บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ (Experimental Research) เพื่อศึกษาอิทธิพลของพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ ที่มีการเตรียมพื้นผิวแตกต่างกันต่อพฤติกรรมการยึดเกาะ (attachment) ของเซลล์ไลน์กระดูก SaOS2 ในระยะต่าง ๆ ของการยึดเกาะ (Stage of Attachment) โดยสังเกตรูปร่าง (cell morphology) จำนวน (cell number) ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 การเตรียมชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมอัลลอยด์

การเตรียมชิ้นตัวอย่างวัสดุในการทดลองนี้ ใช้ชิ้นโลหะไทเทเนียมอัลลอยด์ (Ti6Al4V) รูปทรงแผ่นกลม (Titanium Disc) ที่ถูกตัดเป็นแผ่นหนา 2 mm. มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 mm. หลังจากนั้นนำไปฝังใน Self-Cured acrylic ซึ่งอยู่ในท่อ PVC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 mm. ความยาว 25 mm. หลังจากนั้นจึงทำการเตรียมพื้นผิวหน้าไทเทเนียมอัลลอยด์ที่มีความแตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 4 แบบ คือ

1. ไทเทเนียมอัลลอยด์ชนิดพื้นผิวเรียบ (S1200) โดยทำการขัดด้วยเครื่องขัด Polishing machine ยี่ห้อ Imptech รุ่น DPS 3200 จากบริษัท Imptech International ประเทศแอฟริกาใต้ โดยใช้ Silicon carbide paper เบอร์ 800 นาน 15 นาที ที่ 200 รอบต่อนาที จากนั้นตามด้วย Silicon carbide paper เบอร์ 1200 นาน 15 นาที ที่ 200 รอบต่อนาที

2. ไทเทเนียมอัลลอยด์ชนิดพื้นผิวขรุขระ (S400) โดยทำการขัดด้วยเครื่องขัด Polishing machine เช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ใช้ Silicon carbide paper เบอร์ 400 นาน 15 นาที ที่ 200 รอบต่อนาที

3. ไทเทเนียมอัลลอยด์ชนิดพื้นผิวขรุขระ (S120) โดยทำการขัดด้วยเครื่องขัด Polishing machine เช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ใช้ Silicon carbide paper เบอร์ 120 นาน 15 นาที ที่ 200 รอบต่อนาที

4. ไทเทเนียมอัลลอยด์ชนิดพื้นผิวที่เป็น Sandblast (SB) โดยนำท่อ PVC

ที่มีไทเทเนียมอัลลอยด์ฝังอยู่ มาขัดเรียบดังเช่น ข้อ 1 หลังจากนั้นนำไปพ่นด้วยเครื่องพ่นทราย ยี่ห้อ Miniblaster จากประเทศอิสราเอล โดยใช้ Aluminium oxide particle (Al_2O_3) ขนาด 50 ไมครอน ที่แรงดันลม 7 บาร์ นาน 15 วินาที

ชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมอัลลอยด์ที่เตรียมพื้นผิวเสร็จแล้วจะถูกนำมาทำความสะอาดด้วยเครื่อง Ultrasonic จากบริษัท Branson Ultrasonic BV ประเทศเนเธอร์แลนด์ ใน Distrilled water นาน 15 นาที และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดความหยาบของพื้นผิวด้วยเครื่อง Profilometer ยี่ห้อ Talyscan 150 จากบริษัท Taylor Hobson ประเทศอังกฤษ

ซึ่งมีวิธีการใช้เครื่องมือ ดังนี้

1.นำวัสดุที่ต้องการวัดในที่นี้ คือ ชิ้นตัวอย่างแผ่นทรงกลมของไทเทเนียมอัลลอยด์ที่ฝังอยู่ในท่อ PVC ยึดเข้ากับฐานของเครื่องมือ โดยใช้ดินน้ำมันยึดไว้

2.เลือกชนิดชอง gauge ที่ใช้สำหรับกรณีนี้ เลือกใช้ FTSS Inductive gauge ซึ่งเป็น Contact stylus gauge โดยเลือก Range ของการวัดเป็น Large Range (2.42 mm/42 nm) , One way measurement และ No lift of gauge นั่นคือ หัว Contact stylus ของเครื่องมือจะเคลื่อนที่ลากผ่านพื้นผิวไปในทิศทางเดียวและไม่มีการยกหัวเมื่อสิ้นสุดการลากในแต่ละครั้ง การลากผ่าน 1 ครั้ง จะได้ลักษณะรูปร่างพื้นผิว (Profile)

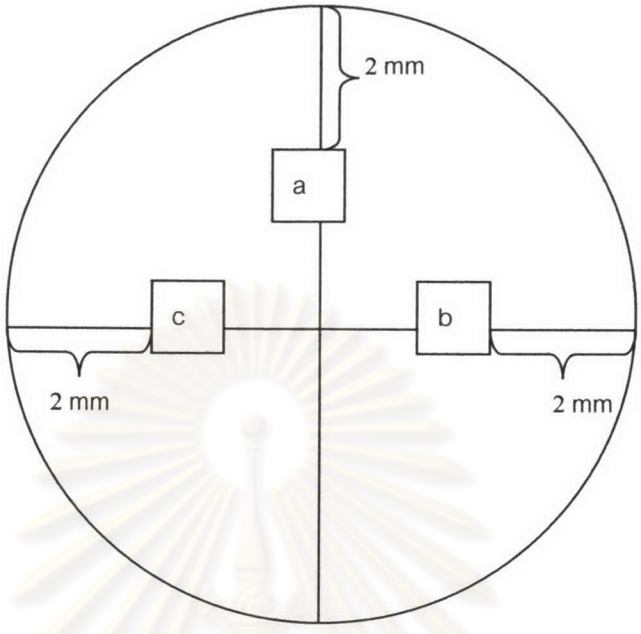
3.กำหนด Space ในที่นี้กำหนดเป็น 2 x 2 mm คือ พื้นที่ที่หัว Contact stylus จะลากผ่านเพื่อวัดลักษณะของพื้นผิว สำหรับ Spacing ในแนวแกน X และ แกน Y ของการเคลื่อนที่ของหัว Contact stylus กำหนดไว้ที่ 5/15 μm

4.Speed คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของหัว Contact stylus ในที่นี้ตั้งไว้ที่ 3000 μm / วินาที

5.เมื่อทำการวัดโดยเครื่องจะ Scan โดยมีการเคลื่อนที่ของหัว Contact stylus ทีละ 1 ครั้ง (Profile) จนกระทั่งครอบคลุมบริเวณที่กำหนดไว้ในข้อ 3

6.หลังจาก Scan เสร็จแล้ว จะนำข้อมูลที่ได้คำนวณ หาค่า Ra โดยใช้โปรแกรม Talymap Universal Version 2.0 beta3 ซึ่งในกรณีนี้ใช้ค่า Cut-off ที่ 0.08 mm และใช้ filter ชนิด Guassian filter

7.สำหรับการวัดค่า Ra ในการทดลองนี้จะวัด 3 พื้นที่ต่อชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมอัลลอยด์ โดยจุดที่ 1 คือ จุด a จะวัดตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางในแนวตั้งห่างจากขอบด้านบนเป็นระยะ 2 mm จุดที่ 2 คือ จุด b จะวัดตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางในแนวนอนห่างจากขอบด้านขวาเป็นระยะ 2 mm จุดที่ 3 คือ จุด c จะวัดตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางในแนวนอนห่างจากขอบด้านซ้ายเป็นระยะ 2 mm ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงบริเวณที่วัดค่า Ra บนชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมอัลลอยด์

ในการทดลองนี้ชิ้นโลหะไทเทเนียมอัลลอยด์ทั้งหมดที่เตรียมเสร็จแล้วจะผ่านการทำความสะอาด โดยใช้แช่ใน Absolute Alcohol 100 % เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ใน Alcohol 70 % เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) และทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นบรรจุในซองพลาสติกสำหรับทำ Sterilization และนำไปทำให้ปลอดเชื้อ ด้วยเครื่องนึ่งอบไอน้ำ (Autoclave) ก่อนนำไปทดลองด้วยวิธีอื่นต่อไป

3.2 การเตรียมเซลล์

3.2.1 ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ไลน์ของกระดูก (Osteoblast-like cell line) ชนิด SaOS2 เป็น Osteoblast-like cell line ที่ใช้ในการศึกษาพฤติกรรมของเซลล์กระดูกในห้องปฏิบัติการ เพราะมีคุณลักษณะคล้ายกับเซลล์กระดูก Osteoblast ในร่างกายของมนุษย์ และเมื่อทดลองในสภาวะที่เหมาะสม เซลล์ไลน์นี้สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ Osteoblast ที่ต้องการศึกษาได้ เช่น การเกิดการยึดเกาะ (Attachment) บนพื้นผิวที่ต้องการศึกษา การเกิดการเพิ่มจำนวน (Proliferation) การสร้าง Alkaline phosphatase ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้

เซลล์ไลน์ชนิดนี้เพื่อศึกษาพฤติกรรมของเซลล์กระดูกบนพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ที่มีการเตรียมพื้นผิวต่าง ๆ กัน

3.2.2 เซลล์ไลน์กระดูก (Osteoblast-like cell) ชนิด SaOS2 มีวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก (Cell culture) ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (49) การเลี้ยงเซลล์ในการทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium) ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ที่ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 10 (10% Fetal bovine serum) แอลกลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM L-Glutamine) เพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (100 U/ml Penicillin) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100 μg/ml Streptomycin sulfate) และ แอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.25 μg/ml Amphotericin B) โดยอาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดนี้ได้จากบริษัท Gibco BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา

จากนั้นตัวอย่างเซลล์กระดูกจะถูกนำมาใส่ในจานเพาะเลี้ยง ขนาด 35-mm plate ยี่ห้อ Nunc จากประเทศเดนมาร์ก ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังที่บรรยายไว้ข้างต้น โดยจะเก็บจานเพาะเลี้ยงนี้ในตู้อบที่มีความชื้นสูง ยี่ห้อ Thermoforma จากบริษัท Thermoforma ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่อุณหภูมิ 37^0 C ปริมาณกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอากาศ 95 %

สำหรับ อาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium) จะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 2 วัน และหลังจากเลี้ยงเซลล์กระดูกไว้เป็นเวลา ประมาณ 7-10 วัน จนเซลล์ขึ้นเต็มจานเลี้ยง

3.2.3 นำเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง โดยวิธีการถ่ายเซลล์ (Subculture) ด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin - EDTA) โดยใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline : PBS) ชนิดที่ปลอดเชื้อ ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่เกาะบนจานเพาะเลี้ยงออกให้หมด โดยในขณะที่ใส่ PBS ลงไปต้องระวังไม่ให้สารละลายถูกบริเวณผิวของจานเพาะเลี้ยงโดยตรง เพราะจะทำให้เซลล์หลุดออกมาก่อนได้ จากนั้นหยดเอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ พอให้ท่วมชั้นเซลล์ ปิดฝาแล้วเอียงจานเพาะเลี้ยง 2-3 ครั้ง เพื่อให้เอนไซม์สัมผัสกับผิวเซลล์ที่เรียงตัวแผ่เต็มพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงทั้งหมด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ตรวจดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted phase-contrast microscope ยี่ห้อ Olympus รุ่น CK2 จากบริษัท Olympus optical ประเทศญี่ปุ่น เพื่อติดตามผลของเอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ จะพบว่าเซลล์มีรูปร่างหดสั้นลง ทำให้ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์กับผิวของจานเพาะเลี้ยงลดลง เซลล์จะเป็นอิสระจากเซลล์ข้างเคียงและสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ เมื่อเซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง เซลล์จะมีรูปร่างกลม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์

DMEM ที่มีซีรัมร้อยละ 10 เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ เนื่องจากในซีรัมมี Protease inhibitor

จากนั้นใช้พลาสเตอร์ปิเปตปลอดเชื้อ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชะล้างเซลล์ที่ยังเกาะติดผิวจานเพาะเลี้ยงให้หลุดออกจนหมด แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer (วิธีการนับอยู่ในภาคผนวก) นำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงใหม่ โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์ในอัตราส่วน 1 : 2 จากความหนาแน่นเดิมถ้าเซลล์เจริญช้า และใช้อัตราส่วน 1 : 3 ถึง 1 : 4 จากความหนาแน่นเดิมถ้าเซลล์เจริญเร็ว เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นจนเต็มผิวของจานเพาะเลี้ยง จึงทำการถ่ายเซลล์ใหม่ ทุก 5 – 7 วัน จนกระทั่งได้เซลล์มากพอสำหรับทำการทดลองต่อไป

3.3 การวัดผลการตอบสนองของเซลล์ต่อพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์

3.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

นำเซลล์ที่เจริญจนเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว มาถ่ายเซลล์ด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ดังวิธีที่บรรยายไว้ในข้อ 3.2.3 จากนั้นนับเซลล์ด้วย Hemocytometer เพื่อให้ทราบจำนวนเซลล์ที่แน่นอน จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ จำนวน 5 กลุ่ม ได้แก่ จำนวนเซลล์ 5×10^3 , 10×10^3 , 20×10^3 , 40×10^3 และ 80×10^3 เซลล์ ตามลำดับ ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24-well plate จากบริษัท Corning Incorporated ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยแต่ละกลุ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ กลุ่มละ 3 หลุม นำจานเพาะเลี้ยงเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธีการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene blue) ความเข้มข้น 1% โดยมีวิธีการทำดังต่อไปนี้

ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นคงสภาพเซลล์ (Fixation) ด้วยสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) ความเข้มข้น 4 % เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง โดยครั้งแรกล้างแล้วดูดทิ้งทันที ส่วนครั้งที่ 2 ให้แช่ไว้ 10 - 15 นาที แล้วค่อยดูดทิ้ง จากนั้นล้างด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (Borate buffer) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่มีค่า pH 8.5 ย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู ความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 4 - 5 ครั้ง จนสีส่วนเกินออกหมด หรือสีของสารละลายบัฟเฟอร์ใส จากนั้นละลายสีที่ติดเยื่อหุ้มผิวเซลล์ด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric) และเอทานอล(Ethanol) ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้สีของเมทิลีนบลู เข้ากันกับสารละลายจนได้สารละลายสีฟ้า แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermospectronic

รุ่น GENESYS 10 UV Scanning จากบริษัท Rochester ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ความยาวแสง 667 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่าความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ โดยจะได้ความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เข้าใกล้ค่า 1 (แสดงรูปไว้ในภาคผนวก)

3.3.2 การนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงบนพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ที่เตรียมไว้จะทำ โดยใช้ Forcep ที่ปราศจากเชื้อคีบชิ้นแผ่นไทเทเนียมอัลลอยด์ที่เตรียมพื้นผิวไว้แตกต่างกันเป็น 4 ชนิด ดังที่บรรยายไว้แล้ว ใส่ลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24-well plate โดยหันด้านพื้นผิวที่เตรียมไว้แล้วขึ้นด้านบน จากนั้นนำเซลล์ที่เจริญจนเต็มจานเพาะเลี้ยงมาทำการถ่ายเซลล์ด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ออกจากจานเพาะเลี้ยงชนิด 35-mm plate ดังบรรยายไว้ในข้อ 3.2.3 ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่แน่นอนด้วย Hemocytometer จากนั้นเพาะเซลล์ลงบนพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์ด้วยจำนวน 8×10^4 เซลล์ต่อหลุมของ 24-well plate โดยขณะที่ทำการเพาะเซลล์จะปล่อยให้สารแขวนลอยที่มีเซลล์จำนวนดังกล่าว หยดทิ้งไว้บนพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ ประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์จนครบ 500 ml ต่อหลุม และนำจานเพาะเลี้ยงไปเก็บในตู้อบที่มีความชื้นสูงที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ปริมาณกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอากาศ 95 % แล้วจึงนำมาศึกษาด้วยวิธีอื่น ๆ ต่อไป

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ก. การตรวจวัด Surface Topography ของพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์

นำไทเทเนียมอัลลอยด์ที่มีการเตรียมพื้นผิวแตกต่างกันทั้ง 4 แบบ ไปตรวจลักษณะของพื้นผิวโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) รุ่น JSM 5410 LV จากบริษัท JOEL ประเทศญี่ปุ่น จากนั้นวัดค่า Surface roughness (Ra) ของพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์ที่เตรียมพื้นผิวแตกต่างกันทั้ง 4 แบบ โดยใช้เครื่อง Profilometer ยี่ห้อ Talyscan 150 ดังวิธีที่บรรยายไว้ในหัวข้อ 3.1

ข.การศึกษารูปร่าง (Cell Morphology) พฤติกรรมของการยึดเกาะ (Cell Attachment) และการแพร่กระจาย (spreading)ของเซลล์ด้วยวิธี Scanning Electron Microscope (SEM)

สำหรับการศึกษารูปร่างและพฤติกรรมของการยึดเกาะและแพร่กระจายของเซลล์บนพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์ จะใช้วิธีการศึกษาด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) ซึ่งมีวิธีทำดังต่อไปนี้

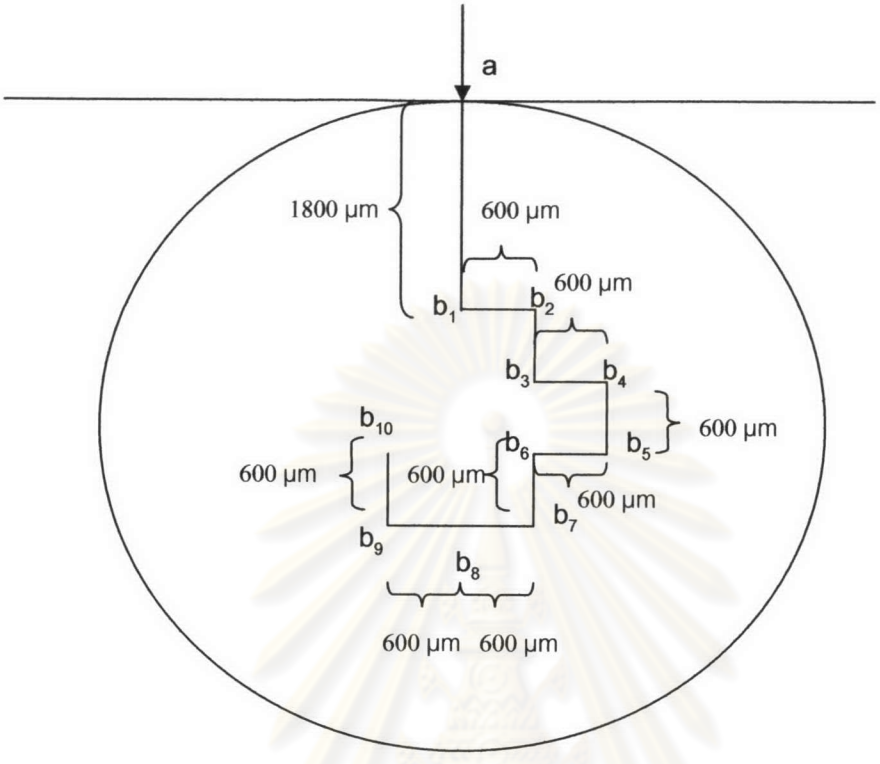
หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์ชนิดต่าง ๆในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24-well plate ดังที่บรรยายไว้ในข้อ 3.3.2 และนำจานเพาะเลี้ยงไปเก็บไว้ในตู้อบความชื้นสูง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะทำการเตรียมชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมอัลลอยด์โดยนำจานเพาะเลี้ยงออกจากตู้อบ ใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมออกให้หมด ล้างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline(PBS) 2 ครั้งเพื่อแยกเอาเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะบนพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์ออกให้หมด แล้วทำการคงสภาพเซลล์ (Fixation) ด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำ dehydrate ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยน้ำยา Graded Ethanol Series และทำ Critical point dry ด้วยกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ขั้นตอนสุดท้าย คือ การทำ Gold-coat แล้วจึงนำชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมอัลลอยด์ที่ได้ ส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เพื่อศึกษารูปร่างและพฤติกรรมของการยึดเกาะและการแพร่กระจายของเซลล์ ซึ่งลักษณะเซลล์ที่ตรวจได้จะแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ (50,51,52)

1. เซลล์ที่ไม่มีการแพร่กระจาย (not spread) เซลล์จะมีรูปร่างกลม ยังไม่มีส่วนยื่นของเซลล์ (protrusion or filopodia)

2. เซลล์ที่ยึดเกาะบนผิวไทเทเนียมดีแล้วจะมีการแผ่ขยายบางส่วน (partially spread) ตัวเซลล์จะมีส่วนแผ่ขยายออกด้านข้าง 1 ด้านหรือมากกว่า เป็นลักษณะ filopodial growth แต่การแผ่ขยายของพลาสมาเมมเบรน (plasma membrain) จะไม่แผ่ขยายอย่างสมบูรณ์

3. ในระยะท้าย ๆ ตัวเซลล์มีการแผ่ขยายออกไปบางส่วนร่วมกับมีลักษณะ cytoplasmic webbing คือ ลักษณะแผ่ออกคล้ายพังผืดของไซโตพลาสมา

4. เซลล์ที่มีการแผ่ขยายเต็มที่ (fully spread) เซลล์จะมีการขยายขอบเขตของพลาสมาเมมเบรนออกไปรอบ ๆ ด้าน มีลักษณะของพื้นที่ผิวที่ใหญ่กว่าเซลล์ในระยะที่ 1 – 3 อย่างชัดเจนและเซลล์มีลักษณะแบนราบ (flattening) จากนั้นทำการบันทึก ลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่สังเกตในระยะต่างๆ และนับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์โดยการสุ่มนับ 10 ตำแหน่งต่อไทเทเนียมอัลลอยด์หนึ่งชิ้น ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงบริเวณที่สุ่มนับเซลล์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

จุด a คือ จุดเริ่มต้นโดยอาศัยเส้นสมมติที่ลากสัมผัสส่วนโค้งจุดสูงสุดของชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมรูปวงกลม จุด b_1 อยู่ห่างจากจุด a ในแนวดิ่ง ในแนวตั้งฉากกับจุด a เป็นระยะทาง 300 µm x 6 = 1,800 µm จุด b_1 จนถึง b_{10} คือ บริเวณที่สุ่มนับจำนวนเซลล์ทั้ง 10 พื้นที่ โดยแต่ละจุดอยู่ห่างกันประมาณ 600 µm

ค.การวัดค่าดีเอ็นเอ (DNA Assay)

เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมของการยึดเกาะ(Cell Attachment) และการเจริญ(Proliferation)ของเซลล์บนพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 30 นาทีและ 20 ชั่วโมงหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

1.ใช้ Forcep ที่ปลอดเชื้อคีบชิ้นตัวอย่างไทเทเนียมอัลลอยด์ที่เตรียมไว้แล้วทั้ง 4 แบบ (ดังที่บรรยายในข้อ 3.1) ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 well-plate จากนั้นทำการ

เพาะเลี้ยงเซลล์บนพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 8×10^4 เซลล์ต่อหลุมของ 24-well plate (ดังที่บรรยายในข้อ 3.3.2) นำจานเพาะเลี้ยงเก็บในตู้อบเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำจานเพาะเลี้ยงออกจากตู้อบ จากนั้นใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในแต่ละหลุมออกจนหมด แล้วเติมสารละลาย PBS 1X ที่ปลอดเชื้อลงไปทุกหลุม ๆ ละ 1 ml ซึ่งในขั้นตอนนี้ควรดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทีละ 2 หลุม แล้วเติมสารละลาย PBS ลงไปเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แห้ง

2.ใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดสารละลาย PBS 1X ออกให้หมด จากนั้นใส่สารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟส (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) ความเข้มข้น 1 % จำนวน 120 µl ลงไปในแต่ละหลุม ปิดฝาแล้วนำจานเพาะเลี้ยงไปไว้บนเครื่องเขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว ใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อดูดสารละลายที่ได้ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 0.6 ml เพื่อเตรียมวัดค่า DNA ต่อไป

3.สำหรับการตรวจวัดปริมาณ DNA ของเซลล์บนพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ที่มีการเตรียมพื้นผิวทั้ง 4 แบบ ที่เวลา 20 ชั่วโมง มีวิธีการทำเช่นเดียวกับการตรวจหาปริมาณ DNA ของเซลล์บนพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ ที่เวลา 30 นาที แต่ใช้เวลาในการเก็บจานเพาะเลี้ยงในตู้อบเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ในการทดลองนี้ใช้เครื่องวัด DNA ยี่ห้อ DQ200 Dynaquant Flurometer รุ่น Hoefer DyNA Quant 200 จากบริษัท Amersham Biosciences (SF) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้ calf thymus DNA ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นค่า Standard เพื่อเปรียบเทียบ (53,54) (วิธีการใช้เครื่องวัด DNA แสดงในภาคผนวก)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS for Window Version 11.5 โดยใช้สถิติเชิงพรรณาอธิบาย ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ของจำนวนเซลล์กระดูกที่ยึดเกาะ (Attachment) ในระยะต่าง ๆ บนไทเทเนียมอัลลอยด์ที่มีการเตรียมพื้นผิวแตกต่างกัน

สำหรับการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความขรุขระของพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์ (Ra) กับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวไทเทเนียมอัลลอยด์และค่า DNA ที่วัดได้ของเซลล์บนพื้นผิวของไทเทเนียมอัลลอยด์ทั้ง 4 แบบ ใช้สถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และใช้การเปรียบเทียบแบบพหุคูณของ Scheffe สำหรับการทดสอบทางสถิตินี้จะใช้ระดับนัยสำคัญ .05