. G. Tang, R. A. Black, J. M. Curran, J. A. Hunt, N. P. Rhodes and D. F. Williams. 2004. Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ε-caprolactone] films. *Biomaterials* 25: 4741–4748
- [62] P. N. U. Thi, U. Male, D. S. Huh. 2018. In situ surface selective functionalization of honeycomb patterned porous poly(ε-caprolactone) films using reactive substrate. *Polymer* 147: 150-156
- [63] T. Weigel, G. Schinkel and A. Lendlein. 2006. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* 3(6): 835–851
- [64] F. Dehghani and N. Annabi. 2011. Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 661–666
- [65] C. Zhou, K. Yang, K. Wang, X. Pei, Z. Dong, Y. Hong and X. Zhang. 2016. Combination of fused deposition modeling and gas foaming technique to fabricated hierarchical macro/microporous polymer scaffolds. *Materials and Design* 109: 415-424
- [66] A. S. Rowlands, S. A. Lim, D. Martin and J. J. Cooper-White. 2007. Polyurethane/poly(lactic-coglycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation. *Biomaterials* 28(12): 2109-2121
- [67] S. H. Oh, S. G. Kang and J. H. Lee. 2006. Degradation behavior of hydrophilized PLGA scaffolds prepared by melt-molding particulate-leaching method: Comparison with control hydrophobic one. *Journal of materials science: Materials in medicine* 17: 131 – 137
- [68] Y. Li, G. A. Thouas and Q. Z. Chen. 2012. Biodegradable soft elastomers: synthesis/properties of materials and fabrication of scaffolds. *RSC Adv* 2: 8229–8242

- [69] R. Pelzer and A. Ott. 2004. Fabrication of scaffold structures by rapid prototyping method. *INTERNATIONAL DESIGN CONFERENCE – DESIGN*: 18-21
- [70] H. Y. He, J. Y. Zhang, X. Mi, Y. Hu and X. Yu Gu. 2015. Rapid prototyping for tissue-engineered bone scaffold by 3D printing and biocompatibility study. *Int J Clin Exp Med* 8(7): 11777-11785
- [71] C. K. Chua, K. F. Leong, C. M. Cheah and S. W. Chua. 2003. Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 1: Investigation and Classification. *Int J Adv Manuf Technol* 21:291–301
- [72] G. Turnbull, J. Clarke, F. E. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li and W. Shu. 2018. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* 3: 278-314
- [73] W. B. Zimmerman, V. Tesa, S. Butler, and H. C. H. Bandulasena. 2008. Microbubble Generation. *Bentham Science*: 1-8(8)
- [74] A. Shaikh and M. H. A. Dahhan. 2007. A Review on Flow Regime Transition in Bubble Columns. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 5: 1-68
- [75] N. Kantarci, F. Borak and K. O. Ulgen. 2005. Bubble column reactors. *Process Biochemistry* 40: 2263-2283
- [76] Z. Zhu, Q. Xie, Y. Huang, S. Zhang and Y. Chen. 2018. Aucubin suppresses Titanium particles-mediated apoptosis of MC3T3-E1 cells and facilitates osteogenesis by affecting the BMP2/Smads/RunX2 signaling pathway. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* 18(3): 1-10
- [77] P. Wangkulangkul, J. Jaipaew, P. Puttawibul and J. Meesane. 2016. Constructed silk fibroin scaffolds to mimic adipose tissue as engineered implantation materials in post-subcutaneous tumor removal. *Materials and Design* 106: 428-435
- [78] ดร. ทศนีย์ เพิ่มไทย. 2554. ความรู้เบื้องต้นของชีววิทยาเซลล์ต้นกำเนิด (Overview of Stem Cell Biology). *เวชบันท์กสิกรราช* 4(3): 73-82
- [79] https://www.gibthai.com/service/note_detail/41 (สืบค้นเมื่อ 9 พฤษภาคม 2562)
- [80] K. Panjapheree, S. Kamonmattayakul and J. Meesane. 2018. Biphasic scaffolds of silk fibroin film affixed to silk fibroin/chitosan sponge based on surgical design for cartilage defect in osteoarthritis. *Materials and Design* 141: 323-332

- [81] W. Withold, U. Schulte and H. Reinauer. 1996. Method for determination of bone alkaline phosphatase activity: analytical performance and clinical usefulness in patients with metabolic and malignant bone diseases. *Clinical Chemistry* 42: 210-217
- [82] H. N. Soe, M. Khangkhamano, S. Sangkert, J. Meesane and R. Kokoo. 2018. TiC-coated carbon particles as bioactive substrates for inducing of mineralization in bone healing. *Materials letters* 229: 118-121
- [83] M. Polymenis and R. Aramayo. 2015. Translate to divide: Control of the cell cycle by protein synthesis. *Microbial Cell* 2(4): 94-104
- [84] S. W. Suh, J. Y. Shin, J. Kim, C. H. Beak, D. I. Kim, H. Kim, S. S. Jeon and I. WO. Choo. 2002. Effect of different particles on cell proliferation in polymer scaffolds using a solvent-casting and particulate leaching technique. *ASAIO Journal*: 460-464
- [85] A. Behkish. 2004. Hydrodynamic and mass transfer parameters in large-scale slurry bubble column reactors. (Doctor of Philosophy). University of Pittsburgh, United States of America
- [86] C. R. Grace, J. R. Weber and M. E. 1978. Bubbles, drops, and particles (Academic Press. Publication, New York; London)
- [87] S. Benjakul, P. Puttawibul and J. Meesane. 2012. Preparation and characterization of type I collagen/PVA hybrid biomimetic hydrogels scaffold for wound healing. *Biomedical Engineering International Conference*
- [88] O. W. Guirguis and M. T. H. Moselhey. 2012. Thermal and structural studies of poly (vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends. *Natural Science* 4 (1): 57-67
- [89] G. Ramahdita, D. M. Puspita, M. F. Albab, R. Alfata, N. Sofyan, A. H. Yuwono. 1933. The effect of hydroxyapatite addition on the mechanical properties of polyvinyl alcohol/chitosan biomaterials for bone scaffolds application. *AIP Conference Proceedings*

- [90] D. Rouholamin, W. V. Grunsven, G. C. Reilly and P. J. Smith. Morphological effects of porous PDLLA/HA scaffolds produced by supercritical CO₂ foaming on their mechanical performance, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H: Journal of Engineering in Medicine* 230 (8): 761-774
- [91] M. Swetha, K. Sahithi, A. Moorthi, N. Srinivasan, K. Ramasamy and A. Selvamurugan. 2010. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 47: 1-4
- [92] M. I. Baker, S. P. Walsh, Z. Schwartz and B. D. Boyan. 2012. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of biomedical materials research B: applied biomaterials* 9999B: 1-7
- [93] M. Ye, P. Mohanty and G. Ghosh. 2014. Morphology and properties of polyvinyl alcohol (PVA) scaffolds: Impact of process variables. *Materials Science and Engineering C* 42: 289-294
- [94] B. Sharma, S. Gautam, S. Shekhar, R. Sharma, D. S. Rajawat and P. Jain. 2019. Facile synthesis of poly (vinyl alcohol) nanocomposite & its potential application to enhance electrochemical performance, *Polymer Testing* 74: 119-126
- [95] H. Jeon, H. Lee and G. H. Kim. 2014. A Surface-Modified Poly(ϵ -caprolactone) Scaffold Comprising Variable Nanosized Surface-Roughness Using a Plasma Treatment. *TISSUE ENGINEERING: Part C* 20 (12): 951-936
- [96] A. O. Lobo, S. Afewerki, M. M. M. de Paula, P. Ghannadian, F. R. Marciano, Y. S. Zhang, T. J. Webster and A. Khademhosseini. 2018. Electrospun nanofiber blend with improved mechanical and biological performance. *International Journal of Nanomedicine* 13: 7891-7903
- [97] Z. H. Li, S. C. Ji, Y. Z. Wang, X. C. Shen and H. Liang. 2013. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. *Front. Mater. Sci* 7(3): 237-247

- [98] K. Qiu and A. N. Netravali. 2015. Polyvinyl alcohol based biodegradable polymer nanocomposites. *Biodegradable Polymers* 1: 325 - 380
- [99] P. Bhattacharjee, B. Kundu, D. Naskar, T. K. Maiti, D. Bhattacharya and S. C. Kundu. 2014. Nanofibrous Nonmulberry Silk/PVA Scaffold for Osteoinduction. *Biopolymers* 103 (5): 271 – 284
- [100] P. Uttayarat, R. Chiangnoon, J. Eamsiri and W. Senawongse. 2019. Processing and Characterization of Antibacterial Hydrogel Sheet Dressings Composed of Poly (vinyl alcohol) and Silk Fibroin for Wound Healing Application. *Walailak J Sci & Tech* 16(5): 349 – 359
- [101] Y. Qi, H. Wang, K. Wei, Y. Yang, R. Y. Zheng, I. S. Kim and K. Q. Zhang. 2017. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *Int. J. Mol. Sci.* 237(18): 1 - 21
- [102] C. Vepari and D. L. Kaplan. 2007. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci.* 3: 991 - 1007
- [103] B. B. Mandal, A. Grinberg, E. S. Gil, B. Panilaitis and D. L. Kaplan. 2012. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *PNAS* 109(20): 7699 – 7704
- [104] A. S. Gobin, V. E. Froude and A. B. Mathur. 2005. Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration. *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res* 74A: 465 – 473
- [105] A. L. Egana and T. Scheibel. 2012. Interactions of cells with silk surfaces. *J. Mater. Chem* 22: 14330 – 14336
- [106] Q. Yang, B. H. Teng, L. N. Wang, K. li, C. Xu, X. L. Ma, Y. Zhang, D. L. Kong, L. Y. Wang and Y. H. Zhao. 2017. Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF- β 3 for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *International Journal of Nanomedicine* 12: 6721–6733
- [107] H. J. Seo, Y. E. Cho, T. Kim, H. In Shin and I. Sook Kwun. 2010. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)* 4(5): 356 – 361

ภาคผนวก ก

Materials Science Forum
 ISSN: 1662-9752, Vol. 962, pp 125-128
 doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.962.125
 © 2019 Trans Tech Publications Ltd, Switzerland

Submitted: 2018-12-21
 Accepted: 2018-12-25
 Online: 2019-07-12

Fabrication of Bioscaffolds Using Bubbling Technique for Bone Tissue Engineering

Tanchanok Parivatphun^{1,a}, Benjaporn Nooklay^{2,b}, Rungrote Kokoo^{3,c},
 Jirut Meesane^{4,d}, Kalayanee Kooptarnond^{1,e}
 and Matthana Khanghamano^{1,f}

¹Department of Mining and Materials Engineering, Faculty of Engineering, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, 90112, Thailand.

²Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, 90112, Thailand.

³Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 10800, Thailand

⁴Institute of Biomedical Engineering, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, 90112, Thailand.

^ame_15053@hotmail.com, ^bnooklay_@hotmail.com, ^crunrote.k@eng.kmutnb.ac.th
^djirutmeesane999@yahoo.co.uk, ^ekalayanee.k@psu.ac.th, ^fkmatthana@eng.psu.ac.th

Keywords: Polyvinyl alcohol, Scaffold, Biomaterial, bubbling process

Abstract. A simple and green method for scaffold production was introduced here. The method is based on bubbling process of PVA solution. This process is superior to other conventional techniques in the matter of controllable pore size and without using of any other organic solvents. Microstructure of the scaffold was examined by a stereo microscope. Pore size and size- distribution were determined using a scanning electron microscope. Interconnected cells with uniform pores were observed without any other impurities within the pores. Average pore size was about 220 microns which is in the range required for bone tissue engineering application.

Introduction

Currently, many patients lose some organs or tissues from injuries. As a result, the needs of the patient's organs are greater than that the donated ones. The problems can be overcome by tissue engineering (growing tissues) to replace the injured area and the patient's body. Tissue engineering has three basic components including scaffold, cells and growth factors. Scaffolds play an important role as an easing migration, the movement of cells and suitable space for tissue formation [1]. The pore in scaffold should be uniformly distributed and interconnected for assisting cell migration, cell growth and nutrient flow when implanted cells on the scaffold. The pore size must be at least 100 microns in diameter, so that the necessary nutrients and oxygen can diffuse into the cells, resulting in survival of cells. However, the appropriate pore size for the superior growing of tissues should be in the range of 100 - 1200 microns [2, 3].

Polyvinyl alcohol (PVA) is a synthetic, biodegradable and biocompatible polymer widely used for various biomedical applications such as tissue engineering, drug delivery and wound dressing due to its nontoxicity, good water solubility and biocompatibility [4-6]. For its water solubility, PVA scaffold can be fabricated without using organic solvent leading to no contamination in the scaffold [7].

The conventional processes for scaffold fabrication, such as solvent casting/particulate leaching, freeze drying, solvent casting, etc. [8], have some disadvantages. For example, the solvent casting/particulate process (use of salt to form pores) is limited by the difficulty of salt removal and pore shape is in the form of cubic [9]. Whereas, the freeze drying requires addition of suitable surfactants such as waterborne polyurethane (WBPU) to stabilize the process. For the solvent casting process, toxicity of the scaffold might be involved as a result of residual organic solvent after removal process [10].

In order to overcome those drawbacks suffering from the conventional processes, this research presents an alternative technique for scaffold production using microbubbles. The technique provides a number of advantages such as low production cost, simple process, controllability of pore size and size distribution, without using any organic solvents.

Materials and Methods

Materials

Polyvinyl Alcohol (PVA, $M_w \approx 47,000$ g/mol, 98% hydrolyzed) was purchased from Fluka chemika. An experimental apparatus for sample preparation was set up as shown in Fig. 1.

Preparation of a PVA Scaffold

Firstly, PVA powder of 12.5 g was dissolved in deionized water of 50 ml (25%w/v) and stirred for 2 hr at 80°C. The prepared solution was then poured into the bubble column (see Fig.1). Air was flowed simultaneously with a flow rate of 200 cc/min through a glass diffuser (10-16 microns) equipped at the bottom of the bubble column for 5 minutes to generate a high volume of bubbles in the solution. The solution was then frozen in a freezer (-4°C) for 12 hr to form a bulk solid of scaffold. The bulk solid was oven-dried at 50°C for 24 hr for water removal.

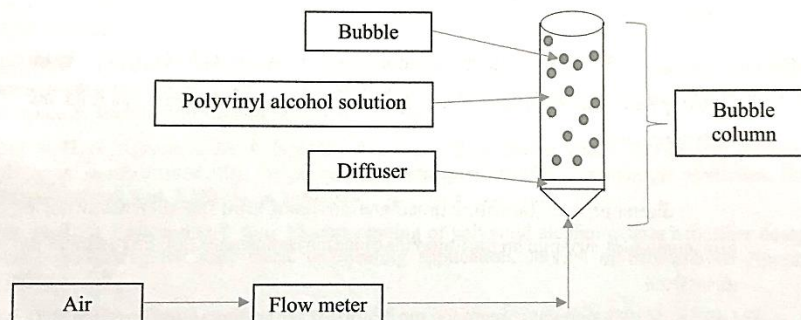


Fig. 1. Experimental set up for a PVA scaffold fabrication via microbubble technique.

Characterization

Microstructure of the fabricated scaffold was examined using a stereo microscope (Leica, M205-FCA, Switzerland). Morphology of the scaffold was observed by a scanning electron microscope (SEM, JEOL, JSM-5800LV) (at an accelerating voltage of 20 kV).

Results and Discussion

The bubbling process of PVA solution showed in Fig.2 (a), clearly a cloud of bubbles dispersed homogeneously in the column during bubbling process. Fig.2 (b) and 2 (c), represented top and side views of the produced scaffold after freezing and drying processes.

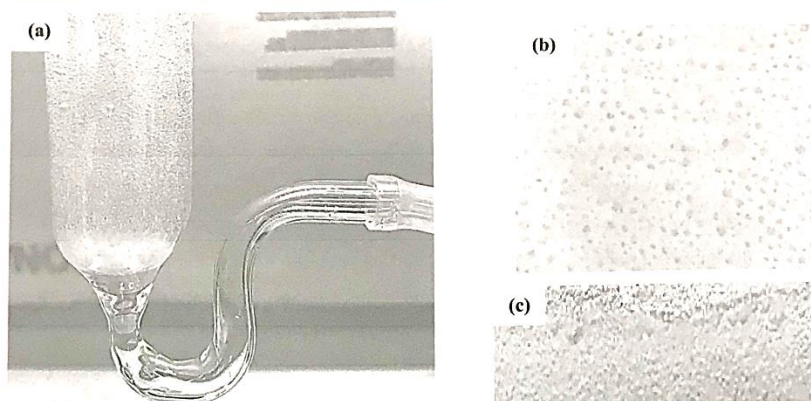


Fig. 2. (a) Bubbling process of PVA solution, (b) top view of the scaffold and (c) side view of the scaffold.

The stereo microscope image Fig.3 (a) demonstrated the dispersion of bubbles in the scaffold. The spherical shape of bubbles with uniform dispersion was observed in the PVA scaffold. The average size of bubbles was approximately 220 microns, as shown in an SEM image Fig.3 (b), with interconnected cell structure. It was noticed that size of the bubbles generated by bubbling process is much larger than the original pore size (10-16 microns) of the diffuser used. This is due to the fact that the bubble size is normally more than 10-fold larger than pore size of the diffuser used [11]. However, size of the bubbles is controllable by adjusting either pore size of the diffuser or air flow rate. Smaller bubbles can be generated by using smaller pore size of diffuser or lower air flow rate [12-14]. The expected benefits gained from bubbling process suggest an alternative approach for scaffold fabrication as to be used in bone tissue engineering application. However, the process of growing tissues is currently conducted and the results is in progress.

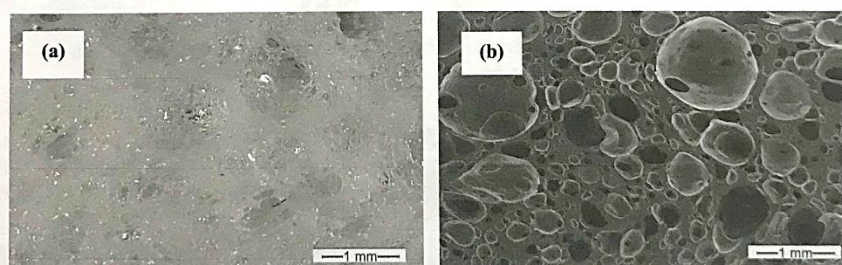


Fig. 3. (a) and (b) are stereo microscope and SEM images, respectively, of the scaffold.

Conclusion

PVA scaffolds were successfully fabricated using bubbling technique. A uniform pore size with interconnected cell structure was achieved, which is suitable for growing tissues. The scaffolds were nontoxic, due to absence of organic solvents. This simple technique is therefore an attractive prospect to fabricate scaffolds for medical use.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Higher Education Research Promotion and the National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education, Center of Excellence in Materials Engineering (CEME), the Graduate Engineering Scholarship and the Graduate school scholarship, Prince of Songkla University. The author would also like to thank the Department of Mining and Materials Engineering, Faculty of Engineering, Prince of Songkla University for facility support.

References

- [1] Z. Heydari, D. Mohebbi-Kalhari, and M. S. Afarani: Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* Vol. 81 (2017), p. 127-132
- [2] P. Timasart: Preparation and properties of polymer blend/bioglass composite for bone tissue engineering application (2012).
- [3] K.K. Gómez-Lizárraga, C. Flores-Morales, M.L. Del Prado-Audelo, M.A. Álvarez-Pérez, M.C. Piña-Barba and C. Escobedo: Polycaprolactone - and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioploted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study, *Materials Science and Engineering C* Vol. 79 (2017), p. 326-335
- [4] T. Kaur and A. Thirugnanam: Effect of porous activated charcoal reinforcement on mechanical and in-vitro biological properties of polyvinyl alcohol composite scaffolds, *Journal of Materials Science & Technology* Vol. 33 (2016), p. 734-743
- [5] N. H. A. Ngadiman, M. Y. Noordin, A. Idris, A. S. A. Shakir, and D. Kurniawan: Influence of polyvinyl alcohol molecular weight on the electrospun nanofiber mechanical properties, *Procedia Manufacturing* Vol. 2 (2015), p. 568-572
- [6] N. T. B. Linh and B.T. Lee: Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application, *Journal of Biomaterials Applications* (2011), p. 1-12
- [7] J. Meesane: Tissue engineering scaffold from polymeric materials (2015), p.119-158.
- [8] D. Ronca, F. Langella, M. Chierchia, U. D'Amora, T. Russ, M. Domingos, A. Gloria, P. Bartolo, and L. Ambrosio: Bone Tissue Engineering: 3D PCL-based nanocomposite scaffolds with tailored properties, *Procedia CIRP* Vol. 49 (2016), p. 51-54
- [9] X. Liu and P. X. Ma: Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 32, No. 3 (2004), p. 477-486
- [10] H. Janik, and M. Marzec: A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds, *Materials Science and Engineering C* Vol. 48 (2015), p. 586-591
- [11] W. B. Zimmerman, B. N. Hewakandamby, V. Tesa, H.C.H. Bandulasena and O. A. Omotowa: On the design and simulation of an airlift loop bioreactor with microbubble generation by fluidic oscillation, *Food and Bioproducts Processing* Vol. 87 (2009), p. 251-227
- [12] W. B. Zimmerman, V. Tesa, S. Butler, and H.C.H. Bandulasena: Microbubble Generation, *Bentham Science* Vol.2 (2008), p.1-8(8)
- [13] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O'Brien: The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* Vol. 31 (2010), p. 461-466
- [14] C. P. Ribeiro Jr. and P. L. C. Lage: Experimental study on bubble size distributions in a direct-contact evaporator, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* Vol. 21, No. 1 (2004), p. 69 – 81

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวธัญชนก ปรีวัตรพันธ์

รหัสนักศึกษา 6010120060

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (วิศวกรรมวัสดุ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2560

ทุนการศึกษา

1. ทุนศิษย์ก้นกุฏิ คณะวิศวกรรมศาสตร์ ปีงบประมาณ 2561
2. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2561

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. T. Parivatphun, B. Nooklay, R. Kokoo, J. Meesane, K. Kooptarnond and M. Khangkhamano. 2019. Fabrication of Bioscaffolds Using Bubbling Technique for Bone Tissue Engineering. *Materials Science Forum* 962: 125- 128
2. T. Parivatphun, S. Sangkert, R. Kokoo, J. Meesane, K. Kooptarnond and Matthana Khangkhamano. Novel processing technique for hierarchical porous 3D scaffold fabrication for bone tissue engineering. *Polymer testing*. (Submitted, Under review)
3. Matthana Khangkhamano, Rungrote Kokoo, Jirut Meesane and Tanchanok Parivatphun. Petty patent No. 1803002672