การคืนสภาพเนื้อเยื่อกระดูกบนวัสดุเชิงประกอบไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟต ที่เตรียมโดยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ

นางสาวผกามาส ธนพัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BONE TISSUE REGENERATION ON CHITOSAN/CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITES PREPARED BY MEMBRANE DIFFUSION PROCESS

Miss Phakamat Thanaphat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology
Department of Materials Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคืนสภาพเนื้อเยื่อกระดูกบนวัสดุเชิงประกอบไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟตที่เตรียมโดยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ
โดย	นางสาวผกามาส ธนพัฒน์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.สาวิตรี เพชรช่วย)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.สิริวรรณ กิตติเนาวรัตน์)

ผกามาส ธนพัฒน์ : การคืนสภาพเนื้อเยื่อกระดูกบนวัสดุเชิงประกอบไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟตที่เตรียมโดยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ. (BONE TISSUE REGENERATION ON CHITOSAN/CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITES PREPARED BY MEMBRANE DIFFUSSION PROCESS). อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ทพ. ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล, 100 หน้า.

สารอนินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในกระดูกได้แก่ แคลเซียมฟอสเฟต อย่างไรก็ตามแคลเซียมฟอสเฟตเพียงอย่างเดียวมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มายึดเกาะต่ำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟต เนื่องจากเป็นที่รู้จักกันดีอยู่แล้วว่าไคโตซานมีประจุบวกที่จะเกิดปฏิสัมพันธ์ทางไฟฟ้ากับประจุลบของผนังเซลล์ได้ส่งผลให้เซลล์ยึดเกาะสูง แคลเซียมฟอสเฟต 2 ชนิดคือ ชนิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตถูกสังเคราะห์ไฮบริดให้เป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายไคโตซานด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ จากนั้นขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติด้วยการทำแห้งเยือกแข็ง แล้วนำโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของแคลเซียมฟอสเฟต สัณฐานวิทยา รวมทั้งทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ไลน์สร้างกระดูก ผลการวิเคราะห์พบว่าวัสดุเชิงประกอบที่เตรียมได้ประกอบไปด้วยสารอนินทรีย์อยู่ในช่วง 35 – 45 เปอร์เซ็นต์ วัสดุเชิงประกอบไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟตทั้ง 2 ชนิดมีอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส 1.61 หรือ 0.92 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าตามทฤษฎีของไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตตามลำดับ เอกซ์เรย์ดิฟแฟกชันของวัสดุเชิงประกอบไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟตแสดงพีกเฉพาะที่ 2θ ประมาณ 26° และ 32° ซึ่งเป็นพีกเฉพาะของไฮดรอกซีอะพาไทต์ หรือพบพีกเฉพาะที่ 2θ ประมาณ 20.94, 29.25, 30.50, 34.15 และ 34.42 ซึ่งเป็นพีกเฉพาะของไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตสามารถถูกสังเคราะห์ไฮบริดในสารละลายไคโตซานด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟต(ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต) ที่ขึ้นรูปจากการทำแห้งเยือกแข็งแสดงให้เห็นถึงการเชื่อมต่อโครงสร้างของรูพรุนภายใน ผลการทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ไลน์สร้างกระดูก พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานหรือไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MCT3T - E1 ดังนั้น วัสดุเชิงประกอบที่มีรูพรุนของไคโตซานและแคลเซียมฟอสเฟตจึงเป็นวัสดุที่น่าสนใจในการนำไปใช้สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

ภาควิชา วัสดุศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต..
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก....................
ปีการศึกษา 2551	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....................

4972390523 : MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY
KEY WORD: CHITOSAN / HYDROXYAPATITE / DICALCIUM PHOSPHATE DIHYDRATE / TISSUE ENGINEERING

PHAKAMAT THANAPHAT : BONE TISSUE REGENERATION ON CHITOSAN/CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITES PREPARED BY MEMBRANE DIFFUSSION PROCESS. PRINCIPAL THESIS ADVISOR : WANPEN TACHABOONYAKIAT, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF. PASUTHA THUNYAKITPISAL, D.D.S., Ph.D., 100 pp.

Main component of inorganic substances in bone is calcium phosphate (CaP). CaP alone, however, limits in cell attachment. Thus, the aim of this work is to prepare chitosan/CaP composites. Since it is well known that chitosan having positive charges to electrostatically interact with negative charges of cell membrane, resulting in high cell attachment. Two kinds of calcium phosphate, Hydroxyapatite (HAp) or Dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) was homogeneously hybridized into chitosan solution by membrane diffusion process. The three-dimensional scaffolds were obtained by freeze-drying. The characterizations of CaP, morphology and osteoblast compatibility of the obtained scaffolds were examined. It was found that as prepared composites contained an inorganic content in range of 35-45%. Two types of chitosan/CaP composites contained calcium to phosphorus ratios of 1.61 or 0.92 which were closely to theoretical calcium to phosphorus ratios of HAp or DCPD, respectively. XRD patterns of chitosan/CaP composites showed the specific peaks 2θ at 26° and 32° which were those of HAp or 2θ around 20.94°, 29.25°, 30.50°, 34.15° and 34.42° which were those of DCPD. From these results, indicated that HAp or DCPD could be hybridized into chitosan solution through membrane diffusion process. Chitosan/CaP (HAp or DCPD) composite scaffolds formed by freeze-drying showed interconnected porous structure. From biocompatibility test revealed that neither chitosan nor chitosan/CaP scaffolds have not show cytotoxicity to MC3T3-E1 osteoblast cell line. Therefore, the porous chitosan/CaP composite scaffolds should be considered as potential materials for bone tissue engineering.

Department : Materials Science Student's signature :……………………………...
Field of study : Applied Polymer Science and Textile Technology Principal Advisor's signature :…………………..
Academic year : 2008 Co-advisor's signature :…………………………..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ได้อย่างสมบูรณ์นั้น เป็นเพราะได้รับคำแนะนำทางด้านวิชาการ ความเอื้อเฟื้อทางด้านเครื่องมือ วัตถุดิบ และสถานที่สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ อีกทั้งได้รับความช่วยเหลือ และการแนะแนวในการทำวิทยานิพนธ์จากผู้ทรงคุณวุฒิในด้านต่างๆเป็นอย่างดี ข้าพเจ้าจึงใคร่ขอขอบพระคุณบุคคลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีรายนามดังนี้

1. ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาในการแก้ไขปัญหา และแนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

2. รศ. ทพ. ดร.พสุธา ธัญญะกิจไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ทญ. นวภรณ์ เจตตภิรมย์ศักดิ์ ที่ให้คำแนะนำในด้านความรู้พื้นฐานของเซลล์ เทคนิคในการเลี้ยงเซลล์

3. รองศาสตราจารย์ เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำและแนวคิดที่เป็นประโยชน์ต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

4. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำงานวิจัย

5. ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเลี้ยงเซลล์ไลน์สร้างกระดูก รวมทั้งเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

6. ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สารต่างๆ

7. ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. ทุนโครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

9. ทุนงบประมาณแผ่นดินโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบยาสมานแผลในช่องปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้” ปีงบประมาณ 2548-ปัจจุบัน

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี อีกทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า จนสามารถสร้างสรรค์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้เป็นผลสำเร็จตามที่มุ่งหวังไว้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ... ฉ

สารบัญ.. ช

สารบัญตาราง.. ฎ

สารบัญภาพ.. ฏ

บทที่

1. บทนำ.. 1

2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 4

2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ.. 4

2.2 โครงสร้างของกระดูก.. 5

2.2.1 กระดูกเปลือกนอกและกระดูกร่างแห.. 6

2.3 โครงเลี้ยงเซลล์.. 7

2.4 วัสดุเชิงประกอบ... 9

2.4.1 ความหมายของวัสดุเชิงประกอบ.. 9

2.4.2 ชนิดของวัสดุเชิงประกอบ... 9

2.5 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน.. 10

2.5.1 กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน... 13

2.5.2 ข้อจำกัดในการนำไคโตซานไปใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก.... 16

2.6 สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต... 16

2.6.1 ไฮดรอกซีอะพาไทต์.. 18

2.6.1.1 โครงสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์.. 18

2.6.1.2 ความสามารถในการละลายของไฮดรอกซีอะพาไทต์......... 20

2.6.1.3 แหล่งของสารไฮดรอกซีอะพาไทต์... 20

2.6.1.4 วิธีการเตรียมสารไฮดรอกซีอะพาไทต์... 21

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.6.1.5 การประยุกต์ใช้งานของไฮดรอกซีอะพาไทต์ในทางการแพทย์.. 23

2.6.2. ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต.. 24

2.6.2.1 โครงสร้างผลึกไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต................ 24

2.6.2.2 วิธีการเตรียมสารไดแคลเซียมฟอสเฟต.......................... 24

2.6.2.3 การประยุกต์ใช้งานของไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต.... 25

2.6.2.4 การประยุกต์ใช้งานของไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตทางการแพทย์... 26

3.วิธีการทดลอง.. 27

3.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง…………………………………………………………… 27

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง... 27

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.. 28

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์.. 29

3.5 ขอบเขตของการทดลอง.. 30

3.6 วิธีการทดลอง.. 32

3.6.1 การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ………………………………………… 32

3.6.2 การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต........... 34

3.7 การวิเคราะห์และทดสอบทางวัสดุ.. 36

3.7.1 การวิเคราะห์หาอัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์……. 36

3.7.1.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาลิซิส…... 36

3.7.2 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของแคลเซียมฟอสเฟตที่สังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ.. 37

3.7.2.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัสของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพร้อมเครื่องวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์…………………………………… 37

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.7.2.2 การวิเคราะห์ความเป็นผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน.. 38
3.7.2.3 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. 39
3.7.2.4 การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิส………………………… 40
3.8 การวิเคราะห์และทดสอบทางชีวภาพ………………………………………….. 41
3.8.1 การเลี้ยงเซลล์…………………………………………………….. 41
3.8.2การขยายปริมาณเซลล์ไลน์สร้างกระดูกMC3T3–E1ในจานเลี้ยงเซลล์ 41
3.8.3 การทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์... 42
3.8.3.1 การทดสอบด้วยการสัมผัสโดยตรง………………………. 42
3.8.3.2 การสร้างเส้นกราฟมาตรฐานเพื่อมาใช้ในการเทียบหาจำนวนเซลล์ที่เพิ่มเชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay.......... 43
3.8.3.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการทดสอบการสัมผัสโดยตรง(Direct Contact Test) ด้วยวิธี MTT assay... 47
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง... 49
4.1 ลักษณะรูปร่างโครงเลี้ยงเซลล์.. 51
4.2 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์... 52
4.2.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาลิซิส.. 52
4.3 การวิเคราะห์ลักษณะของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์.. 53
4.3.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสเฟตของวัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพร้อมเครื่องวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์..... 53
4.3.2 การวิเคราะห์ความเป็นผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิค 54

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
เอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน...	
4.3.3 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของวัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด..	55
4.3.4 การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิส...	65
4.4 การวิเคราะห์และทดสอบทางชีวภาพ...	66
4.4.1 การขยายปริมาณเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1ในจานเลี้ยงเซลล์…………………………………………………………………	66
4.4.2 การสร้างเส้นกราฟมาตรฐานเพื่อมาใช้ในการเทียบหาจำนวนเซลล์เพิ่มเชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay..	67
4.4.3 การทดสอบด้วยการสัมผัสโดยตรง…..	69
4.4.4 การวัดการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการทดสอบการสัมผัสโดยตรงด้วยวิธี MTT assay..	74
5. สรุปผลการทดลอง อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ…………………..……..	79
รายการอ้างอิง..	81
ภาคผนวก..	86
ภาคผนวก ก..	87
ภาคผนวก ข..	89
ภาคผนวก ค..	93
ภาคผนวก ง..	95
ภาคผนวก จ..	97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..	100

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
ตารางที่ 2.1	เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์....................................	8
ตารางที่ 2.2	แคลเซียมฟอสเฟตชนิดต่างๆ ที่มีอัตราส่วน Ca:P แตกต่างกัน.................	17
ตารางที่ 2.3	สมบัติที่สำคัญของไฮดรอกซีอะพาไทต์..	22
ตารางที่ 2.4	ลักษณะไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่สังเคราะห์ขึ้น..........................	24
ตารางที่ 3.1	สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ.......................	27
ตารางที่ 3.2	สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ไลน์สร้างกระดูก..........	28
ตารางที่ 3.3	เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์……………………………………………	29
ตารางที่ 3.4	การคำนวนหาปริมาณสารจากสมการที่ (1)...	34
ตารางที่ 3.5	การคำนวนหาปริมาณสารจากสมการที่ (2)………………………………	35
ตารางที่ 4.1	ร้อยละของแคลเซียมฟอสเฟตในบริเวณที่แตกต่างกัน ที่เวลา 72 ชั่วโมง….	52
ตารางที่ 4.2	อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส..	53
ตารางที่ 4.3	ค่ามอดุลัสการกดอัดของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่างๆ………………	65
ตารางที่ 4.4	ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1กับ ค่ากระเจิงของแสงจากเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 570 นาโนเมตร.........	68
ตารางที่ 4.5	การวัดความอยู่รอดของเซลล์เชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay วันที่ 3………	75
ตารางที่ 4.6	การวัดความอยู่รอดของเซลล์เชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay วันที่ 7………	76
ตารางที่ 4.7	ค่าเฉลี่ยของความอยู่รอดของเซลล์เชิงปริมาณเทียบเป็นเป็นจำนวนเซลล์จากกราฟรูปที่ 4.13..	77

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 2.1 หลักการของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ……...………………………………….……… 5

รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างของกระดูก…………………………….............................. 6

รูปที่ 2.3 โครงสร้างกระดูกเปลือกนอกและกระดูกร่างแห……………………..…..……. 7

รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส………………...……............................... 11

รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของไคติน……………………………………….…………... 11

รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน………….…………………..…………..…. 11

รูปที่ 2.7 ไคตินแบบแอลฟา……………………………………………………..….…… 12

รูปที่ 2.8 ไคตินแบบบีตา……………………………………………………………..….. 12

รูปที่ 2.9 ไคตินแบบแกมมา……………………………………………………................ 12

รูปที่ 2.10 การเตรียมไคตินและไคโตซาน……………………….………………….…. 14

รูปที่ 2.11 โครงสร้างของอะพาไทต์แสดงตำแหน่งของอะตอมฟลูออไรด์หรืออะตอม ไฮดรอกซิล…………………………………..…………………….……… 18

รูปที่ 2.12 โครงสร้างของไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในหน่วยเซลล์เฮกซะโกนัล……..……..….. 19

รูปที่ 2.13 ปฏิกิริยาทางเคมีของการเกิดไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต……….……… 25

รูปที่ 3.1 แผนผังขอบเขตการทดลอง………………………………….…………….. 30

รูปที่ 3.2 วิธีการเทสารละลายลงในแผ่นเยื่อเลือกผ่าน……………………….......... 32

รูปที่ 3.3 สารละลายไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์แช่ในสารละลายไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟตหรือสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต..................... 33

รูปที่ 3.4 แม่แบบพลาสติก………………………………………………….……..…... 33

รูปที่ 3.5 เทอร์มอกราวิเมทริกแอนาไลเซอร์ ของ METTLER TOLEDO รุ่น TGA/SDTA 851^{e}……………………………………………………………..... 37

รูปที่ 3.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JEOL JSM-5800LV…………. 38

รูปที่ 3.7 เครื่องเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกโทมิเตอร์ ของ Bruker AXS Model D8…………..... 39

รูปที่ 3.8 เครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิส รุ่น DMA/SDTA861^{e} ของ METTLER TOLEDO………………………………………………………………..… 40

รูปที่ 3.9 จานเลี้ยงเซลล์……..…………………………………………………… 41

รูปที่ 3.10 ลักษณะชิ้นงานที่ตัดออกมา………...………………………………...…. 42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 3.11 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง........ 43
รูปที่ 3.12 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer, Phamacia รุ่น Ultrospec 3000)........ 44
รูปที่ 3.13 การหยดสารละลายตัวอย่างเซลล์ลงใน Haemacytometer........ 45
รูปที่ 3.14 ตารางของ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า...... 45
รูปที่ 3.15 ตารางบนผิว Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย100 เท่า... 46
รูปที่ 3.16 จำนวนเซลล์ที่หว่านในแต่ละแถวเพื่อทำเส้นกราฟมาตรฐาน........ 46
รูปที่ 3.17 ตู้ควบคุมอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง (CO_2 incubator) Heraeus รุ่น Hera cell........ 47
รูปที่ 3.18 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Biohazard Cabinet class II รุ่น BH2000........ 48
รูปที่ 4.1 แผนผังการทดสอบคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์........ 50
รูปที่ 4.2 ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์........ 51
รูปที่ 4.3 เอกซ์เรย์ดิฟแฟรกโทแกรมโครงสร้างผลึกในโครงเลี้ยงเซลล์........ 54
รูปที่ 4.4 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า.. 56
รูปที่ 4.5 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 1000 เท่า บริเวณพื้นที่ตัดขวาง........ 58
รูปที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานที่บริเวณผิวหน้าก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต........ 59
รูปที่ 4.7 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานที่บริเวณพื้นที่ตัดขวางก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต........ 60
รูปที่ 4.8 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่บริเวณผิวหน้าก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต........ 61
รูปที่ 4.9 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวางก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต........ 62
รูปที่ 4.10 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่บริเวณผิวหน้าก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต........ 63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 4.11 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่บริเวณพื้นที่ตัดขวางก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต.... 64

รูปที่ 4.12 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1เมื่อเกาะอยู่บนพื้นที่ผิว 2 มิติที่กำลังขยาย 400 เท่า........ 67

รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์จำนวนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 กับค่า OD..... 69

รูปที่ 4.14 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 ผ่านกล้องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่3........ 70

รูปที่ 4.15 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 ผ่านกล้องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 7........ 71

รูปที่ 4.16 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 ผ่านกล้องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 21........ 72

รูปที่ 4.17 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 ผ่านกล้องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 29........ 73

รูปที่ 4.18 กราฟแท่งแสดงการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์เชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay ในวันที่ 3 และ วันที่ 7........ 78

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย

วิวัฒนาการของวัสดุที่ใช้ในทางการแพทย์ (biomaterials) ที่เป็นวัสดุทดแทนกระดูกได้มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก ในตลอด 20 ปีที่ผ่านมา ในยุคแรกๆของการใช้วัสดุนี้จะเป็นเรื่องของแบบพิมพ์ต่างๆของด้านวิศวกรรม วัสดุที่ใช้คือ โลหะไร้สนิม (stainless steel) โดยวัสดุในยุคแรกๆจะมีลักษณะขอเป็นเพียงวัสดุที่ใช้แล้วไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีในเนื้อเยื่อข้างเคียงก็ใช้ได้แต่ปัจจุบันสิ่งที่สำคัญ คือ ต้องดูถึงปฏิกิริยาระหว่างวัสดุที่ใช้กับอวัยวะข้างเคียง (interfacial reaction)

ในยุคก่อนหน้านี้การทดสอบวัสดุที่ใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกมีน้อย แต่ในปัจจุบันการที่ได้มาซึ่งวัสดุใหม่ๆที่ใช้ได้ดีนั้น ต้องผ่านการทดสอบทั้งในแง่กลศาสตร์ ในสัตว์ทดลองหรือการทดสอบเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้มาซึ่งความแน่นอนว่าวัสดุนั้นมีพิษต่อร่างกายหรือเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือไม่ ดังนั้นวัสดุทดแทนกระดูกจึงควรมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูกได้ดี มีงานวิจัยที่เน้นถึงการนำโลหะไทเทเนียมมาช่วยยึดเกาะกระดูกบริเวณที่หัก [1] เนื่องจากโลหะไทเทเนียมมีความแข็งแรงสูงแต่มีข้อเสียหลายประการ คือ โลหะไทเทเนียมมีน้ำหนักมาก อาจเกิดการระคายเคืองบริเวณที่สัมผัสระหว่างเนื้อเยื่อกระดูกของคนไข้ กับโลหะทำให้เกิดแผลเรื้อรังหรือติดเชื้อ นอกจากนี้เมื่อกระดูกเชื่อมต่อกันเป็นปกติแล้ว จำเป็นต้องผ่าตัดเป็นครั้งที่สองเพื่อที่จะนำโลหะออกนอกร่างกายซึ่งมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้ออีกเช่นกัน

จากการที่กระดูกของมนุษย์หรือสัตว์เมื่อแตกหักแล้วจะใช้ระยะเวลานานในการรักษาให้กระดูกใหม่เจริญเติบโตขึ้นมาแทนกระดูกที่แตกหักไป การซ่อมแซมกระดูกและการสร้างกระดูกใหม่เป็นปัญหาที่ค่อนข้างซับซ้อนในการทำศัลยกรรมกระดูก ในทุกๆปีประชากรหลายล้านคนเป็นโรคเกี่ยวกับกระดูกมากขึ้น และเป็นสาเหตุให้เกิดการเสียชีวิตอันเนื่องมาจากวัสดุที่ใช้ทดแทนกระดูกมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ ในต่างประเทศวัสดุทดแทนกระดูกได้ถูกจัดว่าเป็นวัสดุปลูกถ่ายที่สำคัญรองจากการให้เลือดและผลิตภัณฑ์จากเลือด ซึ่งในการรักษาโดยใช้วัสดุทดแทนกระดูกเกิดขึ้นได้เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น โรคทางกระดูก การผ่าตัด และอุบัติเหตุ การปลูกถ่ายกระดูกที่ใช้โดยทั่วไปมี 3 วิธี คือ การปลูกถ่ายด้วยวัสดุจากตัวผู้ป่วยเอง (autograft) การปลูกถ่ายด้วยวัสดุจากผู้อื่น (allograft) และการปลูกถ่ายด้วยวัสดุเลียนแบบชีวภาพ (biomimetic materials) [2] แต่ทั้ง 3 วิธีก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายด้าน เช่น ด้านวัสดุ พื้นที่ผิวที่รับการปลูกถ่าย

กระดูก ปัญหากายวิภาค และการติดเชื้อ จึงมีการพัฒนาวิธีสังเคราะห์วัสดุเพื่อมาแก้ปัญหาดังกล่าว โดยอาศัยความรู้ความก้าวหน้าทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ซึ่งเป็นศาสตร์ที่นำหลักการของวิศวกรรมและชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูรักษา เพื่อพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อ (tissue function) ให้มีส่วนเข้ามาพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูก โดยวัสดุใหม่มักออกแบบให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกบนรูปแบบที่เรียกว่า โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยทำหน้าที่เป็นโครงที่ให้เซลล์มายึดเกาะ เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเนื้อเยื่อตามชนิดของเซลล์ที่นำมาเลี้ยง นอกจากนั้นกระดูกในธรรมชาติประกอบด้วยคอลลาเจน โปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีอัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์และอนินทรีย์คือ 30:70 [3] ดังนั้นในวัสดุทดแทนกระดูกจึงควรมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ที่คล้ายคลึงกับส่วนประกอบในเนื้อเยื่อและสารอนินทรีย์ที่คล้ายคลึงกับส่วนแร่ธาตุที่มีอยู่ในกระดูกจริง เพื่อให้มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มายึดเกาะได้ดี และสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกได้ นอกจากนี้ต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการนำไคโตซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สามารถเข้ากันได้ดีทางชีวภาพมาเป็นโครงสร้างพื้นฐานในการพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกและเป็นตัวพยุงโครงร่างวัสดุเชิงประกอบให้มีความเป็นรูพรุน ซึ่งไคโตซานนอกจากจะไม่เป็นพิษต่อร่างกายแล้ว ยังมีความสามารถในการย่อยสลายได้ พอลิเมอร์ย่อยสลายได้มีข้อดีเหนือกว่าโลหะ คือ จะช่วยผ่อนแรงที่กดทับวัสดุไปยังบริเวณเนื้อเยื่อรอบข้างขณะที่พอลิเมอร์ค่อย ๆ ย่อยสลายไป ทำให้เนื้อเยื่อฟื้นสภาพเร็วและมีความแข็งแรงดีขึ้น นอกจากนี้ไคโตซานแสดงความเป็นประจุบวกอ่อน ๆ จึงสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะได้ดี เนื่องจากผนังเซลล์ทั่วไปมีประจุลบอ่อน ๆ แต่การนำไคโตซานมาใช้เพียงอย่างเดียวยังมีสมบัติไม่เพียงพอในการผลิตวัสดุทดแทนกระดูก เนื่องจากไคโตซานมีความสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกจากเซลล์กระดูกรอบข้างค่อนข้างต่ำ จึงได้มีการเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต เพื่อปรับปรุงความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกในวัสดุทดแทนกระดูกให้สูงขึ้นเหมาะสมต่อการใช้งาน แคลเซียมฟอสเฟตเป็นสารประกอบทางเคมีที่พบมากในกระดูกและฟันมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี และสามารถที่จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกได้ดีทำให้ระยะเวลาในการรักษาลดลง ในงานวิจัยนี้จึงเสนอการเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ (membrane diffusion process) โดยใช้แผ่นเยื่อเป็นตัวชะลอการแพร่ของไอออนที่ใช้สังเคราะห์แคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งได้แก่แคลเซียมฟอสเฟตชนิดผลึก ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต โดยการแพร่แคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนผ่านไปยังสารละลายไคโตซาน ทำให้สามารถสังเคราะห์แคลเซียม

ฟอสเฟตทั้งสองชนิดผลึกที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในสารละลาย ไคโตซานได้ และขึ้นรูปวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตให้มีสภาพของรูพรุนที่เหมาะสมแก่การยึดเกาะของเซลล์ จากนั้นเปรียบเทียบการกระตุ้นให้เซลล์สร้างกระดูกหรือเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกบนวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตต่างชนิด

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อพร้อมทั้งขึ้นรูปวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนเหมาะสมกับการยึดเกาะของเซลล์

2. วิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของแคลเซียมฟอสเฟสและสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟส

3. วิเคราะห์ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟสต่อเซลล์สร้างกระดูก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สังเคราะห์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อทั้งขึ้นรูปวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตที่มีความเป็นรูพรุนเหมาะสมกับการยึดเกาะของเซลล์

2. วิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตที่มีความเป็นรูพรุน

3. ศึกษาความปลอดภัยของวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตต่อเซลล์สร้างกระดูก

4. ศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกบนวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)

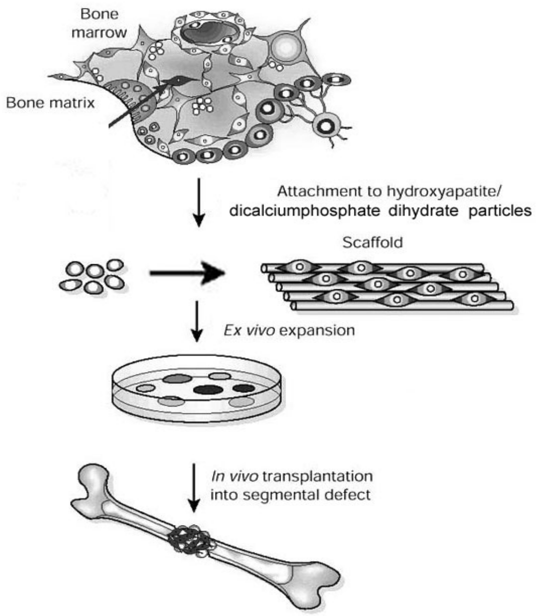
วิศวกรรมเนื้อเยื่อถูกพัฒนาให้เป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ซ่อมแซม หรือทดแทนความเสียหายของกระดูก โดยประกอบด้วย 3 ส่วนหลักๆ ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ โปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตและเซลล์ โดยวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีจุดประสงค์หลักในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ทดแทนส่วนที่สึกหรอหรือได้รับความเสียหาย ซึ่งในปัจจุบันงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีการพัฒนาและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ดังจะเห็นได้จากการตีพิมพ์ของงานวิจัยทางด้านนี้และการนำวัสดุทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ในชีวิตประจำวัน

งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1930 โดย Bisceglie [4] ได้นำเนื้องอกของหนูมาเพาะเลี้ยงในเยื่อของแผ่นพอลิเมอร์ (polymer membrane) แล้วใส่เข้าไปที่ช่องว่างบริเวณท้องของหนู จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อที่ใส่เข้าไปนั้นสามารถอยู่รอดได้โดยไม่ถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน จากการทดลองครั้งนี้เป็นตัวอย่างในยุคแรกๆของเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์ (cell encapsulation) ด้วยแผ่นเยื่อพอลิเมอร์ ซึ่งการห่อหุ้มนั้นยอมให้สารอาหารและของเสียแพร่ผ่านผนังเซลล์ (cell membrane) นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการถูกทำลายจากเซลล์ภูมิคุ้มกัน (immune cell) และแอนติบอดี (antibody) ได้อีกด้วย

ต่อมาได้มีการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ 3 มิติ ซึ่งสามารถเลี้ยงได้ในปริมาณมากและสามารถจัดเรียงตัวเป็นเนื้อเยื่อที่มีรูปแบบตามต้องการได้ง่าย [5] อีกทั้งมีความเหมาะสมในด้านความแข็งแรง ความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการย่อยสลายทางชีวภาพ

หลักการของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีขั้นตอนโดยทั่วไป [4] ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 2.1)

1. สกัดจากเนื้อเยื่อผู้บริจาคโดยใช้เอนไซม์ในการย่อยเนื้อเยื่อให้เป็นเซลล์
2. ออกแบบและผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความเหมาะสมและพัฒนารูปแบบของโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ
3. นำที่สกัดออกมาได้ (จากข้อ 1) เลี้ยงบนโครงเลี้ยงโดยอาจมีการขยายจำนวนในห้องปฏิบัติการก่อนแล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อในสิ่งมีชีวิตในส่วนที่ต้องการให้เกิดเนื้อเยื่อใหม่
4. เมื่อเซลล์เจริญเติบโตและมีการขยายตัวเต็มที่จะนำเซลล์ที่ได้มาจัดรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อที่มีสมบัติที่เหมือนกับเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วย เพื่อนำมาผ่าตัดให้ผู้ป่วยต่อไป



รูปที่ 2.1 หลักการของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

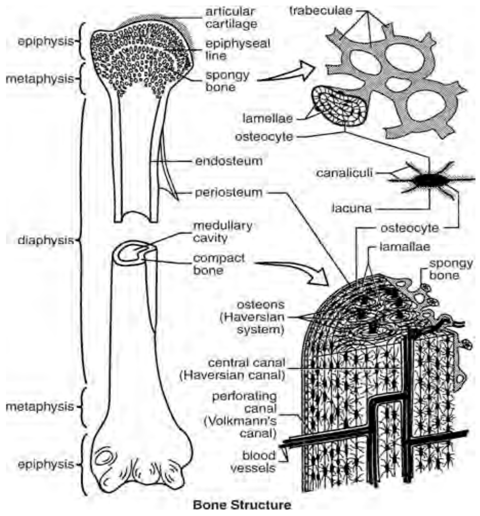
2.2 **โครงสร้างของกระดูก** (Bone structure) [6]

กระดูกประกอบไปด้วยสารประกอบอินทรีย์ (organic) และสารอนินทรีย์ (inorganlc) ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ได้แก่ คอลลาเจน ไกลโคโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน (noncollagenous glycoprotelns) ฟอสโฟโปรตีน (phosphoproteins) โปรตีโอไลปิด (proteoliplds) และมิวโคพอลิแซคคาไรด์ (mucopolysaccharides) โดยสารประกอบทั้งหมดนี้ถูกเรียกว่าเนื้อเยื่อกระดูก (osteoid) ซึ่งจะกลายเป็นกระดูกในเวลาต่อมาในส่วนเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะมีคอลลาเจนชนิดที่ 1 อยู่มากที่สุดประมาณ 95% ของจำนวนปริมาณทั้งหมด โดยเซลล์ที่สร้างส่วนฐานกระดูกเรียกว่าเซลล์สร้างกระดูก เซลล์นี้มีกำเนิดจากที่ใดยังไม่แน่ชัด

ในส่วนของสารอนินทรีย์หรือเกลือแร่นั้น ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (calcium hydroxyapatite) โดยในระยะแรกๆ นั้น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ซึ่งเป็นผลึกขนาดใหญ่ไม่ละลายน้ำ ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) จะฝังตัวอยู่ในส่วนพื้นฐานอนินทรีย์ เรียกว่า เกลือแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ต่อมาภายหลังจะแปลงสภาพเป็นผลึกของแข็งแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความแข็งเกร็ง (rigidity) สูง และต่อต้านแรงกดได้มาก

นอกจากนี้ในกระดูกยังมี จำนวนของผลึกไอออนของคาร์บอน แมกนีเซียม โซเดียม แคลเซียมและฟลูออไรด์อยู่ในจำนวนต่างๆ กัน ซึ่งสารดังกล่าวนี้จะอยู่ในส่วนของกระดูกเปลือก

นอก (Cortical) และโครงกระดูกยึดต่อภายใน (trabecular) โดยมีหน้าที่ที่สำคัญในการเป็นโครงสร้างของกระดูกและมีส่วนในกระบวนการเมตาบอลิซึม (รูปที่ 2.2)

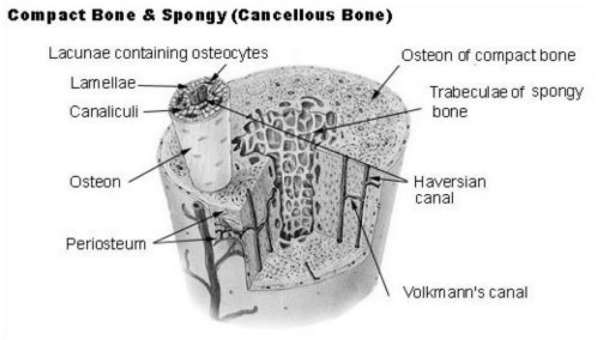


รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างของกระดูก [7]

2.2.1 **กระดูกเปลือกนอกและกระดูกร่างแห** (Cortical and trabecular bone) [6]

กระดูกในคนเราแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือกระดูกเปลือกนอก (cortical) หรือกระดูกแน่น (compact bone) และกระดูกคานเนื้อยึดต่อ (trabecular) หรือ กระดูกร่างแห (cancellous) กระดูกเปลือกนอกจะมีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมดและอยู่หุ้มล้อมรอบกระดูกร่างแหซึ่งมีความบางมากกว่า ในกระดูกแขนขาบริเวณตรงกลางกระดูกเปลือกนอกจะหนาเป็นส่วนที่เรียกว่า diaphysis และส่วนนี้มีกระดูกร่างแหน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย ในส่วนปลายของกระดูกแขนขา หรือ metaphysis พบว่าส่วนกระดูกเปลือกนอกที่หุ้มอยู่จะบางและจะมีจำนวนกระดูกร่างแหอยู่มากในโพรงไขกระดูก (medullar cavity) กระดูกส่วนอื่นของร่างกายที่มีลักษณะสั้นและแบนโดยทั่วไปจะมีกระดูกเปลือกนอกที่บางกว่ากระดูกยาวของแขนขาแต่มีจำนวนกระดูกร่างแหมากกว่า ฉะนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่ากระดูกสันหลัง กระดูกเชิงกราน และส่วนปลายกระดูกของกระดูกยาวแขนขาจะประกอบด้วยกระดูกร่างแหเป็นส่วนใหญ่ และหุ้มรอบด้วยกระดูกเปลือกนอกที่บาง (รูปที่ 2.3)

จากพฤติกรรมของกระดูกนั้น สามารถสรุปได้ว่าพื้นผิวและรูปร่างของโครงสร้างที่กระดูกสามารถเกาะติดได้ดีนั้น ควรมีพื้นที่ผิวในการยึดเกาะสูง ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์โดยส่วนมากมักมีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) และมีลักษณะที่เป็นเส้นใย (fibers) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและลักษณะการใช้งานและหน้าที่ของกระดูก



รูปที่ 2.3 โครงสร้างกระดูกเปลือกนอกและกระดูกร่างแห [8]

2.3 **โครงเลี้ยงเซลล์** (scaffold)

ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกสิ่งสำคัญคือวัสดุที่นำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อทำการเพาะเลี้ยงให้เป็นเนื้อเยื่อบนโครงสร้างนั้น ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกโดยส่วนมากผลิตมาจากวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ [5] และวัสดุที่นำมาใช้เป็นโครงร่างนั้นจะต้องสามารถขึ้นรูปเป็นโครงสร้าง 3 มิติที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอวัยวะที่ทำการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อที่จะนำไปใช้ทดแทนได้ [4] เริ่มต้นจากเพาะการเลี้ยง (culture) บนจานเพาะเลี้ยงให้เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนจนมีปริมาณมากและมีความสมบูรณ์ จึงจะทำการเลี้ยงเซลล์เหล่านี้บนโครงเลี้ยงเซลล์ ให้เจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทำการออกแบบไว้ จากนั้นจึงใส่เข้าไปแทนที่อวัยวะที่ต้องการ และปล่อยให้กลุ่มเซลล์ที่อยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์เจริญเติบโตเป็นเนื้อเยื่อทดแทน ในขณะเดียวกันโครงเลี้ยงเซลล์ก็ถูกย่อยสลายไป [9] สิ่งที่สำคัญที่สุดคือ ต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) คือ สามารถใส่เข้าในร่างกายแล้วไม่เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันหรืออีกนัยหนึ่งคือโครงเลี้ยงเซลล์นี้จะต้องไม่ถูกต่อต้านจากภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย [10]

ในการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องพิจารณาถึงสมบัติที่เหมาะสมกับ เซลล์แต่ละชนิด หน้าที่ และโครงสร้างของเซลล์ แต่โดยทั่วไปแล้วสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีค่ามอดุลัสความยืดหยุ่น (elastic Modulus) สูงเนื่องจากกระดูกคานเนื้อยึดต่อ (trabecular) หรือ กระดูกร่างแห (cancellous) มีค่ามอดุลัสการอัด (compressive Modulus) ประมาณ 2-12 เมกะพาสคัล ความต้านทานแรงดึง (tensile strength) ประมาณ 10-20 เมกะพาสคัล และมอดุลัสดึง (Young’s (tensile) Modulus) ระหว่าง 0.05-0.5 จิกะพาสคัล [11] และต้องมีที่ว่างมากพอสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งต้องมีพื้นที่ผิวมาก และมีความพรุนสูง เพื่อเป็นที่ว่างสำหรับการสร้าง Extracellular Matrix ของเซลล์กระดูก โดยทั่วไปโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมจะมีค่าความพรุน

(porosity) ประมาณ 78 เปอร์เซ็นต์ [12] มีขนาดของรูพรุน (pore size) ประมาณ 50 – 300 ไมครอน [10] และมีการย่อยสลายที่ 6 - 12 เดือน [12]

ในด้านสมบัติเชิงกลนั้น โครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีสมบัติที่แข็งแรงและคงทนต่อแรง (load) ที่ได้รับโดยปราศจากรอยร้าวหรือการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง ดังนั้นปัญหาที่สำคัญในการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์อีกประการหนึ่งคือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้นั้นจะต้องมีความแข็งแรงเพียงพอ รวมถึงวัสดุที่นำมาใช้เหล่านั้นจะต้องมีแรงยึดเหนี่ยวภายในและระหว่างโมเลกุล (intramolecularand Intermolecular bonding) ของพอลิเมอร์ที่มากพอ [13] แต่อย่างไรก็ตาม วัสดุเหล่านี้จะต้องมีสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ภายในระยะเวลาที่กำหนด

ในการผลิตเนื้อเยื่อเพื่อทำการปลูกถ่ายนั้น ประเด็นสำคัญที่ไม่ควรมองข้ามคือ เรื่องของที่ว่างที่ใช้ในกระบวนการต่างๆของเซลล์ เช่น การแลกเปลี่ยนก๊าซหรือของเหลว การหายใจ การกินอาหาร และผลกระทบจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้จะใช้เลือดเป็นสื่อกลางในการแลกเปลี่ยนสารต่างๆ ดังนั้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อบางชนิดจำเป็นต้องมีการสร้างทางเดินของเลือดด้วย ซึ่งเส้นเลือดระหว่างเซลล์นั้นมีขนาดประมาณ 100 ไมครอน [14] ดังนั้นในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดของรูพรุนต่ำ จึงต้องนำเรื่องนี้มาพิจารณาด้วย

นอกจากนี้การสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบัน ได้มีการนำเทคโนโลยีมาใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีรูปร่างโครงสร้างและรูปแบบตามที่ต้องการ รวมทั้งการกำหนดสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในด้านของพื้นที่ผิว ความพรุน ของโครงเลี้ยงเซลล์และขนาดของรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถผลิตได้จากวัสดุที่มีสมบัติ ด้านการย่อยสลายและการยึดเกาะพื้นผิวของเซลล์ จากการศึกษาของ Hutmacher [14] พบว่า วิธีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ มีมากมายหลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เนื่องจากชนิดของวัสดุ รูปร่าง และโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ [14]

เทคโนโลยี	ขนาดของความพรุน (μm)
การหล่อ (solvent casting)	30 – 300
เยื่อแผ่นบางแบบซ้อนทับ (Membrane lamination)	30 – 300
การหลอม (Melt-molding)	50 – 500
การรีด (Extrusion)	<100
การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze dry)	<200
ของไหลเหนือวิกฤติ (supercritical-fluid)	<100

โดยมากแล้วพบว่า พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาตินั้น มักจะมีโครงสร้างที่มีความพรุนสูง ดังนั้นพอลิเมอร์เหล่านี้จึงเป็นที่นิยมในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุน ในทางกลับกันพอลิเมอร์สังเคราะห์ มักมีความพรุนต่ำ แต่มีความสามารถในการยืดให้เป็นเส้นใย (fiber) ได้ดีกว่าพอลิเมอร์จากธรรมชาติ ดังนั้นพอลิเมอร์ชนิดนี้จึงเป็นที่นิยมในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบเส้นใย [12] นอกจากนี้ยังพบว่า ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบันนิยมเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ในลักษณะของวัสดุเชิงประกอบ

2.4 วัสดุเชิงประกอบ [15]

เนื่องจากวัสดุชีวภาพที่ผลิตมาจากโลหะ พอลิเมอร์ หรือเซรามิกเพียงอย่างเดียว อาจมีข้อด้อยในสมบัติบางประการ ดังนั้นจึงมีการพัฒนานำวัสดุแต่ละชนิดมาประกอบร่วมกันเพื่อให้ได้วัสดุที่มีสมบัติตามต้องการและสามารถนำไปใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.4.1 ความหมายของวัสดุเชิงประกอบ

วัสดุเชิงประกอบ (composites) คือวัสดุที่ประกอบด้วยสารตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปผสมกัน โดยสารแต่ละชนิดจะมีรูปร่างและส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สารแต่ละชนิดต้องไม่ละลายซึ่งกันและกัน วัสดุเชิงประกอบนั้นจัดทำขึ้นเพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพและคุณภาพของวัสดุให้ตรงกับการใช้งานมากยิ่งขึ้น หรืออาจจะกล่าวได้ว่าเป็นการนำเอาข้อดีของวัสดุแต่ละชนิดมาทำให้ได้วัสดุใหม่ที่มีสมบัติดีขึ้น วัสดุเชิงประกอบจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก ได้แก่

1. ส่วนเสริมแรง (reinforcement) คือส่วนที่เป็นโครงสร้างที่ให้ความแข็งแรงแก่วัสดุเชิงประกอบ วัสดุที่เป็นส่วนเสริมแรงนี้จะมีความแข็งแรงและมอดุลัสสูง เช่น เส้นใยคาร์บอน โลหะ และเซรามิก เป็นต้น

2. เมทริกซ์ (matrix) เป็นวัสดุที่ทำหน้าที่ยึดส่วนเสริมแรงเข้าด้วยกัน โดยจะล้อมรอบและปกป้องส่วนเสริมแรงจากสภาวะแวดล้อมภายนอก เมทริกซ์จะทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายเทแรงที่ได้รับไปสู่ส่วนเสริมแรง

2.4.2 ชนิดของวัสดุเชิงประกอบ

ชนิดของวัสดุเชิงประกอบสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. วัสดุเชิงประกอบที่มีพอลิเมอร์เป็นเมทริกซ์ (Polymer Matrix Composites, PMCs) พอลิเมอร์ถูกนำมาใช้เนื่องจากสมบัติด้านความแข็งแรง แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามสมบัติทางความร้อน คือ เทอร์มอเซตและเทอร์มอพลาสติก

2. วัสดุเชิงประกอบที่มีเซรามิกเป็นเมทริกซ์ (Ceramic Matrix Composites, CMCs) เซรามิกเป็นวัสดุที่เปราะแตกง่ายซึ่งเป็นสาเหตุที่ไม่นำไปใช้เป็นวัสดุวิศวกรรม แต่เนื่องจากเซรามิกมีสมบัติทางความร้อนที่ดี ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการเสริมแรงด้วยเส้นใยเพื่อนำไปใช้งานด้านอากาศยาน

3. วัสดุเชิงประกอบที่มีโลหะเป็นเมทริกซ์ (Metal Matrix Composites, MMCs) มักใช้ในงานด้านอุตสาหกรรมรถยนต์และยานอวกาศ แต่มีข้อเสีย เนื่องจากความหนาแน่นของโลหะทำให้วัสดุมีน้ำหนักมาก

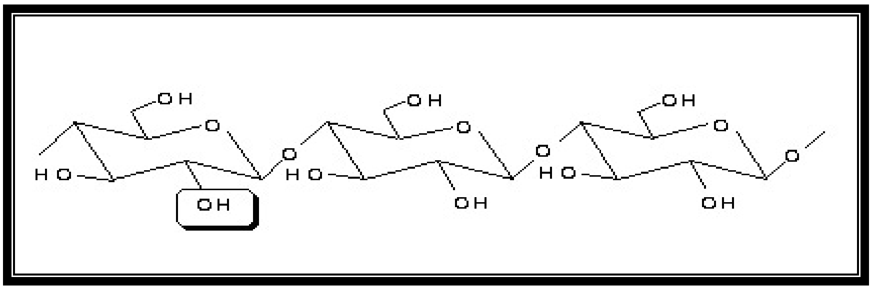
นอกจากนี้การนำวัสดุเชิงประกอบที่มีพอลิเมอร์เป็นเมทริกซ์ไปใช้งานทางด้านการแพทย์ พอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่น่าสนใจคือ ไคโตซาน เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติและมีสมบัติในการย่อยสลายได้เองในร่างกาย ซึ่งลดความเจ็บปวดในการผ่าตัดเอาชิ้นงานที่ไม่ย่อยสลายออกจากผู้ป่วยภายหลังการรักษาทำให้ลดเวลาในการรักษา อีกทั้งไคโตซานยังมีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีอีกด้วย

2.5 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน [16]

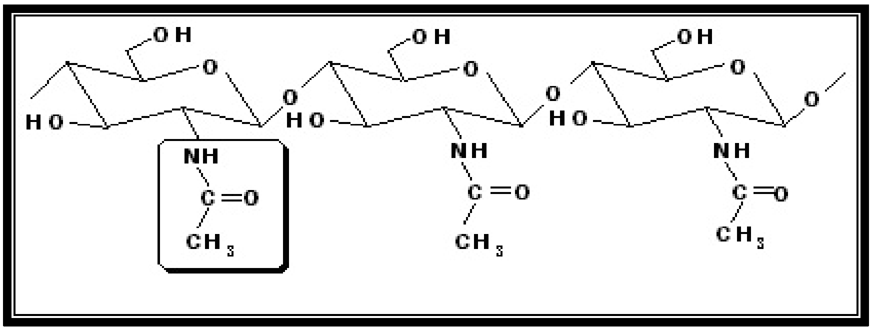
ไคตินเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งพอลิเมอร์ทั้งสองนี้ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างในการป้องกันและสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไคตินพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายรูปแบบ เช่น พบในเปลือกนอกของสัตว์จำพวกที่มีปล้อง เช่น กุ้ง ปู และแกนหลังปลาหมึก เป็นต้น ปริมาณของไคตินในสัตว์ต่างๆมีปริมาณตั้งแต่ 0.01% จนกระทั่งสูงถึง 40% ของน้ำหนักแห้งของมัน นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์ของเห็ดราและสาหร่ายบางสายพันธุ์ ไคตินได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1811 โดย Braconnot [17]พอลิเมอร์ชนิดนี้ถูกเรียกชื่อว่าไคตินในปี ค.ศ.1823 โดย Odier คำว่าไคติน Chitin มาจากคำว่า Chiton ที่เป็นภาษากรีก ซึ่งหมายถึง เกราะหุ้ม

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติจัดอยู่ในกลุ่มพวกคาร์โบไฮเดรต มีโครงสร้างทางเคมีเป็นเส้นตรงคล้ายกับเซลลูโลส ดังรูปที่ 2.4 แต่จะต่างกันที่ C-2 โดยเซลลูโลสจะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล แต่ไคตินจะประกอบด้วยหมู่อะซิทามิโด (acetamido group) ดังนั้นหน่วยย่อยของไคติน คือ 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosamine ดังรูปที่ 2.5

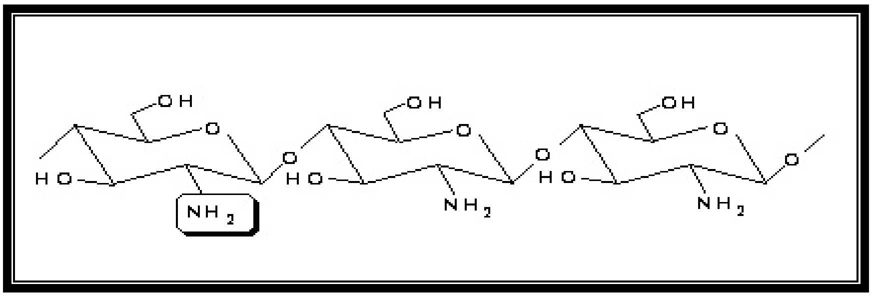
ไคโตซานไม่ค่อยพบในธรรมชาติและที่พบบ้างก็มีน้อย โดยจะพบในผนังเซลล์ของเห็ดราบางชนิดปกติแล้วไคโตซานจะถูกเตรียมโดยทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิติลของไคติน หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยา deacetylation โดยแช่ไคตินในสารละลายด่างเข้มข้นทำให้โครงสร้างทางเคมีของไคตินเปลี่ยนไปโดยหมู่อะซิทามิโด (-$NHCOCH_3$) เปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน (-NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ดังนั้น ไคโตซานคือพอลิเมอร์ของ 2-amino-2-deoxy-D-glucosamine ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของไคติน [18]



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน [18]

ไคตินที่ได้จากแต่ละแหล่ง มีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกันโดยแบ่งตามลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยได้ 3 กลุ่ม คือ

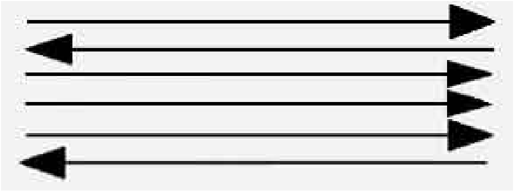
1. **ไคตินแบบแอลฟา** (α-form) มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะสวนทางกัน มีความแข็งแรงสูง ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้ง และกระดองปู ดังรูปที่ 2.7

รูปที่ 2.7 ไคตินแบบแอลฟา

2. **ไคตินแบบบีตา (β**-form) มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในทิศทางเดียวกัน จึงจับกันได้ไม่ค่อยแข็งแรง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบแอลฟา ได้แก่ ไคตินจากแกนปลาหมึก ดังรูปที่ 2.8

รูปที่ 2.8 ไคตินแบบบีตา

3. **ไคตินแบบแกมมา (γ**-form) มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะที่ไม่แน่นอน (สวนทางกันสลับทิศทางเดียวกัน) มีความแข็งแรงรองจากแบบแอลฟา ได้แก่ ไคตินจากเห็ด รา และพืชชั้นต่ำ ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ไคตินแบบแกมมา

โดยธรรมชาติจะพบแอลฟาของไคตินมากกว่าบีตาและแกมมา ทั้งนี้เพราะมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่โมเลกุล (intramolecular and intermolecular chain) มากกว่าจึงทำให้มีเสถียรภาพทางเคมี(chemical stability) มากกว่าแบบอื่น บีตา-ไคติน มีเสถียรภาพทางเคมีรองจาก แอลฟา-ไคติน ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า การมีเสถียรภาพที่น้อยทำให้มันมีโอกาสเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโครงสร้างจากบีตาเป็นแอลฟาในสารละลายกรดแก่ นอกจากนี้ยังมีโอกาสจับกับโมเลกุลของน้ำอย่างถาวรและกลายเป็นไคตินที่มีน้ำอยู่ หนึ่งโมเลกุล (chitin monohydrate) ได้อีกทางหนึ่ง

2.5.1 กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน [16]

เนื่องจากในธรรมชาติจะพบไคตินอยู่ในรูปของเส้นใยแทรกตัวอยู่ในเมทริกซ์ของโปรตีนและปะปนอยู่ร่วมกับแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ดังนั้นการสกัดไคตินออกจากเปลือกกุ้งหรือปูต้องผ่าน 2 กระบวนการ คือ การกำจัดแร่ธาตุที่ปนอยู่ออกก่อน (demineralization) ด้วยกรดเกลือเจือจาง (dilute mineral acid) และการละลายโปรตีนออก (deproteinization) ออก ด้วยเบสเจือจาง (dilute alkali) พร้อมกับให้ความร้อน ส่วนการผลิตไคโตซานจะเพิ่มอีก 1 กระบวนการหลังจากที่สกัดไคตินออกมาแล้ว คือ alkali hydrolysis ของไคตินด้วยเบสเข้มข้น (concentrated alkali) พร้อมกับให้ความร้อน หรือที่เรียกว่า กระบวนการกำจัดหมู่อะซิติล (Deacetylation)

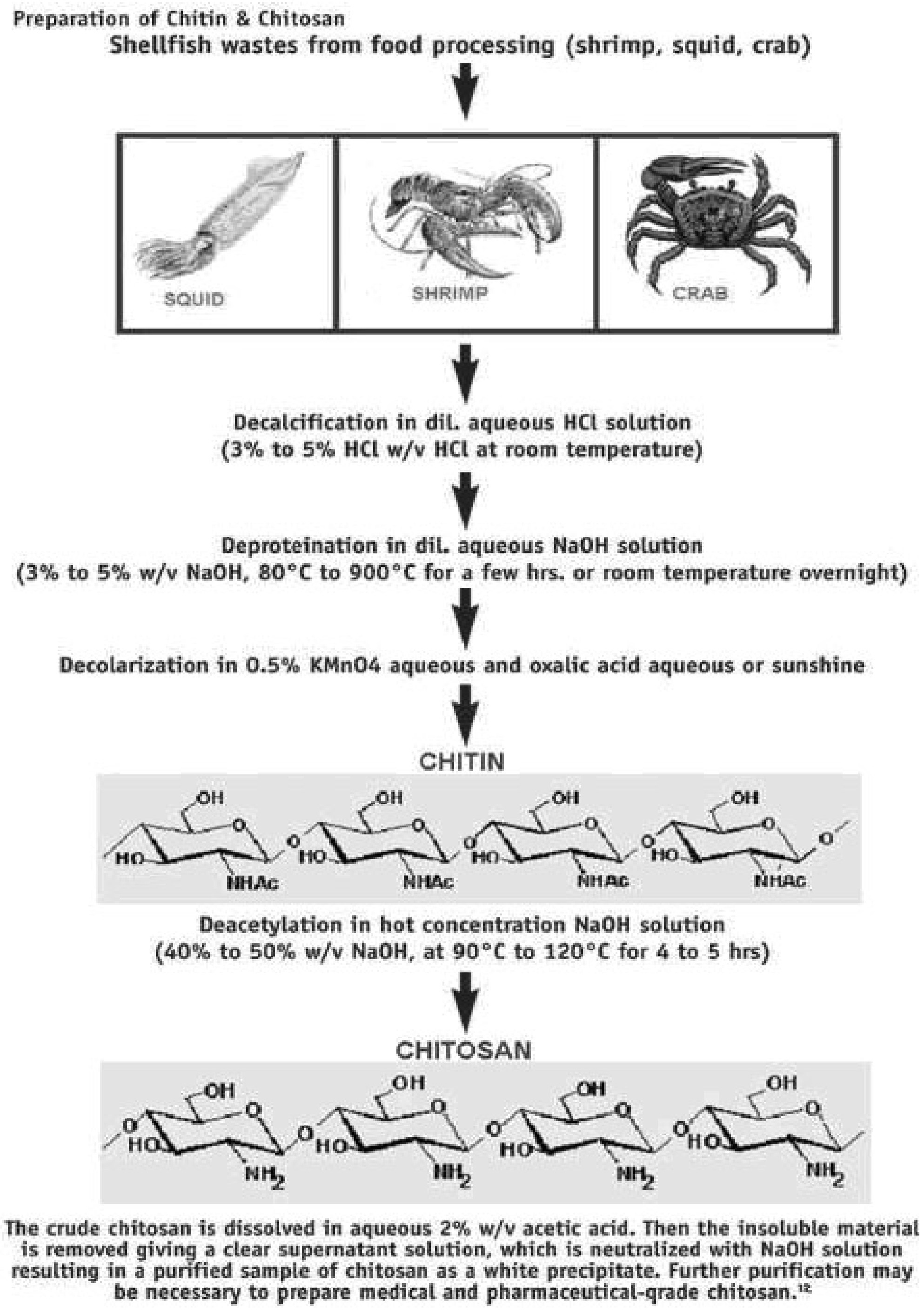
การผลิตไคตินและไคโตซานประกอบด้วยหลักการที่สำคัญ 3 ขั้นตอน คือ

1. การกำจัดเกลือแร่ (demineralization)
2. การกำจัดโปรตีน (deproteination)
3. การกำจัดหรือลดหมู่อะซิติล (deacetylation)

โดยทั้ง 3 ขั้นตอนนี้สามารถทำได้โดยกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ดังแสดงในรูปที่ 2.10

ไคติน-ไคโตซาน ในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของโคพอลิเมอร์ที่อยู่ร่วมกัน มีการกระจายตัวแบบสุ่ม (random copolymer) กระบวนการเปลี่ยนไคตินไปเป็นไคโตซานถ้าทำในสภาวะที่รุนแรงเกินไป สามารถทำลาย β-1,4-linkage ได้ ทำให้น้ำหนักโมเลกุลเล็กลง ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะเตรียมไคโตซานโฮโมพอลิเมอร์ได้จากขบวนการ alkali hydrolysis ของไคติน

ปัจจัยสำคัญในการแบ่งประเภทว่าเป็นไคตินหรือไคโตซาน คือ degree of N-acetylation (DA) หรือ degree of deacetylation (DD) ซึ่งบ่งบอกถึงอัตราส่วนของ N-acetyl glucosamine residue ต่อ glucosamine residue ในโครงสร้างของไคติน-ไคโตซาน โคพอลิเมอร์ โดยค่า DA สูงจะบ่งบอกถึงสัดส่วนของไคตินมาก ไคโตซานน้อย ในขณะที่ค่า DD สูงจะบ่งบอกถึงสัดส่วนไคโตซานมาก ไคตินน้อย จึงนิยมเรียกโคพอลิเมอร์ที่มี DA สูง หรือ DD ต่ำ ว่าไคติน และในทางกลับกัน โคพอลิเมอร์ที่มี DA ต่ำหรือ DD สูง ว่าไคโตซาน ค่า DA หรือ DD มีผลต่อสมบัติการละลาย (solubility) ของไคตินและไคโตซานอย่างมาก ไคตินและไคโตซานไม่มีจุดหลอมเหลวและจะสลายตัวไปก่อน (decompose) โดยไม่เกิดการหลอมเหลว การทำให้เป็นของเหลวสามารถทำได้วิธีเดียว คือ การละลาย



รูปที่ 2.10 การเตรียมไคตินและไคโตซาน [19]

ไคตินและไคโตซานมีสมบัติพื้นฐานที่เข้ากับธรรมชาติได้ดี ย่อยสลายง่าย ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งไคโตซาน มีหมู่อะมิโนที่แสดงสมบัติพิเศษหลายประการที่ต่างจากเซลลูโลส เช่น การละลายได้ในกรดอินทรีย์เจือจาง การจับกับไอออนของโลหะได้ดี และการมีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ไคโตซานยังมีสมบัติสำคัญอีกหลายประการ เช่น เป็นวัสดุที่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) สามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ

เช่น เจล [20] เม็ด [21] เส้นใย [22] เมมเบรน [23] เป็นต้น ไม่เป็นพิษ และมีประจุบวกอ่อนๆทำให้ยึดเกาะได้ดี จึงมีการนำไคโตซานมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในหลายๆด้าน เช่น ในอุตสาหกรรมยาเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยยาให้ถูกปลดปล่อยออกมาช้าๆ และใช้เป็นตัวนำส่งยา (drug carrier) ในอุตสาหกรรมเกษตรใช้เคลือบผลไม้เพื่อชะลอการสุก ใช้ผสมเครื่องสำอางเพื่อให้มีความหนืด ใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารควบคุมน้ำหนักในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้เป็นตัวสร้างตะกอน (flocculant) ในการบำบัดน้ำเสีย ในทางการแพทย์ใช้ทำเป็นแผ่นปิดแผลไฟไหม้และน้ำร้อนลวก ใช้ทำแผ่นเยื่อเลือกผ่าน เป็นต้น

ไคตินและไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของร่างกาย สามารถรับประทานได้ และย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ให้ความสนใจกับการนำสารไคติน-ไคโตซานมาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

<u>โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน (chitosan-based scaffold)</u>

ไคโตซานมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50,000 -1,000,000 สมบัติโดยทั่วไป คือ มีโครงสร้างเป็นโครงร่างผลึก (crystalline) เป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติประเภทย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีความสามารถในการละลายในสารละลายที่เป็นกรด ที่มีค่า pH < 6.3 และไม่ละลายในสารละลายที่มีค่า pH > 7 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไคโตซานจัดเป็นสารที่มีสมบัติในการละลายแบบที่ขึ้นกับค่า pH (pH -dependent soluble) [24] เมื่อนำไคโตซานมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า มีขนาดของรูพรุนระหว่าง 1-250 ไมครอน [25] และมีมอดุลัสความยืดหยุ่นตั้งแต่ 0.03 - 7 เมกะพาสคัล [24] และสามารถทนความเครียด (strain) ได้ 30% - 100% ซึ่งขึ้นอยู่กับรูปร่างและโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่จะนำไปใช้ [25] ซึ่งความแข็งแรงในระดับนี้ นับว่ามีความเพียงพอสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อในการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ [12]

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซาน โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze dry) ที่อุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง -78 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีการเตรียมในลักษณะนี้ จะได้ขนาดรูพรุน (เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน) ในโครงเลี้ยงเซลล์ประมาณ 100 – 200 ไมครอน ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไคโตซานและอุณหภูมิในการ Freeze-dry ถ้าหากอุณหภูมิที่ให้ต่ำขนาดของรูพรุนจะมีขนาดเล็กตามไปด้วย [25]

สมบัติด้านชีวภาพไคโตซานมีสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ประเภท Glycosaminoglycan ซึ่งพบใน Hyaline Cartilage's Matrix ดังนั้นปัญหาทางด้านความเข้ากันได้กับร่างกายและกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity) ต่างๆ จึงไม่ใช่ปัญหาทางด้านการผลิต [24]

ในปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตไคโตซานในระดับที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร (Food Grade) ที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่า %DD (Degree of Deacetyltion) ตั้งแต่ 0% ถึง 95%

ซึ่งค่า %DD ใช้บ่งบอกถึงความเป็นผลึกของไคโตซานโดยที่ 0% DD หมายถึง ไคตินได้มีหมู่ Acetylอยู่ในโครงสร้างทั้งหมด และที่ 100% DD หมายถึง ไคโตซาน คือ ไม่มีหมู่ Acetyl ในโครงสร้าง

ในการใช้ไคโตซานเป็นโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า ในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนที่ความเข้มข้น 6 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไปได้ 1 สัปดาห์ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 66 ± 28% ในขณะที่ปริมาณของ Proteoglycan ที่เกิดขึ้นที่ผิวของไคโตซานมีปริมาณ 2580 ± 460 cpm/10^6 เซลล์ [24]

นอกจากนี้ยังมีการเตรียมวัสดุเชิงประกอบระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (macroporous chitosan/calcium phosphate scaffold) [26] โดยไคโตซานทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะ ในขณะที่แคลเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นสารว่องไวทางชีวภาพ (bioactive agent) จะช่วยเสริมการเกาะติดของกระดูก (osteoblast) และเพิ่มความแข็งแรงให้แก่โครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยศึกษาการเตรียมไคตินเมทริกซ์ที่มีรูพรุน (porous chitin matrixes) [27] โดยเริ่มจากการเตรียมไคตินเจล จากสารละลายไคติน ที่ละลายในระบบตัวทำละลาย 5% N, N-dimethylacetamide (DMAc)/lithium chloride (LiCl) แล้วทำแห้งเยือกแข็ง (lyophilization) ทำให้เกิดเป็นไคตินเมทริกซ์ที่มีรูพรุน พบว่ารูพรุนที่เกิดขึ้นมีขนาดอยู่ในช่วง 100-500 ไมครอน และเมื่อทดลองกับ fibroblast cell ของหนูและมนุษย์พบว่า เซลล์เหล่านี้สามารถเจริญเติบโตปกคลุมรูพรุนได้

2.5.2 ข้อจำกัดในการนำไคโตซานไปใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

เนื่องจากไคโตซานมีประจุบวกอ่อนๆ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มายึดเกาะได้ดีแต่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกค่อนข้างต่ำ จึงเป็นสาเหตุให้เซลล์ที่มายึดเกาะเกิดการเจริญเติบโตได้ช้า ดังนั้นการแก้ปัญหา คือ การเติมสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งได้แก่ แคลเซียมฟอสเฟต

2.6 สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต [28]

นอกจากแคลเซียมฟอสเฟตชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์แล้วยังมีสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตอีกหลายชนิดที่เข้ามามีบทบาทในงานวิจัยด้านวัสดุทางการแพทย์และอวัยวะเทียม สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตเหล่านี้แตกต่างกันที่อัตราส่วนโดยโมลของ Ca:P ในโครงสร้างและชนิดของไอออนองค์ประกอบอื่นๆ ตัวอย่างของแคลเซียมฟอสเฟตบางชนิดแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แคลเซียมฟอสเฟตชนิดต่างๆ ที่มีอัตราส่วน Ca:P แตกต่างกัน [28]

สูตร	ชื่อ	อักษรย่อ	Ca:P
$Ca_4 (PO_4)_2 O$	Tetracalcium phosphate	TeCP	2.0
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Hydroxyapatite	Hap	1.67
$Ca_{10-x}H_{2x}(PO_4)_6(OH)_2$	Amorphous calcium phosphate	ACP	-
$Ca_3(PO_4)_2$	Tricalcium phosphate	TCP	1.50
$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	Octacalcium phosphate	OCP	1.33
$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Dicalcium phosphate dehydrate	DCPD	1.0
$CaHPO_4$	Dicalcium phosphate	DCP	1.0
$Ca_2P_2O_7$	Calcium pyrophosphate dehydrate	CPPD	1.0
$Ca_7(P_5O_{16})_2$	Heptacalcium dihydrogen phosphate	HCP	0.7
$Ca_2H_2P_6O_4$	Tetracalcium dihydrogen phosphate	TCHP	0.67
$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	Monocalcium phosphate mpnphydrate	MCPM	0.5
$Ca(PO_3)_2$	Calcium metaphosphate (α,β,γ)	CMP	0.5

จากงานวิจัยของ สหาวัตร [29] ได้เตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ โดยการใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพา-ไทต์ คือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20 M และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.12 M จากนั้นควบคุมเวลาที่ทำให้เกิดการแพร่ของแคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ในวัสดุเชิงประกอบตามสมการที่ (1)

$$10CaCl_2 + 6Na_2HPO_4 + 2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 12NaCl + 8HCl \quad (1)$$

ซึ่งทำให้สามารถเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีผลึกสารไฮดรอกซีอะพาไทต์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกันในสารละลายไคโตซานทำให้ผลึกไฮดรอกซี-อะพาไทต์ไม่ตกตะกอนเมื่อเวลาผ่านไป ดีกว่าการผสมผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยตรงซึ่งจะทำให้เกิดการตกตะกอน

2.6.1 ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [30]

2.6.1.1 โครงสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) เป็นสารประกอบระหว่างธาตุแคลเซียมและฟอสเฟต มีอัตราส่วนโดยโมลของ Ca:P เป็น 1.67:1 คำว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ มาจาก “ไฮดรอกซี (Hydroxy)” ซึ่งหมายถึง ไฮดรอกไซด์ไอออน (Hydroxide ion) และ คำว่า “อะพาไทต์(Apatite)” เป็นชื่อของผลึกแร่ธาตุที่มีองค์ประกอบดังนี้ $M_{10}(ZO_4)_6X_2$

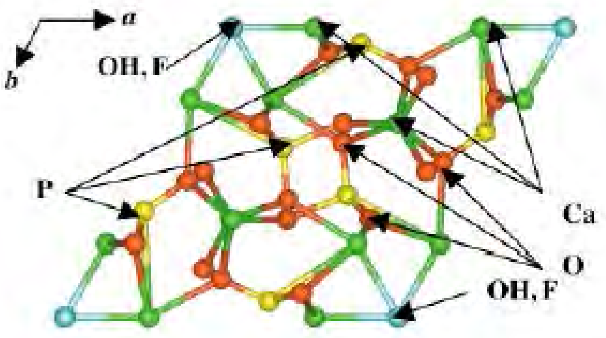
สารประกอบอะพาไทต์ (Apatite compound) จะมีส่วนประกอบแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับไอออนที่เข้าแทนที่ในตำแหน่ง M Z และ X ซึ่งไอออนที่เป็นไปได้ในการแทนที่ได้แก่

M = Ca Sr Ba Cd Pb Mg Na K H D ฯลฯ

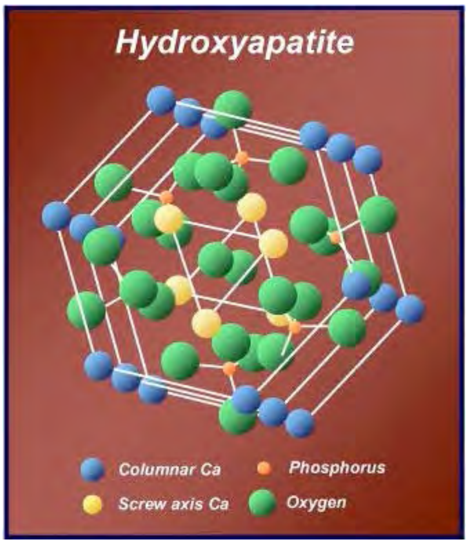
Z = P V As S Si Ge Cr B ฯลฯ

X = OH OD CO_3 O BO_2 F Cl Br ฯลฯ

ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีรูปผลึกเป็นแบบเฮกซะโกนัล มีกลุ่มปริภูมิ(Space group) P63/m มีค่า a = b = 9.342 c = 6.881 A □และมุม α = β = 90° γ = 120° โดยมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ที่บริเวณมุมที่ฐานรอมบิก (Rhombic) ของหน่วย ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเป็นคอลัมน์ในที่ว่าง ซึ่งมีความสูงเป็นครึ่งหนึ่งของความสูงหน่วย คอลัมน์ของหมู่ไฮดรอกซิลจะถูกล้อมรอบด้วยแคลเซียมไอออน 6 ไอออน ที่จัดเรียงตัวในลักษณะสามเหลี่ยมด้านเท่า 2 รูป ตั้งฉากกับคอลัมน์ของไฮดรอกซิล โดยมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นศูนย์กลางแคลเซียมไอออนอีก 4 ไอออนที่เหลือจะเรียงต่อกันเป็นคอลัมน์ 2 คอลัมน์ระหว่างสามเหลี่ยมด้านเท่าของแคลเซียมไอออนขนานกับคอลัมน์ของไฮดรอกซิล แคลเซียมไอออนเหล่านี้จะถูกล้อมรอบด้วยออกซิเจนของออร์โทฟอสเฟตเททระฮีดรัล (Ortho phosphate tetrahedral) โดยออกซิเจนของไฮดรอกซิล (Hydroxyl oxygen) จะอยู่ห่างจากระนาบของสามเหลี่ยมไฮดรอกซิล ประมาณ 0.3 A□ดังรูปที่ 2.11 และ 2.12



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของอะพาไทต์ แสดงตำแหน่งของอะตอมฟลูออไรด์หรืออะตอมไฮดรอกซิล (O = แดง Ca = เขียว P = เหลือง F(OH) = ฟ้า) [31]



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในหน่วยเซลล์เฮกซะโกนัล (hexagonal apatite unit cell) [32]

ไฮดรอกซีอะพาไทต์พบได้ในรูปแร่ผลึกตามธรรมชาติ และภายในร่างกายเช่นใน extracellular matrix กระดูกและฟัน ในปัจจุบันเราสามารถสังเคราะห์ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้โดยมีกรรมวิธีในการสร้างให้เลือกมากมายหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็จะทำให้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ได้มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันไป สมบัติหลักของไฮดรอกซีอะพาไทต์คือเป็นผลึก มีรูพรุน เปราะแตกง่าย และสามารถเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatible) ซึ่งสมบัติประการหลังนี้ จึงมีการนำไฮดรอกซีอะพาไทต์มาใช้ในวงการแพทย์หลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการใช้เป็นสารบรรจุแทนกระดูกที่ถูกตัดทิ้ง (bone fillers) [33] หรือการใช้เคลือบโลหะสำหรับปลูกแทนกระดูก [34] เป็นต้น

นอกจากในทางการแพทย์แล้วไฮดรอกซีอะพาไทต์ยังถูกนำมาใช้ในการวิจัยพื้นฐานทางชีววิทยา เช่น ในงานวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) [35] ใช้เป็นฐานให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนนอกจากนี้ ด้วยโครงสร้างที่มีทั้งประจุบวกและลบจากธาตุแคลเซียมและกลุ่มฟอสเฟตในผลึกโมเลกุลเดียวกัน จึงมีการนำเอาไฮดรอกซีอะพาไทต์มาพัฒนาใช้ในงานโครมาโทกราฟี [36] เพื่อแยกและทำสารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์ ซึ่งจุดเด่นของไฮดรอกซีอะพาไทต์คือเมื่อนำมาใช้กับสารละลายที่แตกต่างกัน สมบัติในการจับกันของสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดต่อไฮดรอกซีอะพาไทต์ก็จะต่างกันไปด้วย การผสมผสานลำดับของสารละลายต่างชนิด ก็จะทำให้เราใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ แยกสารที่ต้องการได้โดยไม่ต้องพึ่งโครมาโทกราฟี ชนิดอื่นและในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการแยก DNA RNA แอนติบอดี รวมถึงโปรตีนบางชนิด จนสามารถใช้งานได้จริง เป็นต้น

2.6.1.2 ความสามารถในการละลายของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [30]

ไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถละลายได้ในกรด และละลายได้เล็กน้อยในน้ำกลั่น แต่ไม่สามารถละลายได้ในแอลคาไลโดยมีค่าการละลายในน้ำกลั่น (pKs) ประมาณ 120

$$pKs = -\log([Ca]^{10}[PO_4]^{6}[OH]_2) \cong 120$$

ความสามารถในการละลายในน้ำกลั่นจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) แต่ความสามารถในการละลายของไฮดรอกซีอะพาไทต์จะเปลี่ยนแปลงเมื่อมีกรดอะมิโน โปรตีน เอนไซม์และสารเคมีอื่นๆผสมอยู่ในสารละลาย สมบัติด้านการละลายนี้สัมพันธ์กับความสัมพันธ์ในการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อ และปฏิกิริยาเคมีกับสารประกอบอื่นๆ อย่างไรก็ตามอัตราของการละลายยังขึ้นอยู่กับความแตกต่างของรูปร่าง ความพรุน ขนาดผลึก และการเสียรูปเนื่องจากความเครียด (strain defects) เมื่อนำไฮดรอกซีอะพาไทต์ไปเผาที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ความสามารถในการละลายลดลง สำหรับเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังจะมีอัตราการละลายเป็น 0.1 มิลลิเมตรต่อปี โดยที่ไฮดรอกซีอะพาไทต์จะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับโปรตีน ไขมัน สารอนินทรีย์อื่นๆ และแร่ธาตุอินทรีย์ได้

ในความเป็นจริงองค์ประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์ของกระดูกจะแตกต่างกันเล็กน้อยตามอายุ สปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต (species) และส่วนของอวัยวะ เป็นต้น อัตราส่วนโดยโมลของ Ca:P ในเนื้อเยื่อแข็งประเภทกระดูกและฟันจะเพิ่มขึ้นตามอัตราการเจริญเติบโตจนมีค่าใกล้เคียง 1.67 ผลึกอะพาไทต์ชีวภาพจะมีขนาดเล็กมาก โดยมีขนาดเล็กกว่า 0.2 ไมโครเมตร และมีรูปร่างเป็นแท่งยาวคล้ายรูปเข็ม (needle-like) เนื่องจากอะพาไทต์มีผลึกขนาดเล็กจึงช่วยให้การสร้างและซ่อมแซมกระดูกเกิดได้เร็ว

2.6.1.3 แหล่งของสารไฮดรอกซีอะพาไทต์ [28]

การเตรียมไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถเตรียมได้จาก 3 แหล่ง คือ

1. การสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์จากกระบวนการทางเคมี เช่น ปฏิกิริยาระหว่างแคลเซียมไนไตรทและแอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นต้น

2. การสกัดแคลเซียมคาร์บอเนตจากปะการัง โดยนำมาผ่านกระบวนการเปลี่ยนเป็นสารไฮดรอกซีอะพาไทต์ แต่ปะการังมีปริมาณน้อย และมีปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมจึงไม่นิยมนำมาใช้

3. การสกัดไฮดรอกซีอะพาไทต์จากกระดูกสัตว์ เช่น โค กระบือ ช้าง ปลา สุกร รวมทั้งจากมนุษย์ โดยนิยมใช้กระดูกโคและกระบือมากกว่า เนื่องจากมีปริมาณมากและเป็นสัตว์ที่มนุษย์ใช้ประโยชน์อยู่แล้ว ทั้งใช้ในการบริโภคและใช้แรงงาน

2.6.1.4 วิธีการเตรียมสารไฮดรอกซีอะพาไทต์[30]

วิธีที่ใช้ในการเตรียมสารไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์มี 4 วิธี คือ วิธีการแบบเปียก (wet method) วิธีแบบแห้ง (dry method) วิธีการไฮโดรเทอร์มัล (hydrothermal method) วิธีการแอลคอกไซด์ (alkoxide method)

วิธีการแบบเปียก (wet method)

นิยมใช้ในการเตรียมสารไฮดรอกซีอะพาไทต์ปริมาณมากๆ สามารถแบ่งกระบวนการสังเคราะห์ได้ 2 วิธี คือ

1. ปฏิกิริยาการสะเทินของสารละลายเบส ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \longrightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O$$

2. ปฏิกิริยาเคมีระหว่างเกลือแคลเซียมและเกลือฟอสเฟต

$$10CaCl_2 + 6Na_2HPO_4 + 2H_2O \longrightarrow Ca10(PO_4)_6(OH)_2 + 12NaCl + 8HCl$$

ผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เตรียมขึ้นจากกระบวนการแบบเปียกเป็นอนุภาคละเอียดที่มีพื้นที่ผิวสูงมากเป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ ชนิดนอนสตอยชิโอเมตรี (nonstoichiometry) ชนิดขาด Ca^{2+} (Ca^{2+} deficiency) $Ca/P < 1.67$ และมีความเป็นผลึกต่ำกว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากวิธีการอื่นๆ ความเป็นผลึกและอัตราส่วน Ca/P ขึ้นอยู่กับแฟกเตอร์หลายอย่างเช่น ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น pH ระยะเวลาในการแช่ (aging time) และอุณหภูมิ

วิธีการแบบแห้ง (dry method)

วิธีการแบบแห้งเป็นวิธีการที่ใช้ประโยชน์จาก ปฏิกิริยาในสภาวะของแข็ง (solid state reaction) ระหว่างสารประกอบแคลเซียมและฟอสฟอรัส ประโยชน์ของวิธีการนี้ คือ สามารถเตรียมไฮดรอกซีอะพาไทต์มีอัตราส่วน Ca/P =1.67 การสังเคราะห์นิยมทำที่อุณหภูมิสูงและในบรรยากาศของไอน้ำ เพื่อเป็นแหล่งของ OH- ในปฏิกิริยา ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้น คือ

$$6CaHPO_4.2H_2O + 4CaCO_3 \longrightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 4CO_2 + 14H_2O$$

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์จากวิธีการนี้จะมีอนุภาคที่ละเอียดและมีผลึกสูง

วิธีการไฮโดรเทอร์มัล (hydrothermal method)

วิธีนี้ทำโดยการนำสารเคมีที่เป็นเกลือของแคลเซียมและฟอสเฟต มาทำปฏิกิริยากันภายในบรรยากาศที่มีความดันและอุณหภูมิสูง เช่น ในการทดลองของ Sun [37] ใช้ $Ca(NO_3)_2$ ทำปฏิกิริยากับ KH_2PO_4 ใน NaOH ที่ 500 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 360 บรรยากาศ เป็นเวลา 10 วัน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นดังสมการนี้

$$10Ca(NO_3)_2 + 6KH_2PO_4 + 14NaOH \xrightarrow[\text{10 days}]{\text{500°C 360 atm}} Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 6KNO_3 + 14NaNO_3 + 12H_2O$$

ส่วนวิธีของ Somiya [38] ใช้ $Ca(NO_3)_2$ ทำปฏิกิริยากับ KH_2PO_4 ใน NaOH และควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 100-200 องศาเซลเซียส และความดัน 0.1-0.2 MPa เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ได้จากวิธีนี้จะมีลักษณะเป็นผลึกเดี่ยว (Single crystal) ที่สมบูรณ์ และสามารถทำให้มีขนาดต่างๆได้

วิธีการแอลคอกไซด์ (alkoxide method)

วิธีการนี้จะใช้เตรียมฟิล์มบางของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (thin hydroxyapatite film) ตัวอย่างของวิธีการเตรียมนำแคลเซียมไนเตรต ไตรเมทิลฟอสเฟต มาใช้เป็นสารตั้งต้นที่ละลายในเอทานอลหรือสารละลายฟอร์มาไมด์ หลังจากระเหยสารละลายออกไป จะถูกนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500-1000 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมให้เป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีลักษณะเป็นผลึก (well crystallized hydroxyapatite) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็น ดังนี้

$$Ca(NO_3)_2.4H_2O + (CH_3O)_3PO \longrightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$$

ตารางที่ 2.3 สมบัติที่สำคัญของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [39]

สมบัติ	ค่ามาตรฐาน
ความหนาแน่น	3.16 g/cm^3
ความแข็งแรงต่อการกดอัด	100 – 200 MPa
ความแข็งแรงต่อการดัดโค้ง	10 MPa (Max)
ค่ายังมอดุลัส	100 GPa (Max)
ความแข็ง	500 HV
การขยายตัวขณะได้รับความร้อน	11 x 10-6 k-1
จุดหลอมเหลว	1650 °C

ไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นวัสดุทางชีวภาพที่มีการศึกษาในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกมากที่สุด เนื่องจากไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี มีความสามารถที่จะเกิดพันธะเคมี กับเนื้อเยื่อรอบๆได้โดยตรงและสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกได้ นอกจากนี้ยังไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบและไม่ต่อต้านกับระบบภูมิคุ้มกัน (non-immunogenic) อย่างไรก็ตามไฮดรอกซีอะพาไทต์มีข้อจำกัด คือ ความเปราะเมื่อนำไปใช้ในกระบวนการทดแทนกระดูก และขึ้นรูปได้ยาก

2.6.1.5 **การประยุกต์ใช้งานของไฮดรอกซีอะพาไทต์ในทางการแพทย์** [40]

โดยทั่วไปแล้วการนำสารไฮดรอกซีอะพาไทต์ไปใช้งานทดแทนกระดูกในต่างประเทศแบ่งได้ 3 ลักษณะ คือ

สารไฮดรอกซีอะพาไทต์แบบผง (powder hydroxyapatite) สามารถใช้เคลือบลงบนข้อสะโพกเทียมในส่วนที่เป็นแกนโลหะ เพื่อให้โลหะ ทนทานต่อการกัดกร่อนจากของเหลวภายในร่างกายที่โดยปกติจะมีสภาพเป็นกรดอ่อน ๆ อยู่แล้ว และหากเกิดการเจ็บป่วย สภาพภายในร่างกายก็จะมีความเป็นกรดยิ่งขึ้น ดังนั้น การใช้สารไฮดรอกซีอะพาไทต์เคลือบบนผิวข้อสะโพกเทียมจะทำให้ อุปกรณ์มีความทนทานมากยิ่งขึ้น และยังช่วยสร้างพันธะระหว่างข้อสะโพกเทียมกับกระดูกของผู้ป่วยด้วย

สารไฮดรอกซีอะพาไทต์แบบชิ้นเนื้อแน่น (Dense hydroxyapatite) จะมีสมบัติเชิงกลดีกว่าแบบรูพรุน จึงสามารถรับน้ำหนักได้มากกว่า การนำไปใช้งานในต่างประเทศ มักนำไปทดแทนในส่วนกระดูกสันหลังของผู้ป่วย สารไฮดรอกซีอะพาไทต์ก็จะเป็นตัวเร่ง ให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อให้มาเกาะ และทำให้ระบบในร่างกายทำงานได้ดีขึ้น

สารไฮดรอกซีอะพาไทต์แบบรูพรุน (Porous hydroxyapatite) เป็นสารที่ต้องการมากที่สุดในขณะนี้ เพื่อใช้เป็นตัวเติมแทนกระดูกของผู้ป่วย สำหรับบริเวณต่างๆ ของร่างกายที่มีการสูญเสียกระดูกไม่ว่าจะเนื่องมาจาก โรคมะเร็ง การติดเชื้อ หรืออุบัติเหตุก็ตาม โดยอาศัยความเป็นรูพรุนทำให้เซลล์และเลือดนำพาแร่ธาตุต่างๆเข้าไปได้ อย่างทั่วถึงช่วยทำให้ เกิดการสร้างกระดูกเชื่อมต่อได้ดี

นอกจากนี้การนำไปใช้งานทางด้านวัสดุทางการแพทย์นั้น จะมีอยู่ 2 ลักษณะคือ

1. วัสดุการแพทย์ที่ใส่เข้าไปในร่างกายจะทำหน้าที่ทดแทนอวัยวะนั้น ๆ โดยไม่จำเป็นต้องมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบ เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย

2. วัสดุการแพทย์ที่ใส่เข้าไปในร่างกายจะต้องมีส่วนร่วมหรือมีหน้าที่สัมพันธ์กับอวัยวะหรือส่วนต่าง ๆ ที่อยู่ในร่างกาย แต่ต้องไม่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อในร่างกายซึ่งสมบัติเฉพาะของสาร

ไฮดรอกซีอะพาไทต์นี้ สามารถนำไปใช้ในร่างกาย เพื่อทำให้เกิดการสร้างพันธะระหว่าง วัสดุหรืออุปกรณ์การแพทย์กับเซลล์กระดูกคนไข้ได้ดี

ปัจจุบันมีการนำกระดูกเทียมมาใช้ทางการแพทย์แล้ว แต่ข้อจำกัดของกระดูกเทียมที่พบคือมีความแข็งไม่เพียงพอ จึงมีความร่วมมือกันระหว่างผู้เชี่ยวชาญทางด้านวัสดุเชิงประกอบและนักวิจัยทางการแพทย์ เพื่อคิดค้นกระดูกเทียมทำจากวัสดุสังเคราะห์ที่รวมทั้งสมบัติทางโครงสร้างและสมบัติทางชีวภาพเข้าด้วยกัน

2.6.2. ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต [41]

2.6.2.1 โครงสร้างผลึกไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ($CaHPO_4$• $2H_2O$) เป็นสารประกอบระหว่างธาตุแคลเซียมและฟอสเฟต มีอัตราส่วนโดยโมลของ Ca:P เป็น 1:1 เป็นที่รู้จักอีกชื่อหนึ่งว่า แคลเซียมมอโนไฮโดรเจนฟอสเฟต

ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตมีรูปผลึกเป็นมอโนคลินิก (Monoclinic) โดยขนาดหน่วย (Unit cell) แสดงข้อมูลรายละเอียดดังตารางที่ 2.4 ซึ่งพบมากในร่างกายที่บริเวณหินน้ำลาย บางทีเรียกว่า หินปูน (Dental calculi) เป็นสารแข็งที่ติดอยู่บนฟัน เกิดจากการสะสมของ แร่ธาตุบนคราบจุลินทรีย์ สามารถพบได้ ทั้งเหนือเหงือก และใต้เหงือก นอกจากนี้ยังพบที่หินปูนสะสมในกระดูกอ่อน (chondrocal - cinosis) และกระดูกที่สลายตัว (decomposed bones) เป็นต้น

ตารางที่ 2.4 ลักษณะไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่สังเคราะห์ขึ้น [41]

Calcium phosphate	Molecular formula	Crystal habit	Space group	Ca/P[a]
Dicalcium phosphate, dihydrate, brushite, DCPD	$CaHPO_4 \cdot H_2O$	monoclinic a = 5.182 Å b = 15.18 c = 6.239 B = 116 25'	C2/c	1.0

2.6.1.2 วิธีการเตรียมสารไดแคลเซียมฟอสเฟต

สำหรับไดแคลเซียมฟอสเฟตมีปริมาณของฟอสฟอรัส 18.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียม 23 เปอร์เซ็นต์ ขั้นตอนในการผลิตไดแคลเซียมฟอสเฟตเริ่มจากการนำกรดฟอสฟอริกที่สกัดฟลูออรีนแล้ว (defluorinated phosphoric acid) มาทำปฏิกิริยาเคมีกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (รูปที่ 2.13) ซึ่งผลผลิตที่ได้อาจเป็นไดแคลเซียมฟอสเฟตชนิดที่มีน้ำในโครงสร้าง หรือแคลเซียมออร์โทฟอสเฟตไดไฮเดรท (calcium orthophosphate dihydrate : [$CaHPO_4.2H_2O$]) หรือได้เป็นไดแคลเซียม

ฟอสเฟตชนิดที่ไม่มีน้ำในโครงสร้าง หรือ แคลเซียมออร์โทฟอสเฟตแอนไฮเดรต (calcium orthophosphate anhydride : [$CaHPO_4$]) ผลผลิตที่ได้จะขึ้นกับความสามารถในการควบคุมสภาวะการเกิดปฏิกิริยาเคมีไดแคลเซียมฟอสเฟตทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันในเรื่องของการใช้ประโยชน์ได้ของฟอสฟอรัส โดยไดแคลเซียมฟอสเฟตชนิดที่มีน้ำในโครงสร้างจะมีปริมาณของฟอสฟอรัสที่ย่อยได้สูงกว่าชนิดที่ไม่มีน้ำในสูตรโครงสร้าง [42]

$$H_3PO_4 + Ca(OH)_2 \longrightarrow CaHPO_4 \cdot 2H_2O$$

กรดฟอสฟอริก แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมออร์โทฟอสเฟตไดไฮเดรท

(commercail name : ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต)

$$H_3PO_4 + Ca(OH)_2 \longrightarrow CaHPO_4 + 2H_2O$$

กรดฟอสฟอริก แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมออร์โทฟอสเฟตแอนไฮเดรท น้ำ

(commercail name : ไดแคลเซียมฟอสเฟต)

รูปที่ 2.13 ปฏิกิริยาทางเคมีของการเกิดไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต [42]

2.6.1.3 การประยุกต์ใช้งานของไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต [43]

การใช้ประโยชน์ของสารไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

- ใช้ทำอาหาร แร่ธาตุในอาหารเสริม อาหารอื่น ๆ สารขัดฟันในยาสีฟัน ผงฟู แคลเซียมเสริม ใช้ในการผลิตแก้ว
- ยา และฟอสเฟอร์ ในอุตสาหกรรมยา ทำปุ๋ย สารทำให้พลาสติกอยู่ตัว ทำแป้งเค้ก ยีสต์

ด้านอันตรายต่อสุขภาพ

1. สัมผัสทางหายใจ - การหายใจเข้าไปจะก่อให้เกิดการระคายเคืองจมูก และคอ ถ้าสารมีความเข้มข้นสูง จะทำให้เกิดอาการไอเล็กน้อย ระคายเคืองชั่วคราว การสัมผัสสารที่มีความเข้มข้นสูง ๆ เป็นระยะเวลานาน ทำให้มีเยื่อเมือกเพิ่มขึ้นในจมูก และทางเดินหายใจ ซึ่งจะหายไปเมื่อหยุดสัมผัสสาร สารนี้ทำให้เกิดโรคหลอดลมอักเสบ (แสบไหม้ทางเดินหายใจ ปอด)
2. สัมผัสทางผิวหนัง - การสัมผัสถูกผิวหนังจะก่อให้เกิดการระคายเคืองขึ้นอยู่กับ ค่า pH ของสาร
3. กินหรือกลืนเข้าไป - การกลืนหรือกินเข้าไป สารนี้มีความเป็นพิษต่ำ สารนี้มีผลต่อไต ต่อมพาราไธรอยด์ และกระดูก
4. สัมผัสถูกตา - การสัมผัสสารนี้ทางตา จะทำให้เกิดการระคายเคือง น้ำตาไหล และปวดตาชั่วคราว

5. การก่อมะเร็งและความผิดปกติอื่น ๆ – สารนี้ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง ไม่ทำอันตรายต่อทารกในครรภ์ สารนี้ไม่สะสมในร่างกาย จะดูดซึมจากระบบย่อยอาหาร และขับออกทางปัสสาวะ

2.6.1.4 การประยุกต์ใช้งานของไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตทางการแพทย์

การใช้งานทางการแพทย์อยู่ในขั้นศึกษาวิจัย โดยในปี 2007 Lizhi He [44] ศึกษาสารที่สามารถเคลือบฟันในสภาวะกรด เนื่องจากสภาวะความเป็นกรดในการย่อยเศษอาหารที่ติดตามซอกฟัน ก่อให้เกิดการกัดกร่อนของเนื้อฟัน โดยมีรายงานว่าสารไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตไม่เกิดการละลายและสามารถจับตัวเป็นผลึกได้ในสภาวะกรด จึงเป็นสารแคลเซียมฟอสเฟตที่น่าสนใจพัฒนาให้เป็นสารเคลือบฟันเพื่อป้องกันพันผุ โดยงานวิจัยนี้ใช้ผงแคลเซียมดิฟฟิเชียนไฮดรอกซีอะพาไทต์ทำปฏิกิริยาสารไตรไฮโดรเจนฟอสเฟตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดเป็นผลึกไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่เคลือบบนผิวเนื้อฟัน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตโดยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ [29] โดยจะสังเคราะห์วัสดุเชิงประกอบที่มีส่วนประกอบของแคลเซียมฟอสเฟตสองชนิดผลึก คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์และไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตในสารละลายไคโตซานพร้อมทั้งขึ้นรูปเป็นวัสดุเชิงประกอบที่มีความเป็นรูพรุนเหมาะสมกับการยึดเกาะของเซลล์ โดยจะศึกษาความสามารถในการเหนี่ยวนำและการเพิ่มจำนวนของเซลล์เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 มายังโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

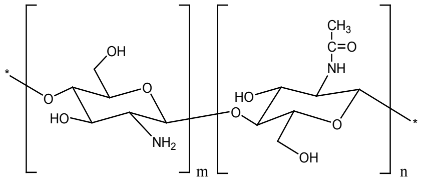
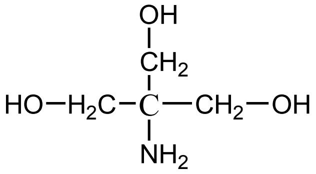
3.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ

สารเคมี	สูตรโครงสร้าง	บริษัท
ไคโตซาน 80% Deacetylation		Fluka, Japan
แคลเซียมคลอไรด์ เกรดสำหรับวิเคราะห์	$CaCl_2$	Carlo Erba Reagent, Italy
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเกรดสำหรับวิเคราะห์	Na_2HPO_4	Carlo Erba Reagent, Italy
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเกรดสำหรับวิเคราะห์	$NaH_2PO_4.H_2O$	Carlo Erba Reagent, Italy
กรดแอซีติก	CH_3COOH	Bdh Laboratory Supply, England
โซเดียมแอซีเทต เกรดสำหรับวิเคราะห์	CH_3COONa	Scharlua, Spain
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane เกรดสำหรับวิเคราะห์		Scharlua, Spain

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ (ต่อ)

สารเคมี	สูตรโครงสร้าง	บริษัท
กรดไฮโดรคลอริก	HCl	J.T. BAKER, U.S.A.
เอทานอล	CH_3CH_2OH	Bdh Laboratory Supply, England

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไลน์สร้างกระดูก

สารเคมี	บริษัท
อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma-Aldrich®, US
ฟีตัลโบวายน์ซีรัม (fetal bovine serum)	Hyclone®, US
แอล-กลูตามีน (L-glutamine)	Hyclone®, US
เพนนิซิลลิน จี (Penicillin G)	Gibco®, Invitrogen, US
แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B)	Gibco®, Invitrogen, US

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 แผ่นเยื่อเลือกผ่านที่มี MWCO 6000-8000 ของ Membrane Filtration Products,Inc., U.S.A.

3.2.2 หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แบบมีฝาเกลียว

3.2.3 ไมโครปิเปตขนาด 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร รุ่น Propette autoclavable

3.2.4 เครื่องผสมแบบความเร็วสูง (vortex mixer)

3.2.5 pH-meter รุ่น Ultrabasic

3.2.6 แม่แบบพลาสติก

3.2.7 ขวดวัดปริมาตรขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.8 เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (freeze dry)

3.2.9 เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (autoclave)

3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated centrifuge (max. speed 21,000 rpm) Sorvall รุ่น Super T21

3.2.11 ตู้อบ (oven)

3.2.12 ตู้เย็น (refrigerator)

3.2.13 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Biohazard Cabinet class II รุ่น BH2000

3.2.14 ตู้ควบคุมอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง (CO_2 incubator) Heraeus รุ่น Hera cell

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

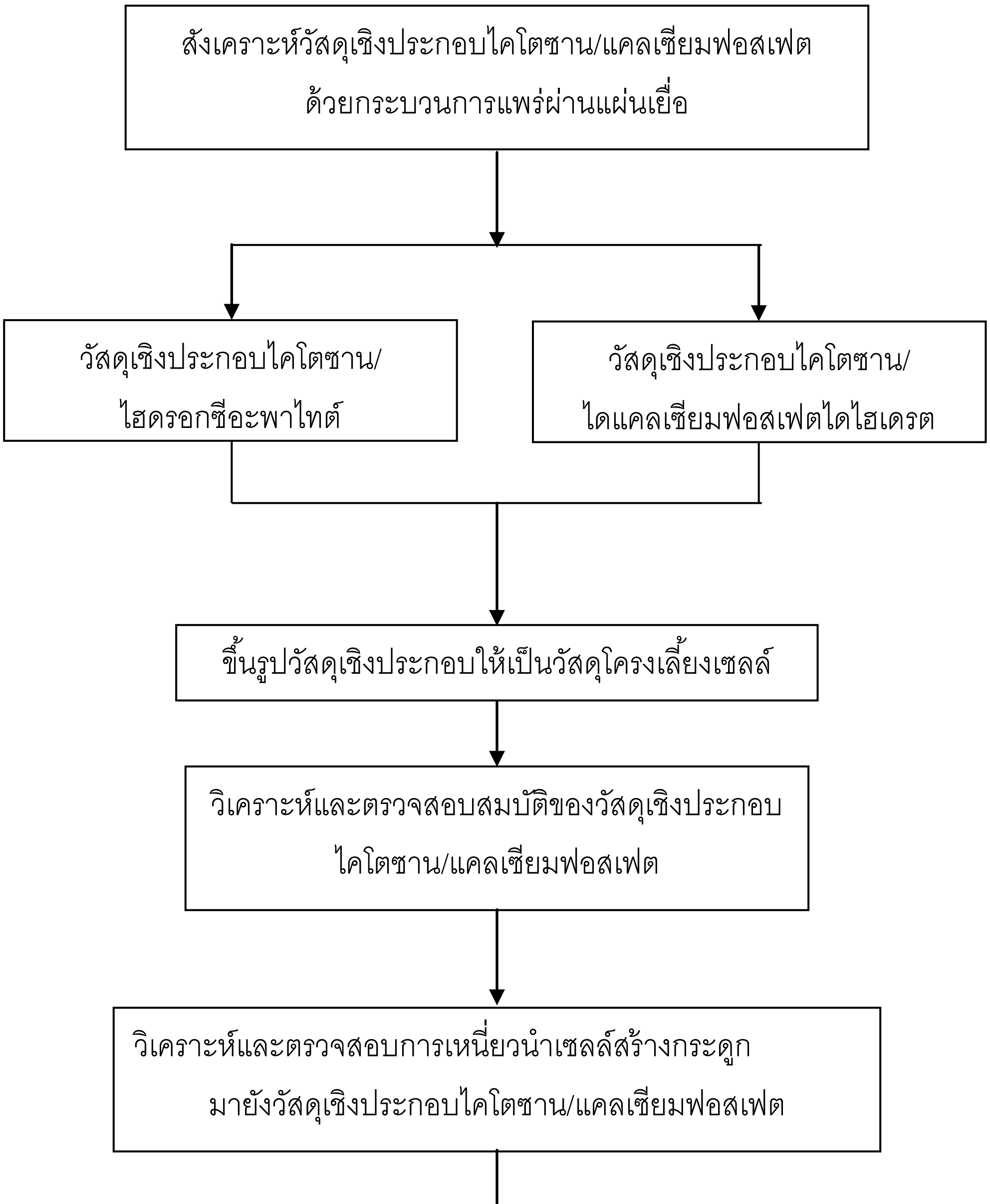
เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่อง	รุ่น	หมายเหตุ
เครื่องเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาไลเซอร์ (Thermogravimetic Analyzer, TGA)	METTLER TOLEDO (TGA/SDTA 851)	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)	JEOL JSM-5800LV	ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาฯ
เครื่องเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกโทมิเตอร์ (X-ray diffractometer, XRD)	Bruker AXS Model D8	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ
เครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิส (Dynamic mechanical analysis)	METTLER TOLEDO (DMA/SDTA 861^e)	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Phase contrast Microscopes)	Olympus รุ่น CKX41	ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก จุฬาฯ
เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)	Phamacia รุ่น Ultrospec 3000	ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก จุฬาฯ
สไลด์นับเซลล์ (Haemacytometer)	Spencer Bright - Line	ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก จุฬาฯ

3.5 ขอบเขตของการทดลอง

ขอบเขตของการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังขอบเขตการทดลอง

วิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต

→

- วิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิค TGA
- วิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างแคลเซียม/ฟอสฟอรัสของวัสดุเชิงประกอบด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุ SEM – EDS
- วิเคราะห์ความเป็นผลึกด้วยเทคนิค XRD
- วิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วย SEM
- ทดสอบความทนแรงอัดของวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่อง DMA

วิเคราะห์และตรวจสอบการเหนี่ยวนำเซลล์ไลน์สร้างกระดูกมายังวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต

→

- การทดสอบด้วยการสัมผัสโดยตรง (Direct Contact test)

ตรวจและบันทึกภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Phase contrast Microscopes)

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการทดสอบการสัมผัสโดยตรง(Direct Contact Test)

→

- เทคนิคการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

รูปที่ 3.1 แผนผังขอบเขตการทดลอง (ต่อ)

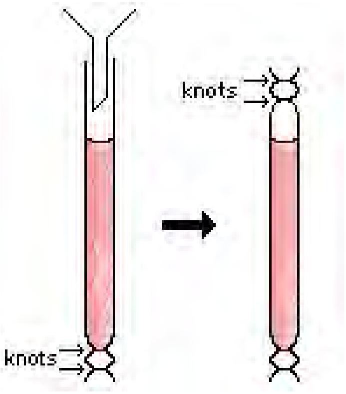
3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ

1. ละลายไคโตซานด้วย 0.1 M แอซีเทตบัฟเฟอร์ (CH_3COOH/CH_3COONa) กวนจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องปั่นผสมแบบความเร็วสูง (vortex mixer)

2. ละลายแคลเซียมคลอไรด์ด้วย 0.1 M แอซีเทตบัฟเฟอร์ (CH_3COOH/CH_3COONa) จากนั้นค่อยๆหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงในสารละลายข้อ 1) แล้วกวนจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องปั่นผสมแบบความเร็วสูง (vortex mixer)

3. เทสารละลายที่ได้จากข้อ 2) ลงในแผ่นเยื่อเลือกผ่านดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 วิธีการเทสารละลายลงในแผ่นเยื่อเลือกผ่าน

4. เตรียมสารละลายแคลเซียมฟอสเฟต 2 ชนิด ได้แก่สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(สำหรับสังเคราะห์สารไฮดรอกซีอะพาไทต์) และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (สำหรับสังเคราะห์สารไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต) ในน้ำกลั่น และเติม tris-(hydroxymethyl)-aminomethane ปริมาณ 0.05 M แล้ววัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH จากนั้นปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 N HCl และ 12 N HCl

5. จากนั้นนำแผ่นเยื่อเลือกผ่านที่มีสารละลายไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์ดังรูปที่ 3.2 แช่ลงในสารละลายในข้อ 4) ดังรูปที่ 3.3

6. เมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมง เทสารละลายที่ได้ลงในแม่แบบพลาสติกดังรูปที่ 3.4 เพื่อขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์

8. ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์โดยการนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งที่ช่วงอุณหภูมิ -44 องศาเซลเซียสถึง -53 องศาเซลเซียส ที่ระบบสุญญากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8. ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย กำจัดแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์และไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตแล้วทำให้แห้งโดยระเหยเอทานอลออกที่อุณหภูมิห้อง

9. นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์และตรวจสอบด้านสมบัติทางวัสดุและทางชีวภาพต่อไป

รูปที่ 3.3 สารละลายไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์แช่ในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตหรือสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

รูปที่ 3.4 แม่แบบพลาสติก

3.6.2 การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ก) การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

โดยการใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [29] คือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20 M และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.12 M จากนั้นควบคุมเวลาที่ทำให้เกิดการแพร่ของแคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ในสารละลายไคโตซานตามสมการที่ (1) มีขั้นตอนดังนี้

$$10CaCl_2 + 6Na_2HPO_4 + 2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 12NaCl + 8HCl$$

(1)

ตารางที่ 3.4 การคำนวนหาปริมาณสารจากสมการที่ (1)

$10CaCl_2$(mol)	$6Na_2HPO_4$(mol)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$(mol)
0.20 M	0.12 M	0.02 M
ปริมาณสารที่ใช้ 22.20 กรัม	ปริมาณสารที่ใช้ 17.04 กรัม	ปริมาณสารที่คาดว่าจะได้ 20.09 กรัม

1. เตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.20 M โดยละลายไคโตซาน 0.875 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 0.111 กรัม ด้วยสารละลาย 0.1 M แอซีเทตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร ปั่นกวนจนกระทั่งสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสมแบบความเร็วสูง

2. นำสารละลายไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์ในข้อ 1) บรรจุลงในแผ่นเยื่อเลือกผ่าน

3. เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.12 M, pH 7.4 โดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.704 กรัม ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane 0.606 กรัม ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยการหยดกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N HCl และ 6 N HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. นำแผ่นเยื่อเลือกผ่านที่มีสารละลายไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์ แช่ลงในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 20 มิลลิลิตร

5. ให้เวลาในการแพร่ผ่านของแคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเคมีเกิดสมดุล

6. จากนั้นเมื่อครบตามกำหนดเวลาแล้ว นำมาขึ้นรูปเป็นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์โดยเทสารละลายลงในแม่พิมพ์พลาสติกดังรูปที่ 3.4 แล้วนำแม่พิมพ์พลาสติกไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งที่ช่วงอุณหภูมิ -44 องศาเซลเซียสถึง -53 องศาเซลเซียส ที่ระบบสุญญากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. ล้างวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย กำจัดแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ แล้วทำให้แห้งโดยระเหยเอทานอลออกที่อุณหภูมิห้อง

8. นำวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซานและไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยเครื่องเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาไลเซอร์

ข) การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

โดยการใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต คือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20 M และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.20 M จากนั้นควบคุมเวลาที่ทำให้เกิดการแพร่ของแคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เกิดไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ในสารละลายไคโตซานตามสมการที่ (2) มีขั้นตอนดังนี้

$$CaCl_2 + NaH_2PO_4.H_2O + H_2O \rightarrow CaHPO_4.2H_2O + NaCl + HCl \quad (2)$$

ตารางที่ 3.5 การคำนวนหาปริมาณสารจากสมการที่ (2)

$CaCl_2$(mol)	$NaH_2PO_4.H_2O$ (mol)	$CaHPO_4.2HO_2$ (mol)
0.20 M	0.20 M	0.20 M
ปริมาณสารที่ใช้ 22.20 กรัม	ปริมาณสารที่ใช้ 27.60 กรัม	ปริมาณสารที่คาดว่าจะได้ 34.42 กรัม

1. เตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.20 M โดยละลายไคโตซาน 0.875 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 0.111 กรัม ด้วยสารละลาย 0.1 M แอซีเทตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร ปั่นกวนจนกระทั่งสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสมแบบความเร็วสูง

2. นำสารละลายไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์ในข้อ 1) บรรจุลงในแผ่นเยื่อเลือกผ่าน

3. เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.20 M, pH 7.4 โดยละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.760 กรัม ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane 0.606 กรัม ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยการหยดกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N HCl และ 6 N HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4 นำแผ่นเยื่อเลือกผ่านที่มีสารละลายไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์ แช่ลงในสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 20 มิลลิลิตร

5. ให้เวลาในการแพร่ผ่านของแคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเคมีเกิดสมดุล

6. จากนั้นเมื่อครบตามกำหนดเวลาแล้ว นำมาขึ้นรูปเป็นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์โดยการเทสารละลายลงในแม่พิมพ์พลาสติกดังรูปที่ 3.4 แล้วนำแม่พิมพ์พลาสติกไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งที่ช่วงอุณหภูมิ -44 องศาเซลเซียสถึง -53 องศาเซลเซียส ที่ระบบสุญญากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. ล้างวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย กำจัดแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตแล้วทำให้แห้งโดยระเหยเอทานอลออกที่อุณหภูมิห้อง

8. นำวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตด้วยเครื่องเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาไลเซอร์

3.7 การวิเคราะห์และทดสอบทางวัสดุ

3.7.1 การวิเคราะห์หาอัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์

3.7.1.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาลิซิส (Thermogravimetic Analysis, TGA)

การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA เป็นการวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต โดยอาศัยเสถียรภาพทางความร้อนที่แตกต่างกันของสารอินทรีย์ (ไคโตซาน) และสารอนินทรีย์ (แคลเซียมฟอสเฟต คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต) ด้วยเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาไลเซอร์ของ METTLER TOLEDO รุ่น TGA/SDTA 851^{e} ดังรูปที่ 3.5 โดยนำสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักประมาณ 5 มิลลิกรัม ใส่ในถาดอะลูมินา ใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 50 ถึง 700 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิที่ 700 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อัตราการเพิ่มความร้อน 20 องศาเซลเซียส/นาที ทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สออกซิเจน และมีอัตราเร็วในการไหล (gas flow rate) 20 มิลลิลิตร/นาที

รูปที่ 3.5 เทอร์มอกราวิเมทริกแอนาไลเซอร์ ของ METTLER TOLEDO รุ่น TGA/SDTA 851^{e}

3.7.2 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของแคลเซียมฟอสเฟตที่สังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ

โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต (ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต) ที่เตรียมได้จากกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ โดยควบคุมเวลาในการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อให้คงที่ตามเวลาที่ 72 ชั่วโมง จากนั้นขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติโดยโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5.2 (ก) และวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตจากการทดลองข้อ 3.5.2 (ข) ถูกเลือกมาเป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์คุณลักษณะของแคลเซียมฟอสเฟต ดังต่อไปนี้

3.7.2.1 **การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัสของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด** (Scanning Electron Microscope, SEM) **พร้อมเครื่องวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์** (Energy X-ray Dispersive Spectroscope, EDS)

การวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectrometer) ทำโดยนำโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ที่ต้องการวิเคราะห์ไปวางบนเทปกาวคาร์บอนที่แปะอยู่บนฐานวางตัวอย่าง เนื่องจากโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบมีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่มากทำให้อิเลคตรอนสามารถวิ่งผ่านได้โดยไม่จำเป็นต้องเคลือบด้วยผงคาร์บอน ซึ่งการทำงานของเครื่องจะทำภายใต้สุญญากาศจากนั้นจึงตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV ดังรูปที่ 3.6

โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า โดยตั้งระยะห่างระหว่างลำแสงอิเลคตรอนและตัวอย่างให้คงที่ ที่ 15 ไมโครเมตร

รูปที่ 3.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JEOL JSM-5800LV

3.7.2.2 **การวิเคราะห์ความเป็นผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน** (X-ray diffraction, XRD)

วิเคราะห์โครงสร้างของแคลเซียมฟอสเฟต ในโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์และไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตโดยเทคนิคเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน (XRD) ด้วยเครื่อง Bruker AXS Model D8 ดังแสดงในรูปที่ 3.7

ภาวะที่ใช้ในการทดลอง

หลอดรังสีเอ็กซ์ : Cu

แหล่งกำเนิดรังสีเอ็กซ์ : $CuK_{\alpha}(\lambda=1.54060)$

โดยเครื่องเริ่มทำงานที่มุม 2θ ตั้งแต่ 10-55 องศา ด้วยอัตราเร็ว 0.02 องศา/วินาที

รูปที่ 3.7 เครื่องเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกโทมิเตอร์ ของ Bruker AXS Model D8

3.7.2.3 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต (ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JEOL JSM-5800LV ดังแสดงในรูปที่ 3.6 เป็นการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของวัสดุเชิงประกอบ โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์เคลือบผิวด้วยทองคำ ใช้ 15 แอมแปร์ เป็นเวลา 3 นาที ก่อนตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ที่กำลังขยาย 200 และ 1000 เท่า

3.7.2.4 การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิสรุ่น DMA/SDTA861^e ของ METTLERTOLEDO

การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยเครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิสรุ่น DMA/SDTA861^e ของ METTLERTOLEDO ดังรูปที่ 3.8 โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ที่ต้องการวิเคราะห์มาตัดให้มีรูปทรงขนาดของ ความกว้าง x ความยาว x ความสูง เท่ากับ 5 X 5 X 3 มิลลิเมตร โดยทดสอบใน 3 สภาวะคือ ไม่ผ่านการแช่สารใดๆ(กล่าวอีกนัยหนึ่งคือโครงเลี้ยงเซลล์แห้ง) ผ่านการแช่สารฆ่าเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอลและผ่านการแช่สารอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 1 วันก่อนการทดสอบ เพื่อเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงของค่ามอดุลัสการอัด (compressive modulus) ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะที่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาทดสอบการอัดภายใต้ระยะเริ่มต้นแอมพลิจูดการอัด 1 ไมโครเมตร (start amplitude displacement)และแอมพลิจูดการอัดสูงสุด 1778.28 ไมโครเมตร (maximum amplitude displacement) ค่าคงตัวของการอัด 40x10^6 นิวตันต่อเมตร (Spring Constant of Clamping Assembly) ที่ความถี่ 1 เฮิรตซ์ ภายใต้ภาวะบรรยากาศอุณหภูมิห้อง เครื่องจะรายงานผลการทดลองเป็นแรงกดอัดต่อระยะชิ้นงานที่เกิดการยุบตัวลง แล้วนำมาคำนวนหาค่ามอดุลัสการอัดของชิ้นงาน

รูปที่ 3.8 เครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิส รุ่น DMA/SDTA861^e ของ METTLER TOLEDO

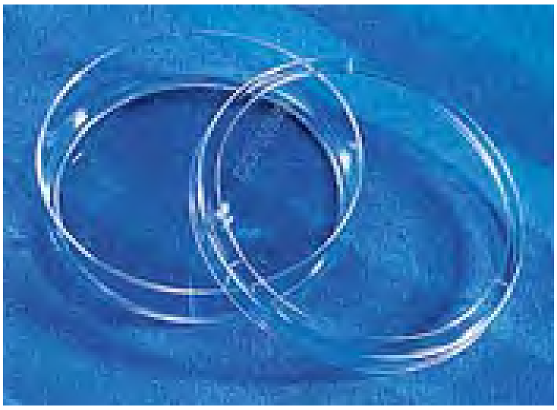
3.8 การวิเคราะห์และทดสอบทางชีวภาพ

3.8.1 การเลี้ยงเซลล์

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 เป็นตัวแทนของเซลล์ที่สร้างกระดูก มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่เพื่อสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue formation) เซลล์ดังกล่าวได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ. ทพ. ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich®, US) ซึ่งประกอบด้วยฟีตัลโบวายน์ซีรัม (foetal bovine serum, Hyclone®, US) ความเข้มข้นร้อยละ 10 แอล-กลูตามีน (L-glutamine, Hyclone®, US) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลลิน จี (Penicillin G) ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) (Gibco®, Invitrogen, US) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เลี้ยงเนื้อเยื่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

3.8.2 การขยายปริมาณเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1ในจานเลี้ยงเซลล์

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 เมื่อได้เซลล์มาแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการขยายปริมาณเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 90 มิลลิเมตร) ดังรูป 3.9



รูปที่ 3.9 จานเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 สังเกตถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Phase contrast Microscopes, Olympus รุ่น CH - 2) ที่กำลังขยาย 400 เท่า (เลนส์วัตถุ 10 เท่า X เลนส์ตา 10 เท่า X เลนส์กล้องถ่ายรูป 4 เท่า)

3.8.3 การทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ (Cell biocompatibility test)

3.8.3.1 การทดสอบด้วยการสัมผัสโดยตรง (Direct Contact test)

วิธีดังกล่าวเป็นวิธีมาตรฐานตาม ISO 10993-5 [45] กล่าวโดยย่อ ชิ้นงานกลุ่มทดสอบที่มีสัดส่วนของแคลเซียมและฟอสเฟตแบบต่างๆ ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต และกลุ่มควบคุม คือโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน วิธีนำเซลล์มาทดสอบกับวัสดุเริ่มจากการตัดวัสดุที่ต้องการทดสอบให้มีลักษณะเป็นทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร หนา 0.5 มิลลิเมตร ให้เท่ากันทุกชิ้นงาน ดังรูป 3.10 จากนั้นนำชิ้นงานกลุ่มทดสอบไปฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที โดยกลับด้านชิ้นงานทดสอบทุกๆ 15 นาที

รูปที่ 3.10 ลักษณะชิ้นงานที่ตัดออกมา

เพื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ใส่วัสดุลงในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม กดชิ้นงานด้วนลวดดัดฟันรูปตัวยู หลังจากนั้นหว่านเซลล์ในปริมาณ 6 X 10^4 เซลล์/หลุม บ่มไว้เป็นเวลานานที่ 3 7 21 และ 29 วัน จะตรวจและบันทึกภาพลักษณะรูปร่างของเซลล์ รวมถึงการสัมผัสกันระหว่างเซลล์และวัสดุทุกวันที่ครบกำหนดของการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Phase contrast Microscopes, Olympus รุ่น BX50) ดังรูป 3.11

รูปที่ 3.11 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

(Phase contrast Microscopes, Olympus รุ่น CKX41)

วิธีการทดสอบด้วยการสัมผัสโดยตรงมีข้อดี คือ สามารถตรวจลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่สัมผัสกับวัสดุและชิ้นงาน

3.8.3.2 การสร้างเส้นกราฟมาตรฐานเพื่อมาใช้ในการเทียบหาจำนวนเซลล์ที่เพิ่มเชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay

การหาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ไลน์ของกระดูก MC3T3 - E1 กับ ค่าวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาซาน (ค่า OD) โดยการใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร เซลล์จะถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่นแตกต่างกัน ดังรูปที่ 3.16 เซลล์จะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์สารเอ็มทีที โดยอาศัยหลักการในการตรวจวัดระดับเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ที่พบในไมโทคอนเดรีย (mitochondria dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของเซลล์ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเป็นเกลือเททระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสารเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งมีสีม่วง เมื่อนำไปละลายสารละลายที่เหมาะสม จะสามารถนำไปสร้างกราฟมาตราฐานจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวน

รูปที่ 3.12 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

(UV-VIS Spectrophotometer, Phamacia รุ่น Ultrospec 3000)

วิธีการนำเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 จากจานเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 90 มิลลิเมตร) 2 จานมาใส่หลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 45 มิลลิลิตร ดังนี้

<u>ขั้นตอนการหว่าน</u>

ขั้นที่ 1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS Buffer) 2 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจานเลี้ยงเซลล์

ขั้นที่ 2 ใส่สารละลายทริปซิน 1 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจานเลี้ยงเซลล์จับเวลา 45 วินาที แล้วดูดออก

ขั้นที่ 3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 1 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจานเลี้ยงเซลล์ ล้างเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ออกมา ใส่หลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 45 มิลลิลิตร เพื่อเก็บไว้เจือจางความเข้มข้นต่อไป

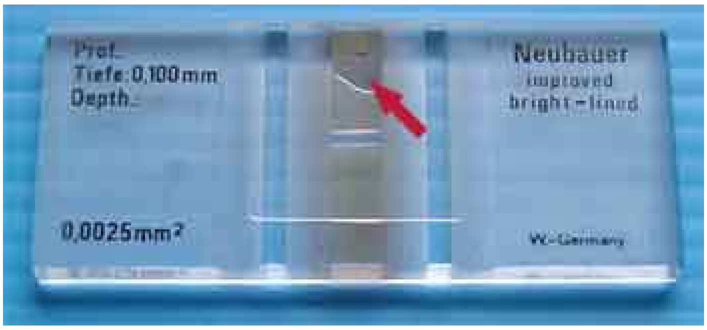
ขั้นที่ 4 ดูดเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาฉีดลงบนกระจกสไลด์นับเซลล์ (Haemacytometer)

<u>ขั้นตอนการใช้งาน Haemacytometer</u>

ขั้นที่ 1 วาง cover glass บนสไลด์นับเซลล์ Haemacytometer ซึ่งแผ่น cover glass จะอยู่เหนือผิวตาราง 0.1 มิลลิเมตร

ขั้นที่ 2 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 จากหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 45 มิลลิลิตรมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร

ขั้นที่ 3 วางปลายปิเปตใกล้ขอบ cover glass จากนั้นค่อยๆหยดสารละลายตัวอย่างเซลล์ลงไป ซึ่งสารละลายจะไหลเข้าใต้ cover glass เองจนเต็มพื้นที่ตาราง ดังรูป 3.13



รูปที่ 3.13 การหยดสารละลายตัวอย่างเซลล์ลงใน Haemacytometer

<u>การนับจำนวนเซลล์</u>

เมื่อสารละลายตัวอย่างเซลล์เข้าใต้ cover glass จนเต็มพื้นที่ตาราง จะสามารถคำนวณปริมาตรสารละลายเซลล์ได้จาก พื้นที่ตาราง x ความลึก จำนวนเซลล์ในตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะได้เป็นจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรสารละลายของตารางนั้น จากนั้นคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรสารละลาย 1 มิลลิลิตร ตัวอย่างเช่น จากรูป 3.14 แสดงตารางของ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขยาย 40 เท่า ช่อง A B C และ D มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรของสารละลายเซลล์ของช่อง A B C หรือ D ช่องใดช่องหนึ่งเท่ากับ ความกว้าง x ความยาว x ความลึก

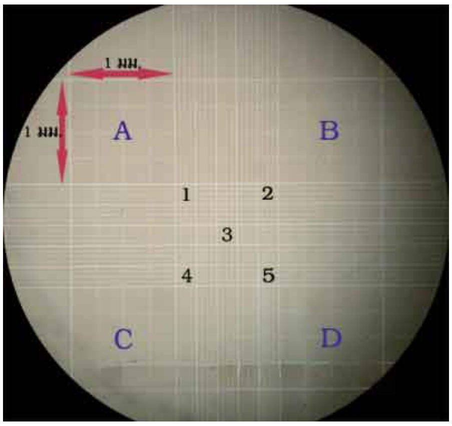
เท่ากับ 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร

เท่ากับ 0.1 เซนติเมตร x 0.1 เซนติเมตร x 0.01 เซนติเมตร

เท่ากับ 0.0001 ลูกบาตรเซนติเมตร

ซึ่งเท่ากับ 10^{-4} มิลลิลิตร

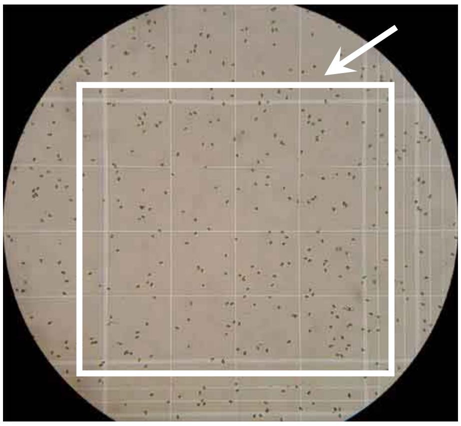
ดังนั้นในการนับเซลล์ที่ช่อง A B C และ D ความหนาแน่นของเซลล์จะเท่ากับ ค่าเฉลี่ยของเซลล์ในช่อง A B C D x 10^{4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร



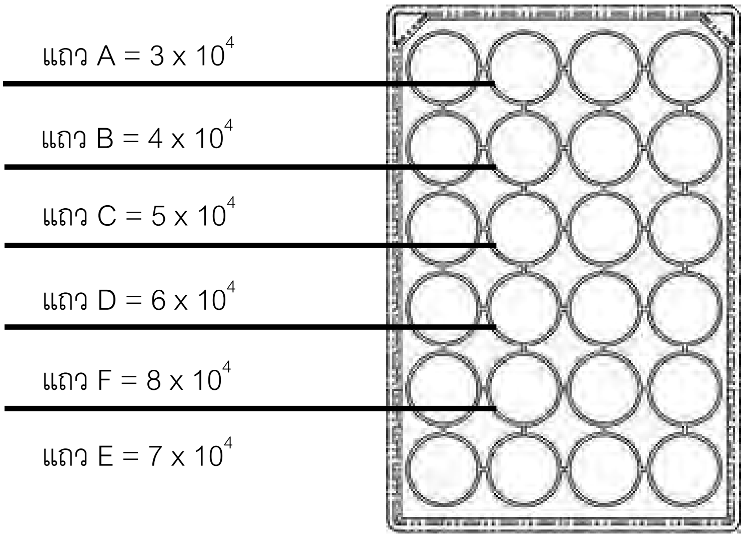
รูปที่ 3.14 ตารางของ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

<u>ตัวอย่างการนับเซลล์บน Haemacytometer</u>

จากรูปที่ 3.15 คือตารางบนผิว Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ตำแหน่งช่อง A ที่หยดสารละลายเซลล์เข้าไปแล้ว จำนวนเซลล์ในช่อง A นับได้ประมาณ 167 เซลล์ ดังนั้นความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 167 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.15 ตารางบนผิว Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 3.16 จำนวนเซลล์ที่หว่านในแต่ละแถวเพื่อทำเส้นกราฟมาตรฐาน

<u>ขั้นตอนการหว่านเซลล์</u>

โดยคำนวณเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 ลงในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ต้องเผื่อ 1 หลุมเสมอคือต้องคูณด้วย 5 หลุม ตัวอย่างเช่น แถว A ปริมาณเซลล์ที่ต้องการแต่ละหลุมเท่ากับ 3 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์ที่ต้องดูดขึ้นมาเท่ากับ 3 x 10^4 x 5 เท่ากับ 15 x 10^4เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นต้น จากนั้นหว่านเซลล์ในความเข้มข้นที่คำนวณตามจำนวนเซลล์ที่ต้องการในแต่ละหลุม ดังรูปที่ 3.16 แล้วนำเซลล์เข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ดังรูปที่ 3.17 ที่ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 นาน 24 ชั่วโมงแล้ววัดจำนวนเซลล์เชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay ตามข้อ 3.7.3.2

รูปที่ 3.17 ตู้ควบคุมอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง (CO_2 incubator) Heraeus รุ่น Hera cell

3.8.3.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการทดสอบการสัมผัสโดยตรง (Direct Contact Test) **ด้วยวิธีการ** MTT assay

การวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์เชิงปริมาณได้ในการศึกษานี้อาศัยเทคนิคการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT ([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]) ซึ่งดัดแปลงจาก Freshney และคณะ[46] กล่าวโดยย่อคือ หลังจากทดสอบวัสดุกับเซลล์ครบที่ 3 และ 7 วัน หยิบชิ้นงานออกอย่างระมัดระวังภายในตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อดังรูปที่ 3.18 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ชนิดที่ไม่มีฟีนอล เรด (phenol red) นำเซลล์เข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 นาน 12 นาที ซึ่งจะทำให้เห็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan) สีม่วงที่ก้นหลุม หลังจากนั้นทำละลายผลึกฟอร์มาซานด้วยการเติม DMSO (dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ทำให้เกิดเป็นสารละลายสีม่วง ความเข้มของสีจะบ่งบอกถึงเมตาบอลิสมของเซลล์ ซึ่งเมตาบอลิสมมีความสัมพันธ์กับการหายใจหรือการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ต่อมานำสารละลายดังกล่าว ไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร รายงานผลเป็นร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ทดลองทั้งหมด 7 ครั้ง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

รูปที่ 3.18 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Biohazard Cabinet class II รุ่น BH2000

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์และทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์และโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต มีหลายขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย ดังแสดงในแผนผังรูปที่ 4.1 โดยมีการรายงานทดลองโดยลำดับดังต่อไปนี้

4.1 ลักษณะรูปร่างโครงเลี้ยงเซลล์

4.2 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ของโครงเลี้ยงเซลล์

4.2.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาลิซิส (TGA)

4.3 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของโครงเลี้ยงเซลล์

4.3.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสเฟตของวัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) พร้อมเครื่องวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy X-ray Dispersive Spectroscope, EDS)

4.3.2 การวิเคราะห์ความเป็นผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction, XRD)

4.3.4 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของวัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

4.3.5 การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิสรุ่น DMA/SDTA861^{e} ของ METTLERTOLEDO

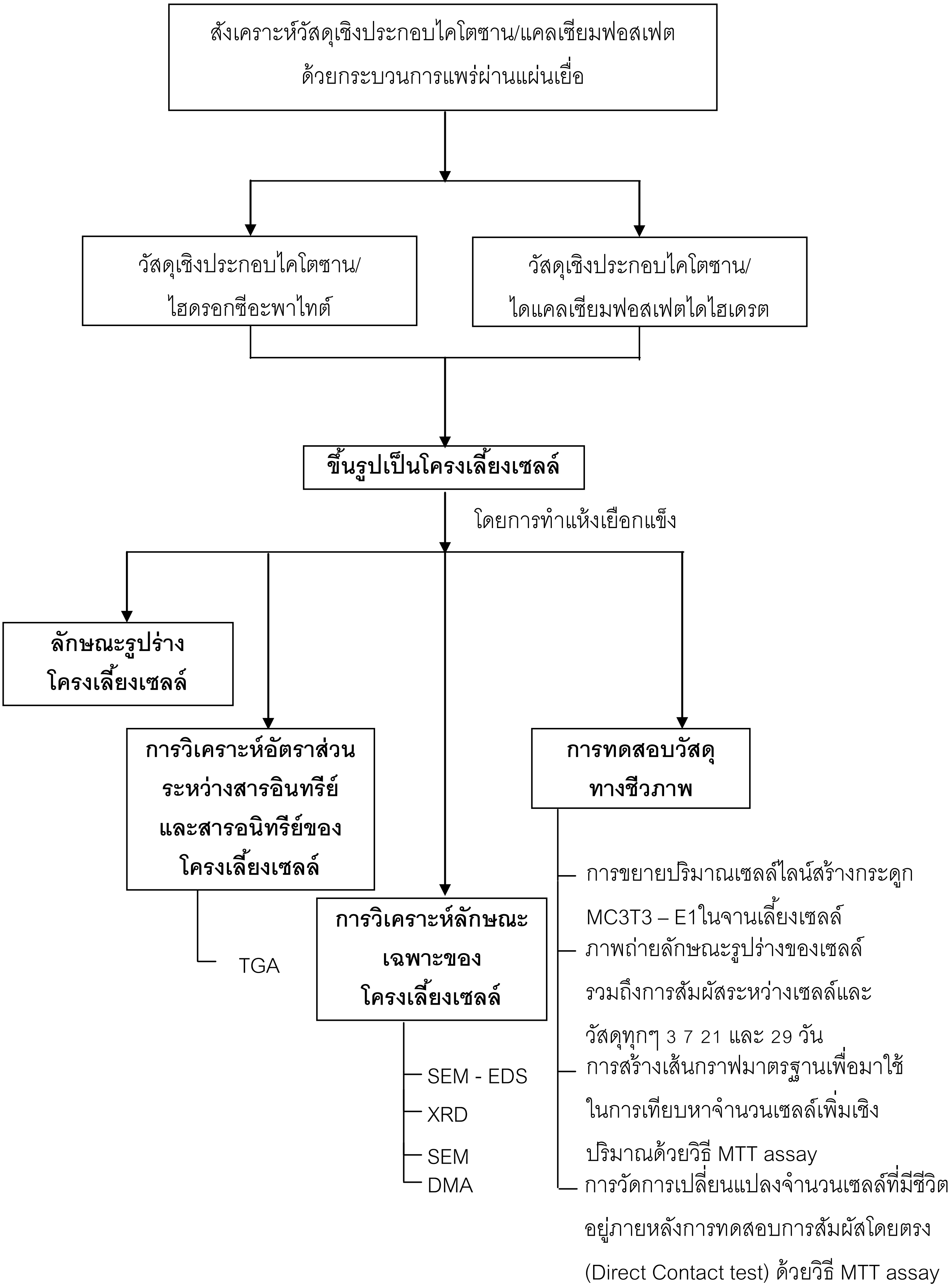
4.4 การทดสอบวัสดุทางชีวภาพ

4.4.1 การขยายปริมาณเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1ในจานเลี้ยงเซลล์

4.4.2 การทดสอบด้วยการสัมผัสโดยตรง (Direct Contact test)

4.4.3 การสร้างเส้นกราฟมาตรฐานเพื่อมาใช้ในการเทียบหาจำนวนเซลล์เพิ่มเชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay

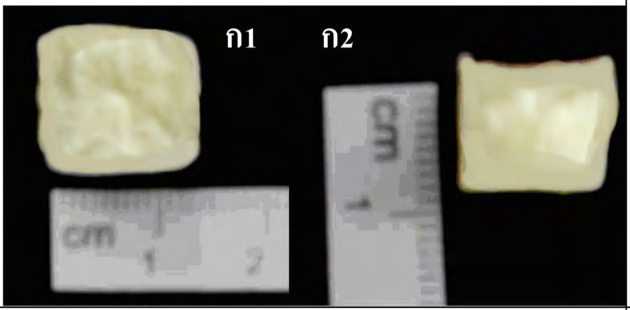
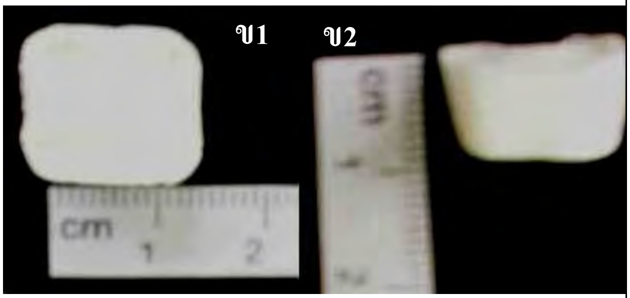
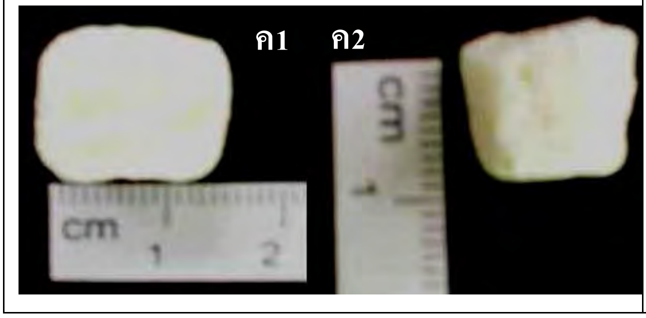
4.4.4 การวัดการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการทดสอบการสัมผัสโดยตรง (Direct Contact test) ด้วยวิธี MTT assay



รูปที่ 4.1 แผนผังการทดสอบสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

4.1 ลักษณะรูปร่างโครงเลี้ยงเซลล์

จากการเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์และวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ที่เตรียมได้ด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ[29] หลังจากสิ้นสุดกระบวนการเทสารละลายเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตทั้งสองชนิดในแม่แบบพลาสติกขนาด ความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ยาว 1.5 เซนติเมตร ให้มีความหนาที่ 0.8 – 0.9 เซนติเมตร (ควบคุมความหนาโดยชั่งสารให้มีปริมาณ 2 กรัม เท่าๆกัน)แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ที่ระบบสุญญากาศ ทำให้ได้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ดังรูปที่ 4.2 ก ข และ ค เพื่อวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ วิเคราะห์ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ และทดสอบความเป็นไปได้ในการเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 กับวัสดุ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกที่มีรูปทรงแบบง่ายหรือรูปแบบที่ซับซ้อนตามแม่แบบที่ทำการขึ้นรูปได้ต่อไป

	**รูปที่** 4.2 ก) โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน ก1) ด้านบน ก2) ด้านข้าง
	**รูปที่** 4.2 ข) โครงเลี้ยงเซลล์ ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ข1) ด้านบน ข2) ด้านข้าง
	**รูปที่** 4.2 ค) โครงเลี้ยงเซลล์ไคโต ซาน/ ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮ เดรต ค1) ด้านบน ค2) ด้านข้าง

รูปที่ 4.2 ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์

4.2 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ของโครงเลี้ยงเซลล์

4.2.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเทอร์มอกราวิเมทริกแอนาลิซิส (TGA)

จากการวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเทอร์มอกรา-วิเมทริกแอนาลิซิส (TGA) โดยการหาร้อยละของแคลเซียมฟอสเฟตที่สังเคราะห์ได้ในโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว เพื่อตรวจสอบการกระจายตัวของแคลเซียมฟอสเฟตที่แทรกตัวอยู่ในเนื้อของไคโตซานเมทริกซ์ พบว่าร้อยละของแคลเซียมฟอสเฟตในวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์และวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตในบริเวณที่แตกต่างกัน 3 บริเวณ ของแต่ละตัวอย่าง มีค่าร้อยละของแคลเซียมฟอสเฟต (ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต) ที่ประกอบอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ใกล้เคียงกัน ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานดังตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าค่าเบียงเบนมาตรฐานมีค่าต่ำทำให้เชื่อได้ว่าวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์และวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่สังเคราะห์ได้มีแคลเซียมฟอสเฟตที่กระจายตัวหรือแทรกอยู่ภายในเนื้อของไคโตซานค่อนข้างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังพบว่า ในโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบมีสัดส่วนของแคลเซียมฟอสเฟตประมาณ 35-45% โดยโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีสัดส่วนของสารประกอบอนินทรีย์มากกว่าในโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของแคลเซียมฟอสเฟตในบริเวณที่แตกต่างกัน ที่เวลา 72 ชั่วโมง

สารที่ทดสอบ	สัดส่วนแคลเซียมฟอสเฟต (ร้อยละ)				ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์	42.34	37.99	47.18	42.50	4.60
โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต	39.51	29.66	34.17	34.45	4.93

4.3 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของโครงเลี้ยงเซลล์

4.3.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสเฟตของวัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) พร้อมเครื่องวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy X-ray Dispersive Spectroscope, EDS)

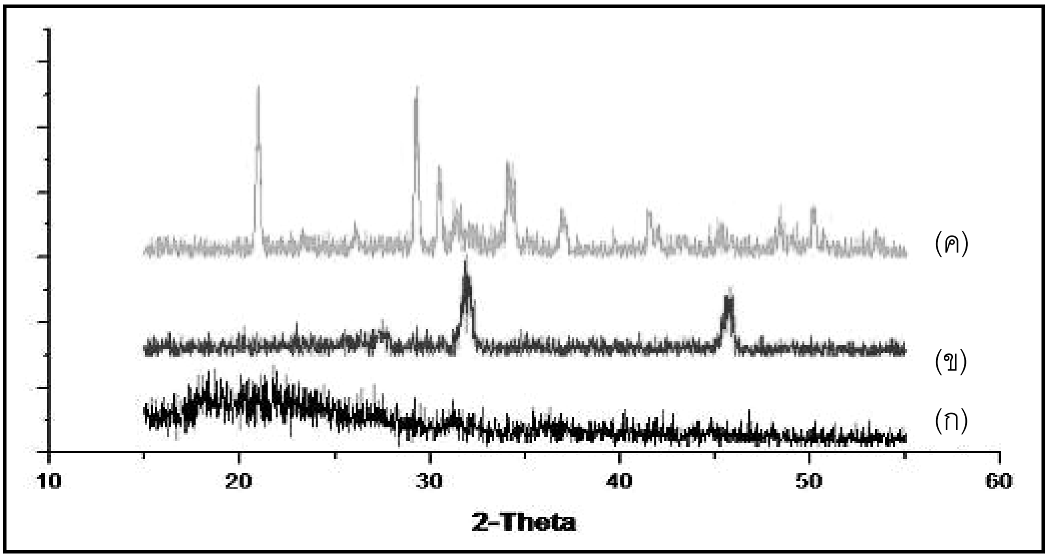
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของวัสดุเชิงประกอบที่เตรียมด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ ที่บริเวณผิวหน้าและบริเวณพื้นที่ตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต โดยจะนำเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณเพื่อหาอัตราส่วนและเทียบค่าตามทฤษฎี พบว่าอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของไฮดรอกซีอะพาไทต์และไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่ได้จากการสังเคราะห์ มาวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุ แสดงค่าเป็นไปตามทฤษฎีดังแสดงใน ตารางที่ 4.2 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแคลเซียมฟอสเฟตชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต สามารถสังเคราะห์ให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอภายในเนื้อไคโตซานได้ด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ

ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	เปอร์เซ็นต์องค์ประกอบธาตุ		อัตราส่วน Ca/P	ค่าตามทฤษฎี Ca/P
	Ca	P		
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณผิวหน้า)	1.41	0.89	1.58	1.67 [28]
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)	15.36	9.34	1.64	
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณผิวหน้า)	3.66	4.05	0.90	1.00 [28]
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)	1.35	1.44	0.93	

4.3.2 **การวิเคราะห์ความเป็นผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิคเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน** (X-ray diffraction, XRD)

รูปที่ 4.3 แสดงกราฟรูปแบบโครงสร้างผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตในโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต โดยรูปที่ 4.3ก เป็นรูปแบบการกระจายตัวของพีคที่ทดสอบบนวัสดุเชิงประกอบไคโตซานซึ่งพบตำแหน่ง 2θ=20° รูปที่ 4.3ข เป็นรูปแบบการกระจายตัวของพีคที่ทดสอบบนวัสดุเชิงประกอบโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์พบตำแหน่ง 2θ=26° และ 32° และรูปที่ 4.3ค วัสดุเชิงประกอบ ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตซึ่งพบตำแหน่ง 2θ = 20.94 29.25 30.50 34.15 และ 34.42 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากการวิเคราะห์ พบว่า วัสดุทั้ง 3 ชนิดแสดงค่าตำแหน่ง 2θ ตรงตามทฤษฎีของ 2θ ของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [47] และไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต [48] เมื่อพิจารณากราฟรูปแบบโครงสร้างผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตในโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตทั้ง 2 ชนิด พบว่า พีคกว้างที่แสดงถึงลักษณะเฉพาะของผลึกไคโตซาน (2θ=20°) นั้นหายไปจากวัสดุเชิงประกอบ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยากันระหว่างไคโตซาน/สารแคลเซียมฟอสเฟตในวัสดุเชิงประกอบและทำให้เกิดการกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวอย่างสมบูรณ์ ดังรูปที่ 4.3ข และ 4.3ค

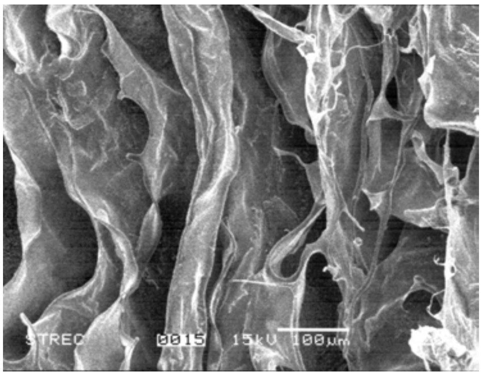


รูปที่ 4.3 เอกซ์เรย์ดิฟแฟรกโทแกรมโครงสร้างผลึกในโครงเลี้ยงเซลล์
ก) ไคโตซาน ข) วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์
ค) วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

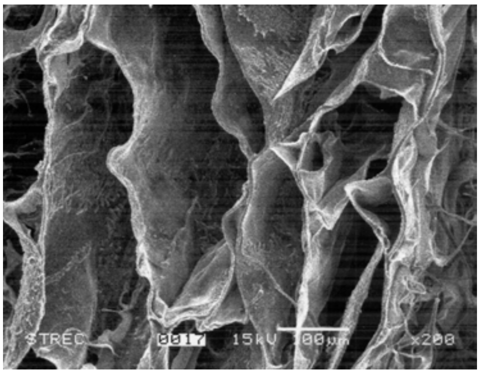
4.3.3 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของวัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

จากการตรวจสอบสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ที่ผ่านการขึ้นรูปให้มีรูพรุนด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ดังรูปที่ 4.4 จากรูป ก และ ข แสดงถึงสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานที่บริเวณผิวหน้าและบริเวณพื้นที่ตัดขวาง ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะเหมือนผืนผ้าที่พับซ้อนกันไปมา โดยไม่ปรากฏลักษณะโครงสร้างของรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน ในทางตรงกันข้ามวัสดุเชิงประกอบที่มีองค์ประกอบของแคลเซียมฟอสเฟตจะแสดงให้เห็นลักษณะโครงสร้างของรูพรุนเป็นสามมิติที่มีการเชื่อมต่อของรูพรุนภายในโครงสร้าง ทั้งในส่วนของบริเวณผิวหน้าและบริเวณพื้นที่ตัดขวาง ซึ่งการเชื่อมต่อของรูพรุนนี้มีความสำคัญต่อโครงเลี้ยงเซลล์ในด้านการสนับสนุนการเคลื่อนที่ของเซลล์ รวมถึงการแพร่ผ่านของอาหารและน้ำ ดังรูปที่ 4.4 ค ง จและ ฉ

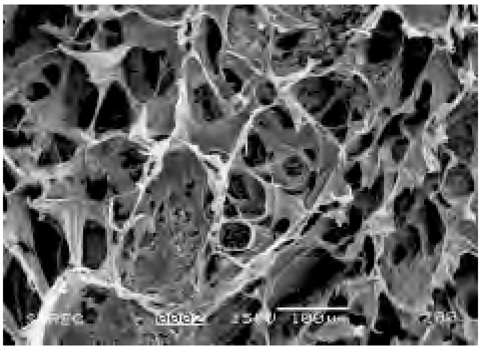
โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตมีขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วงระหว่าง 50 ไมโครเมตร ถึง 400 ไมโครเมตร โดยในโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 200 ไมโครเมตร ถึง 400 ไมโครเมตร และโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 50 ไมโครเมตร ถึง 100 ไมโครเมตร



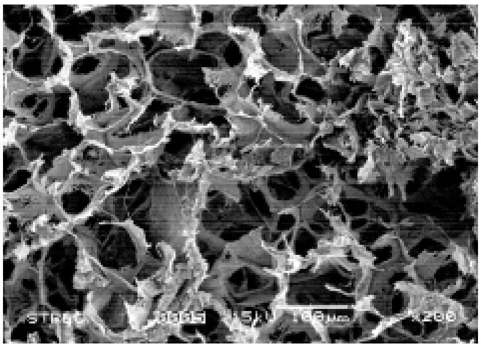
(ก)



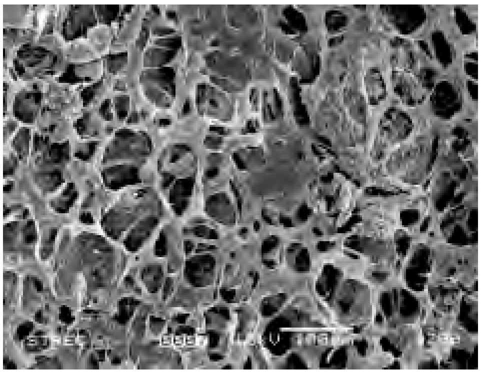
(ข)



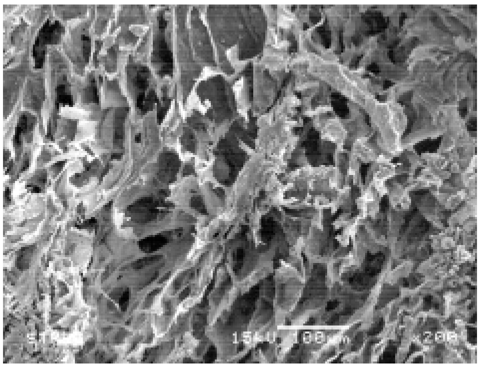
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

รูปที่ 4.4 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า

(ก) โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน (บริเวณผิวหน้า) (ข) โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)

(ค) โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณผิวหน้า)

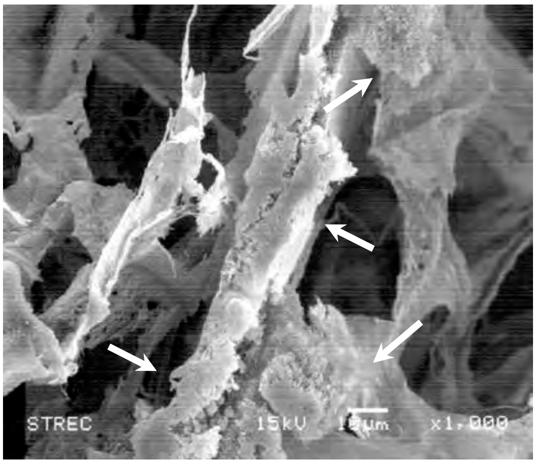
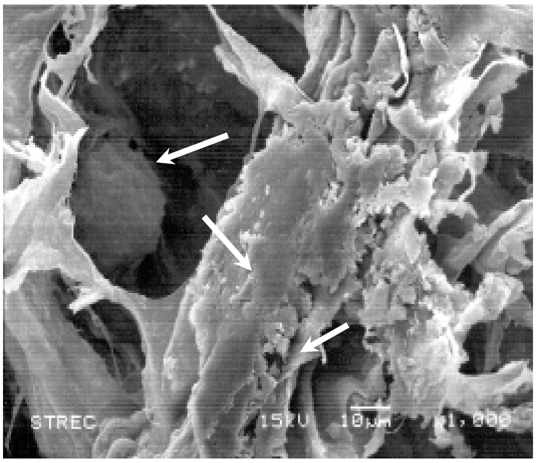
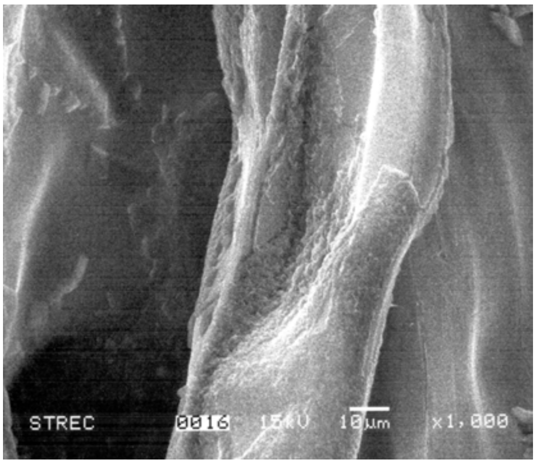
(ง) โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)

(จ) โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณผิวหน้า)

(ฉ) โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)

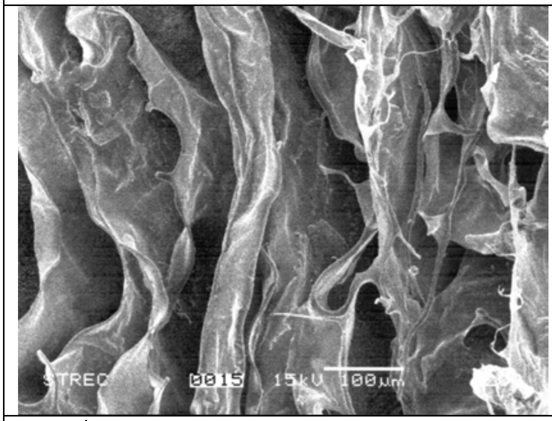
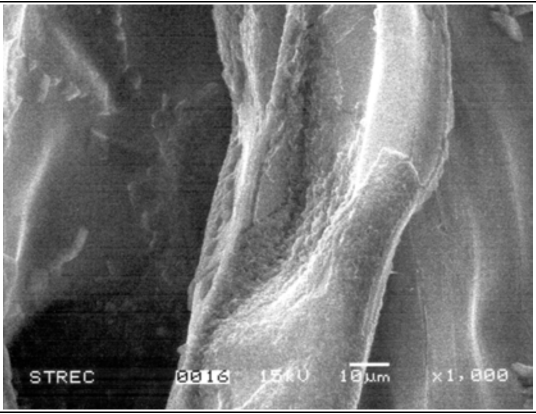
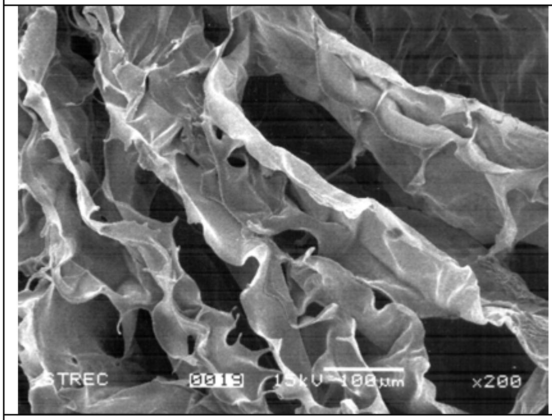
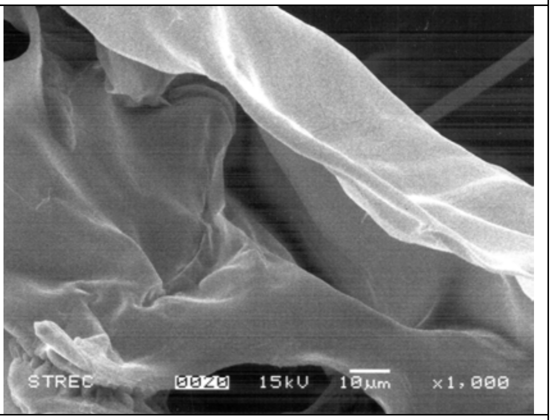
นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อตัดตามแนวขวางของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อดูลักษณะของพื้นที่ภาคตัดขวาง พบว่าในส่วนพื้นที่ตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบที่มีองค์ประกอบของแคลเซียมฟอสเฟตจะมีการกระจายตัวของผลึกแคลเซียมฟอสเฟตอยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ จึงทำให้เชื่อได้ว่า กระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อสามารถชะลอการแพร่ผ่านของไอออนจนทำให้เกิดการรวมผลึกของแคลเซียมที่กระจายตัวทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ดังรูปที่ 4.5 (ก) และ (ข) โดยลูกศรสีขาวแสดงตำแหน่งของผลึกแคลเซียมฟอสเฟตที่กระจายตัวภายในพื้นที่ตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ แต่จะไม่พบเห็นการกระจายตัวของผลึกในลักษณะนี้กับโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน ดังรูปที่ 4.5(ค)

จากการเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสามชนิด พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 200 ไมโครเมตร ถึง 400 ไมโครเมตร เป็นขนาดรูพรุนที่เหมาะสมแก่การยึดเกาะของออสทีโอบลาสเซลล์และทำให้เซลล์สามารถส่งผ่านอาหารได้ดี [49]

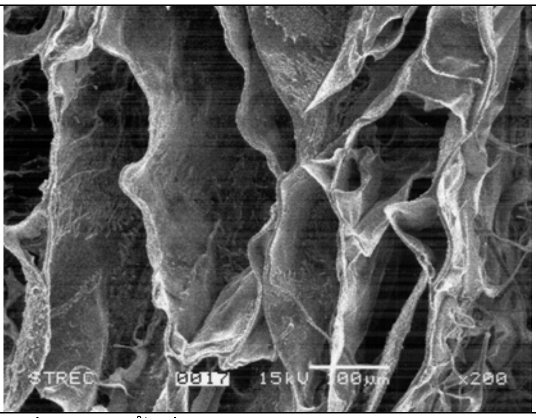
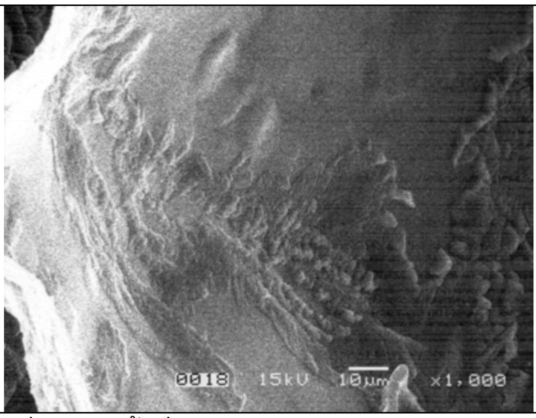
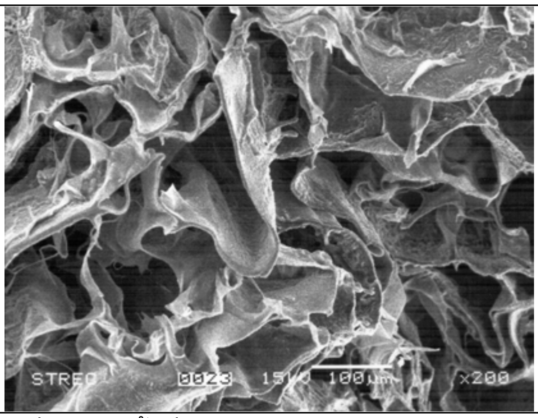
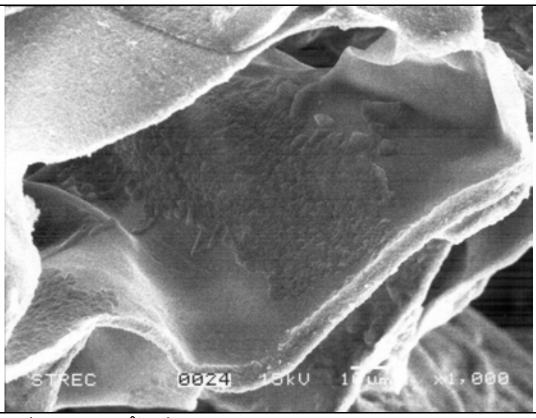
	(ก)โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์
	(ข) โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต
	(ค) โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน

รูปที่ 4.5 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
ที่กำลังขยาย 1000 เท่า บริเวณพื้นที่ตัดขวาง

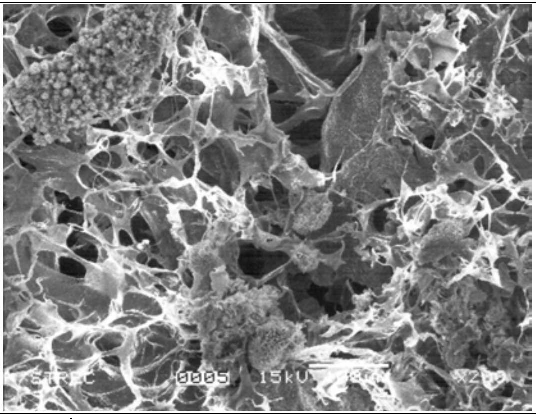
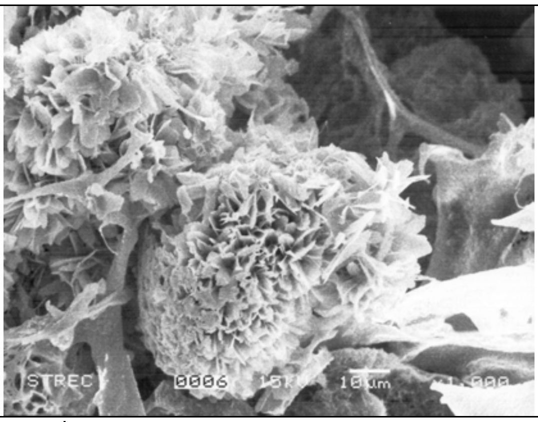
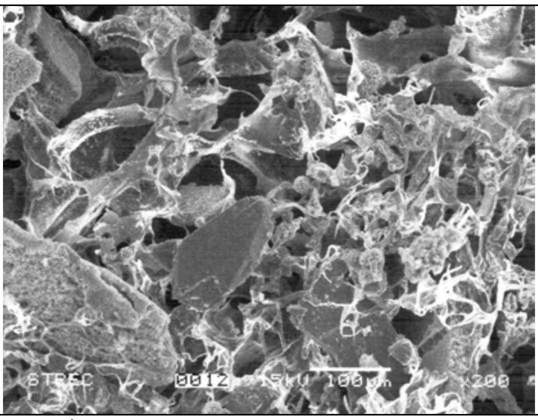
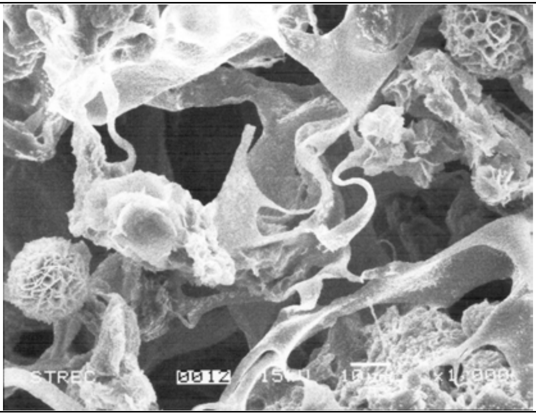
นอกจากนี้ยังทดสอบสัณฐานวิทยาของวัสดุเชิงประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลตในการฆ่าเชื้อ ระดับความเข้มแสงอัลตราไวโอเลตที่ช่วงคลื่น 253.7 นาโนเมตร ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลชีพต่างๆ และทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอของเชื้อจุลชีพ 100% ตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของวัสดุ ซึ่งพบว่า อัลตราไวโอเลต ไม่ก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในของวัสดุ ดังรูปที่ 4.6 - 4.11

<table>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานก่อนการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
</table>

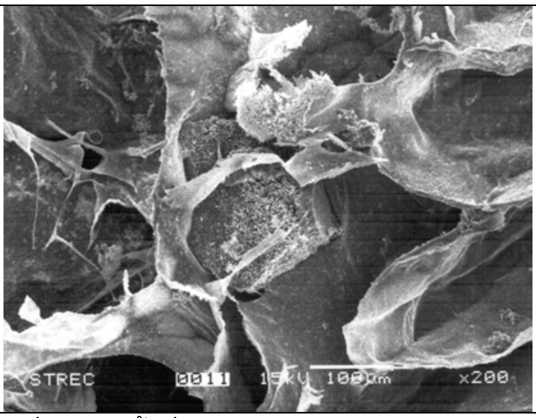
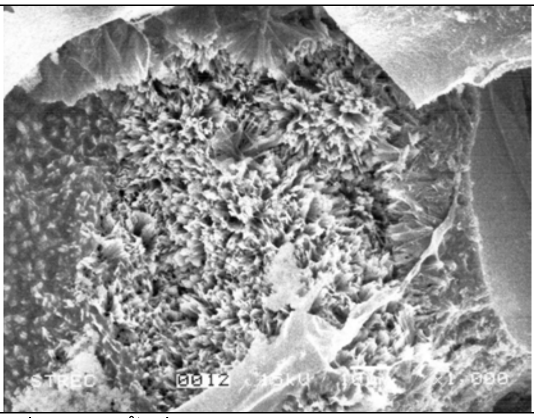
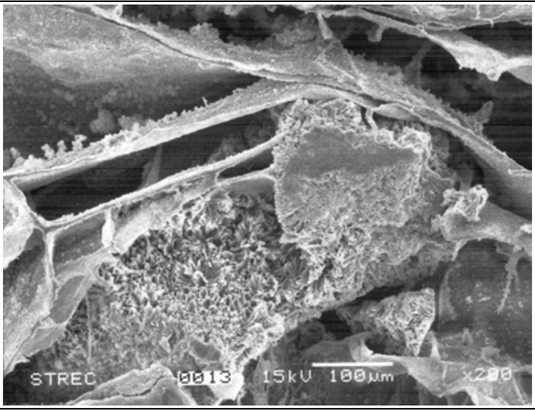
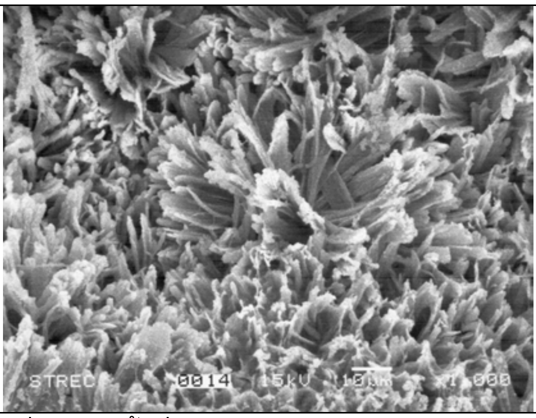
รูปที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานที่บริเวณผิวหน้า ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต

<table>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานก่อนการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
</table>

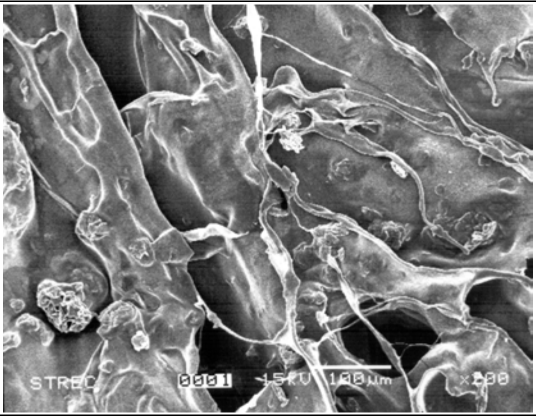
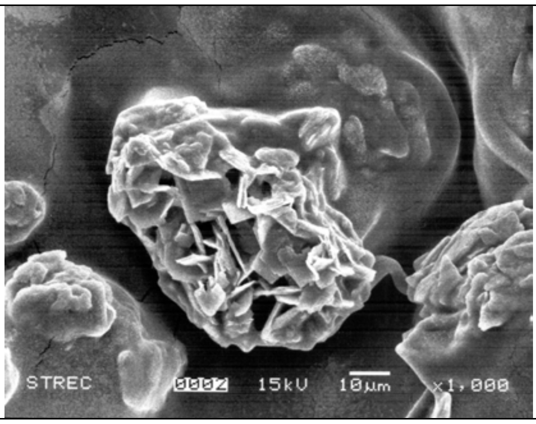
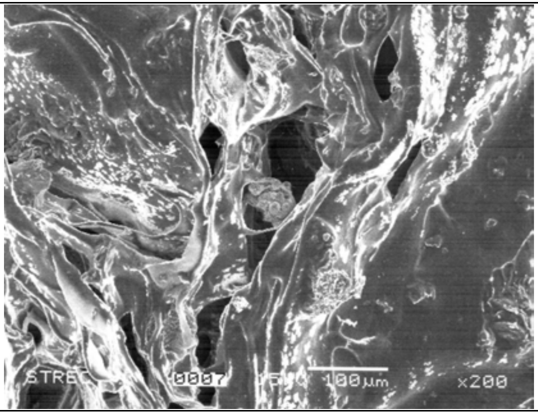
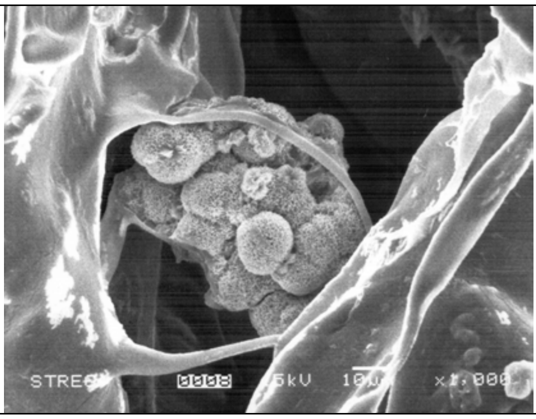
รูปที่ 4.7 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต

<table>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ก่อนการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ หลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
</table>

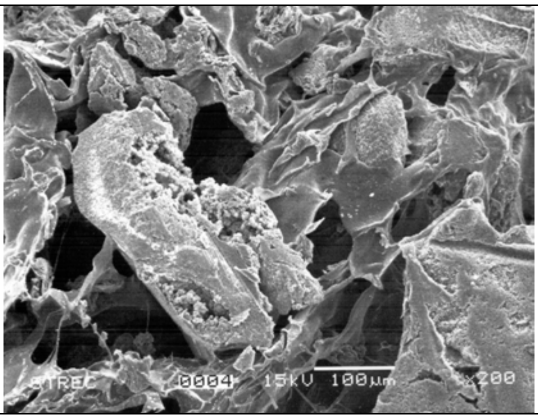
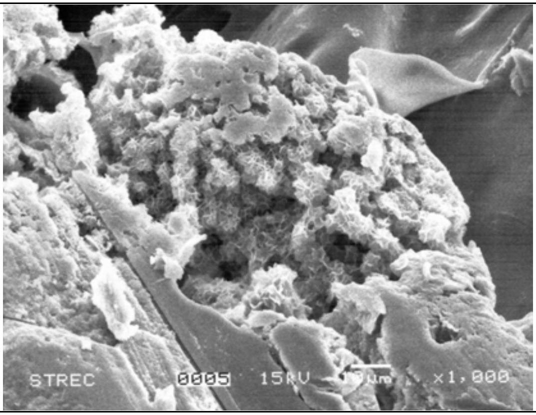
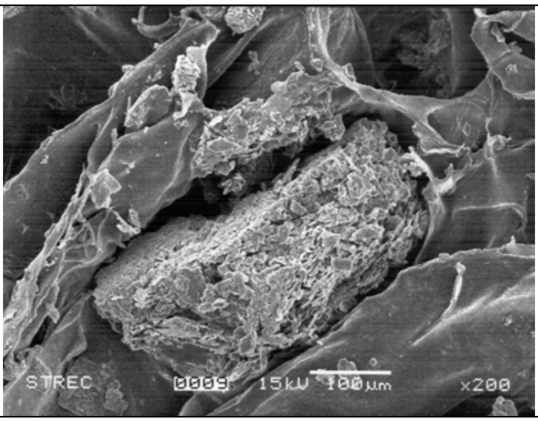
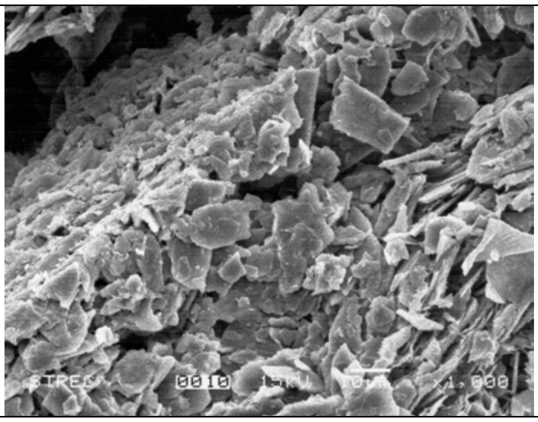
รูปที่ 4.8 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์
ที่บริเวณผิวหน้าก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต

<table>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ก่อนการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td></td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ หลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
</table>

รูปที่ 4.9 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์
ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวางก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต

<table>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต
ก่อนการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต
หลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณผิวหน้า กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
</table>

รูปที่ 4.10 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ที่บริเวณผิวหน้าก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต

<table>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต
ก่อนการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต
หลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต</td></tr>
<tr><td>
</td><td></td></tr>
<tr><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 200 เท่า</td><td>ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง กำลังขยาย 1000 เท่า</td></tr>
</table>

รูปที่ 4.11 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ที่บริเวณพื้นที่ตัดขวางก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยระบบแสงอัลตราไวโอเลต

4.3.4 การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่องไดนามิคเมคคานิคอลแอนาลิซิสรุ่น DMA/SDTA861^{e} **ของ** METTLER TOLEDO

เมื่อทดสอบความทนแรงอัดกับโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์และโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ใน 3 ภาวะคือ ไม่ผ่านการแช่สารใดๆ (กล่าวอีกนัยหนึ่งคือโครงเลี้ยงเซลล์แห้ง) ผ่านการแช่สารฆ่าเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอลหรือผ่านการแช่สารอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงของค่ามอดุลัสการอัด (Compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ภาวะที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบทั้ง 2 ชนิด มีค่ามอดุลัสการอัดลดลงเมื่ออยู่ในภาวะทดสอบการแช่สารละลาย ดังแสดงในตารางที่ 4.3 (ตัวอย่างการคำนวณภาคผนวก จ) เนื่องจากมีการเลื่อนผ่านของสายโซ่โมเลกุลเมื่ออยู่ในสารละลายเพราะไม่มีการเชื่อมขวางทำให้ความแข็งแรงลดลง

นอกจากนี้ยังพบว่า กระดูกคานเนื้อยึดต่อ (trabecular) หรือ กระดูกร่างแห (cancellous) มีค่ามอดุลัสการอัด (compressive Modulus) ประมาณ 2-12 เมกะพาสคัล (2-12 x 10^{5} นิวตันต่อตารางเมตร) [11] และเมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ เชื่อได้ว่าเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่น่าสนใจในการพัฒนาไปสู่วัสดุที่มีสมบัติที่ดีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกร่างแหต่อไป

ตารางที่ 4.3 ค่ามอดุลัสการกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่างๆ

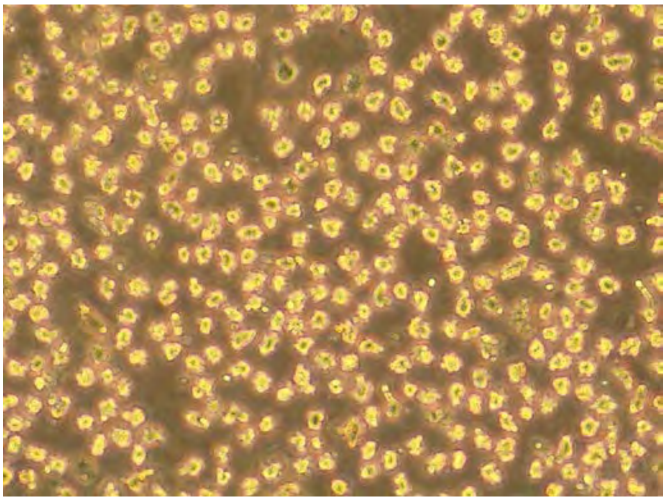
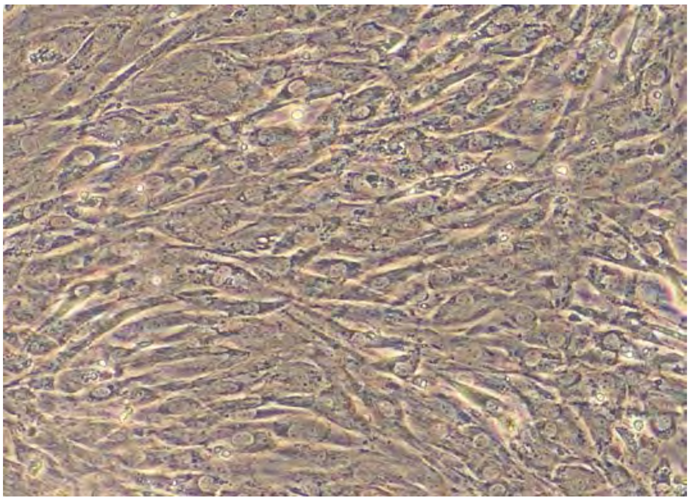
สภาวะในการทดสอบ	ค่ามอดุลัสของความทนต่อแรงกดอัดของวัสดุ *(N/m^2)*		
	โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน	โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์	โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต
ไม่ผ่านการแช่สารใดๆ	7.20×10^{2}	2.00×10^{3}	6.40×10^{3}
ผ่านการแช่สารฆ่าเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล	7.00×10^{1}	2.60×10^{2}	7.80×10^{3}
ผ่านการแช่สารอาหารเลี้ยงเซลล์(DMEM)	4.20	2.40	7.60×10^{1}

4.4 การวิเคราะห์และทดสอบทางชีวภาพ

การทดลองเลี้ยงเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 บนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยมีการรายงานผลการทดลองโดยลำดับดังต่อไปนี้

4.4.1 การขยายปริมาณเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1ในจานเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 มาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยง หลังจากเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 21 วัน เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1 มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากที่มีลักษณะทรงกลม (รูปที่ 4.12 ก) เป็นลักษณะแบนราบรูปดาว (Polygonal) (รูปที่ 4.12 ข) เนื่องจากธรรมชาติในการยึดเกาะของเซลล์ กล่าวคือ เมื่อเซลล์ไลน์สร้างกระดูกเกาะอยู่บนพื้นที่ผิว 2 มิติ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากทรงกลมเป็นรูปดาว และมีการขยายขนาดของระยะห่างระหว่างเซลล์ [50]

	(ก) หลังจากการหว่านเซลล์ลงบนจานเลี้ยงเซลล์
	(ข) หลังจากการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์นาน 21 วัน

รูปที่ 4.12 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1
เมื่อเกาะอยู่บนพื้นที่ผิว 2 มิติที่กำลังขยาย 400 เท่า

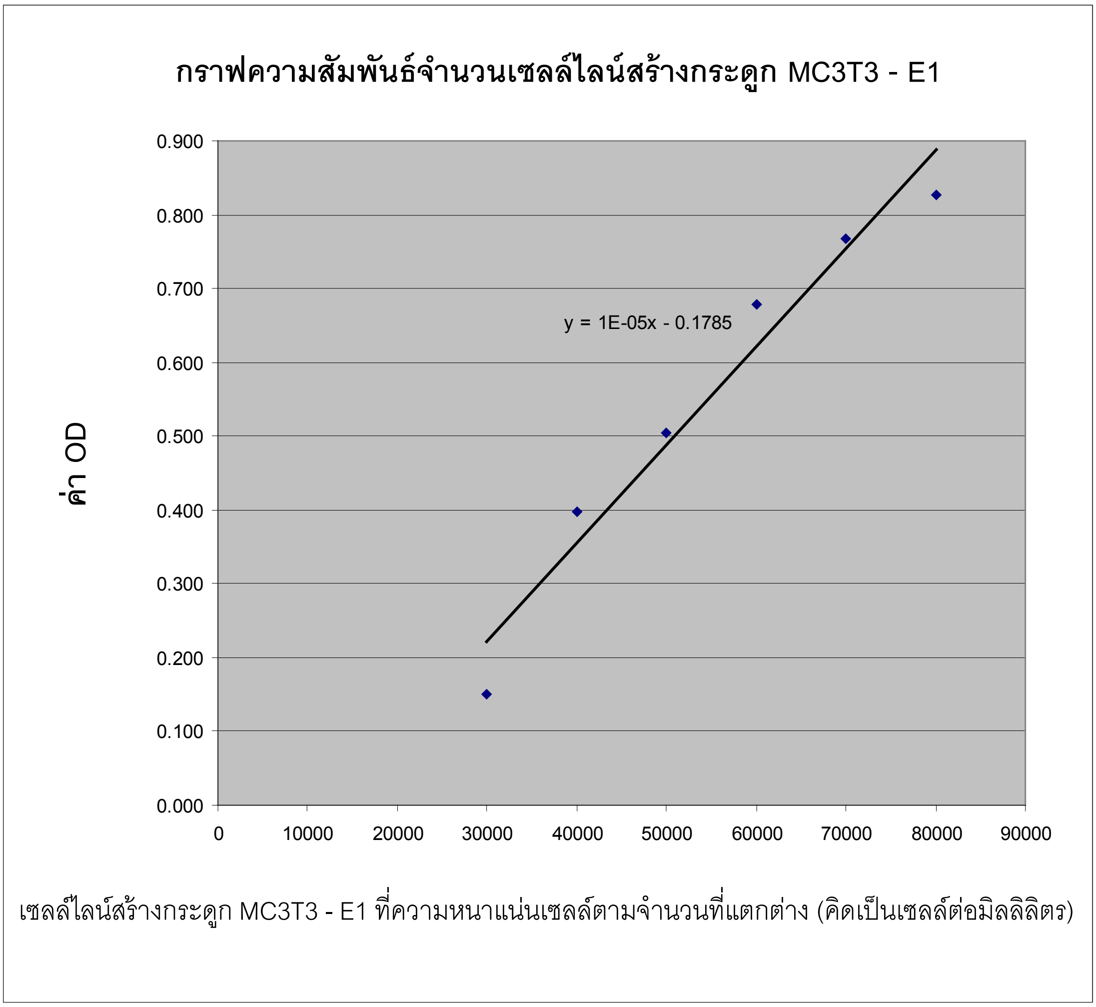
4.4.2 **การสร้างเส้นกราฟมาตรฐานเพื่อมาใช้ในการเทียบหาจำนวนเซลล์เพิ่มเชิงปริมาณด้วยวิธี** MTT assay

ผลการหาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1ที่นับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์ (haemacytometer) แล้วเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความหนาแน่นเซลล์ตามจำนวนที่แตกต่างลงในถาดเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม กับค่า OD หรือ Optical Density ที่ใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในการหาค่าที่ได้จากวิธี MTT assay ได้ความสัมพันธ์ดังตาราง 4.4

ตารางที่ 4.4 ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1กับ ค่ากระเจิงของแสงจากเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 570 นาโนเมตร

ปริมาณความเข้มข้นเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ที่คำนวณจากสไลด์นับเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิตร)	ค่า OD ที่ 570 นาโนเมตรจากวิธี MTT assay				
	หลุมที่ 1	หลุมที่ 2	หลุมที่ 3	หลุมที่ 4	ค่า OD เฉลี่ย
30000	0.156	0.152	0.155	0.139	0.1505
40000	0.428	0.385	0.434	0.329	0.394
50000	0.525	0.484	0.515	0.494	0.5045
60000	0.655	0.694	0.685	0.682	0.679
70000	0.773	0.756	0.785	0.757	0.76775
80000	0.852	0.810	0.843	0.800	0.82625

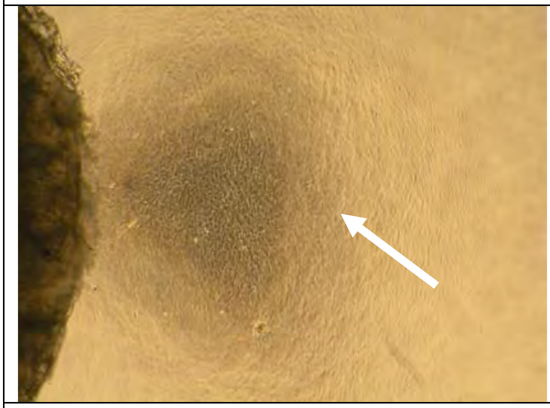
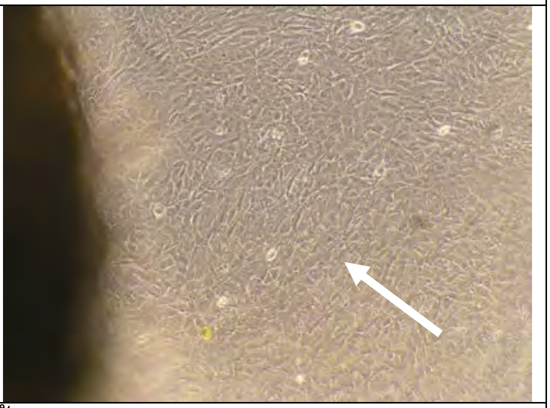
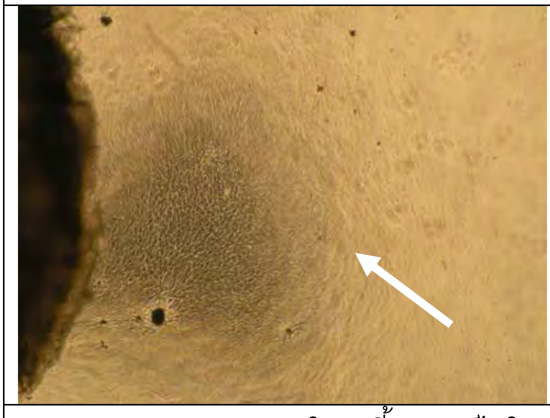
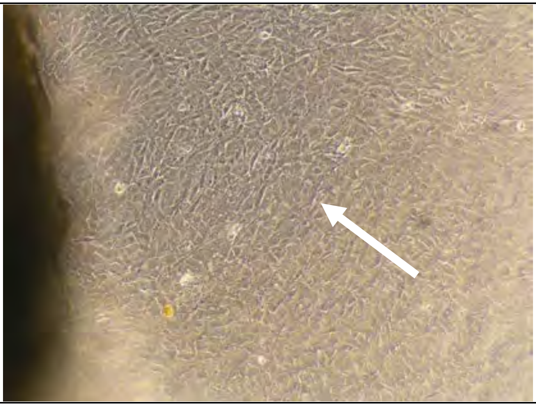
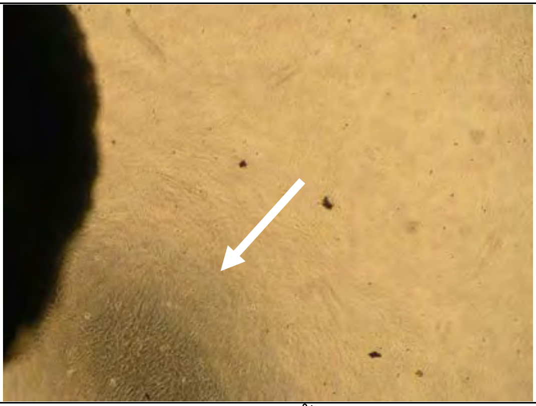
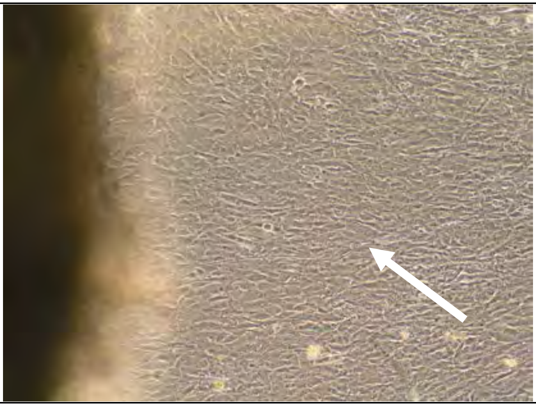
จากตารางที่ 4.4 นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์จำนวนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 กับ ค่า OD ได้ดังกราฟรูปที่ 4.13



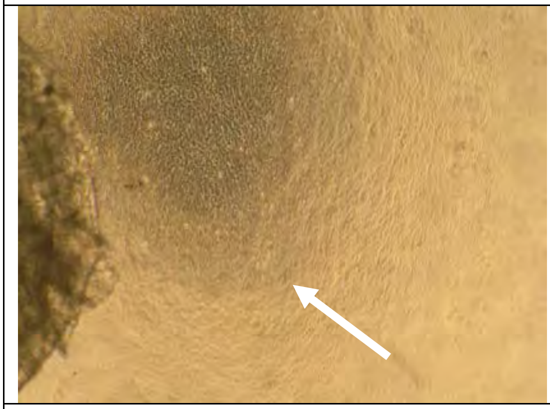
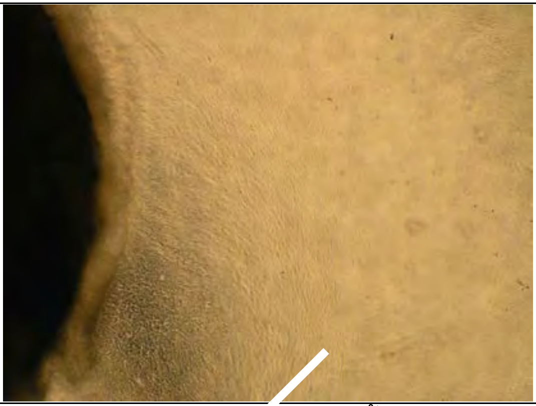
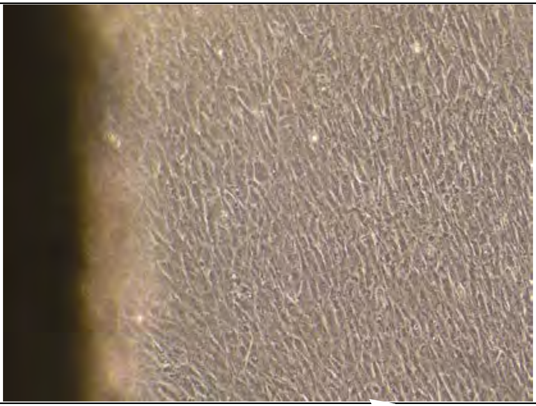
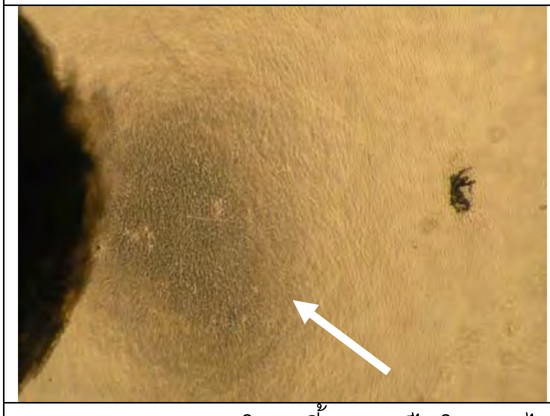
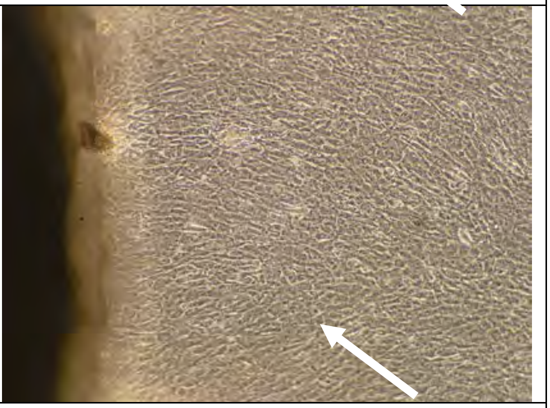
รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์จำนวนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1กับ ค่า OD

4.4.3 **การทดสอบด้วยการสัมผัสโดยตรง** (Direct Contact test)

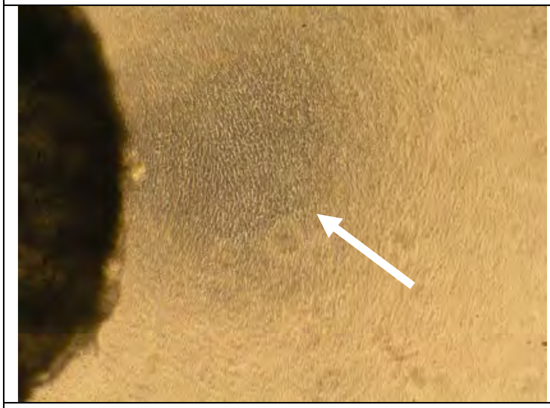
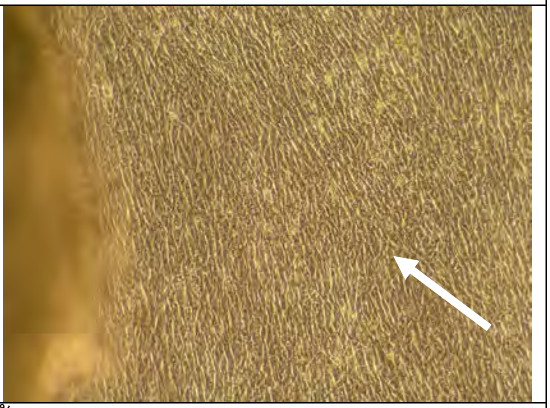
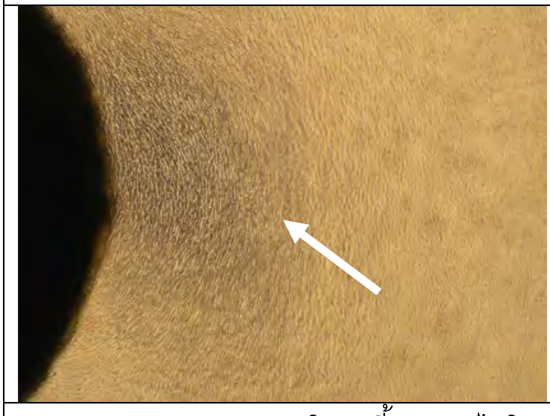
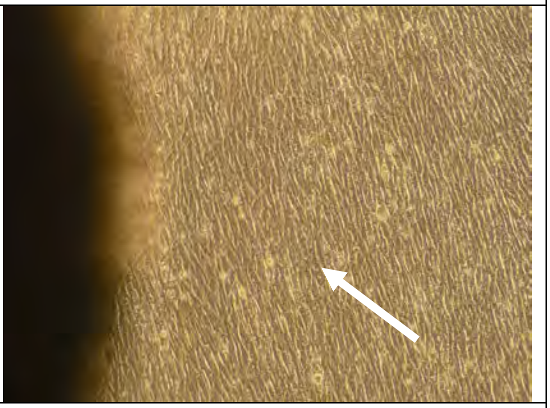
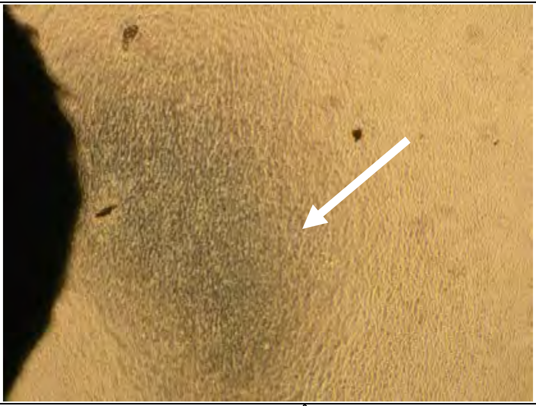
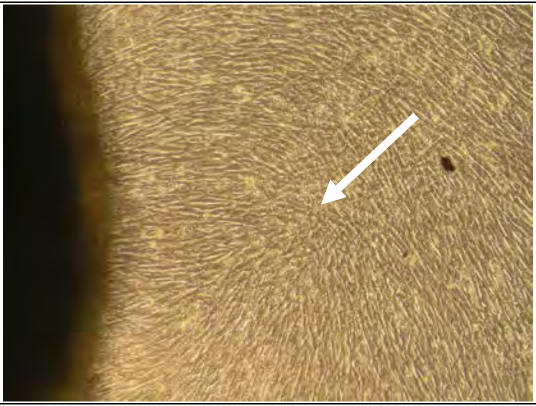
เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ถูกนำมาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุมโดยหว่านเซลล์หลุมละ 6 หมื่นเซลล์ เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ (Direct contract test) ของวัสดุทั้ง 3 ชนิดกับเซลล์ คือ โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต และกลุ่มควบคุม คือ โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน โดยเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 3 7 15 21 และ 29 วัน จากนั้นตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Phase contrast Microscopes, Olympus รุ่น CKX41) จากการทดลองพบว่าเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 สามารถเข้ากันได้ดีกับวัสดุทั้ง 3 ชนิด เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์ไลน์กระดูกเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กับวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ตัวอย่างและ ไม่ปรากฏ Clear Zone โดยเซลล์ที่ปรากฏมีลักษณะรูปร่างเป็นปกติดังลูกศรสีขาวดังรูปที่ 4.14 - 4.17

<table>
<tr><td colspan="2">เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 3</td></tr>
<tr><td>ที่กำลังขยาย 160 เท่า</td><td>ที่กำลังขยาย 400 เท่า</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">กลุ่มควบคุม โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต</td></tr>
</table>

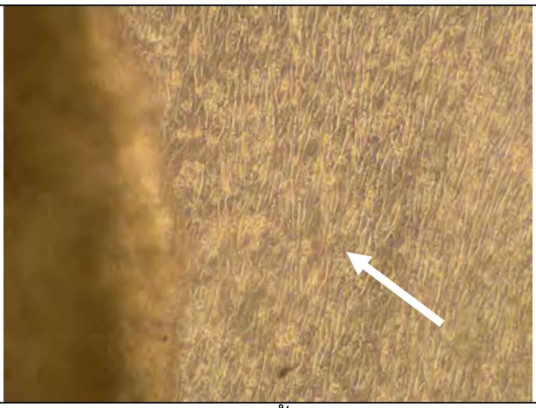
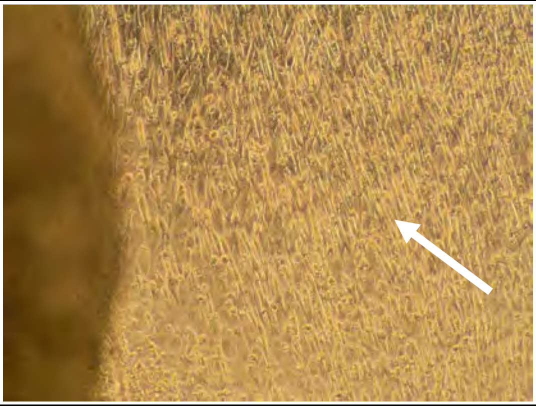
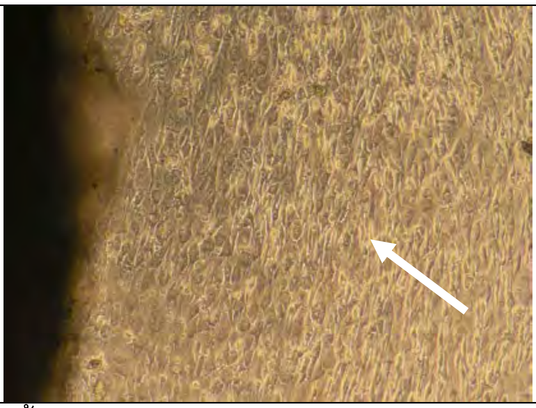
รูปที่ 4.14 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 3

<table>
<tr><td colspan="2">เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 7</td></tr>
<tr><td>ที่กำลังขยาย 160 เท่า</td><td>ที่กำลังขยาย 400 เท่า</td></tr>
<tr><td></td><td> </td></tr>
<tr><td colspan="2">กลุ่มควบคุม โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต</td></tr>
</table>

รูปที่ 4.15 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 7

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 21	
ที่กำลังขยาย 160 เท่า	ที่กำลังขยาย 400 เท่า
	
กลุ่มควบคุม โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน	
	
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์	
	
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต	

รูปที่ 4.16 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 21

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 - E1 ผ่าน กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 29
ที่กำลังขยาย 400 เท่า

กลุ่มควบคุม โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน

โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

รูปที่ 4.17 เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3 – E1
ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวันที่ 29

4.4.4 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการทดสอบการสัมผัสโดยตรง (Direct Contact test) ด้วยวิธี MTT assay

หลังจากทดสอบความเข้ากันได้ (Direct contract test) ของวัสดุทั้ง 3 ชนิดกับเซลล์ คือ โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต และกลุ่มควบคุม คือ โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน กับเซลล์ครบที่ 3 และ 7 วัน นำเซลล์ไปวัดความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี เอ็มทีที (MTT assay) รายงานผลเป็นร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ทดลองทั้งหมด 7 ครั้ง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังแสดงในตาราง ที่ 4.5 และ 4.6 จากจำนวนที่เริ่มต้นหว่านที่ 6 หมื่นเซลล์ หลังจากวัดการอยู่รอดของเซลล์ในวันที่ 3 พบว่ามีจำนวนของเซลล์เพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่าของจำนวนเซลล์เริ่มต้นในวัสดุทั้ง 3 ชนิด โดยวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าวัสดุอื่นเล็กน้อย และหลังจากวัดการอยู่รอดของเซลล์ในวันที่ 7 พบว่ามีจำนวนของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากวันที่ 3 อีกจำนวนประมาณ 2 หมื่นเซลล์โดยโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าวัสดุอื่นเล็กน้อยดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.18

ตารางที่ 4.5 การวัดความอยู่รอดของเซลล์เชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay วันที่ 3

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	วัดความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี เอ็มทีที (MTT assay)								
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ค่าเฉลี่ย	S.D.
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน	1.104	1.172	1.231	1.137	1.100	1.035	1.036	1.116	0.071
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์	1.115	1.187	1.179	1.030	1.090	1.172	1.152	1.132	0.057
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต	1.073	1.065	0.935	1.083	1.126	1.103	1.126	1.073	0.065

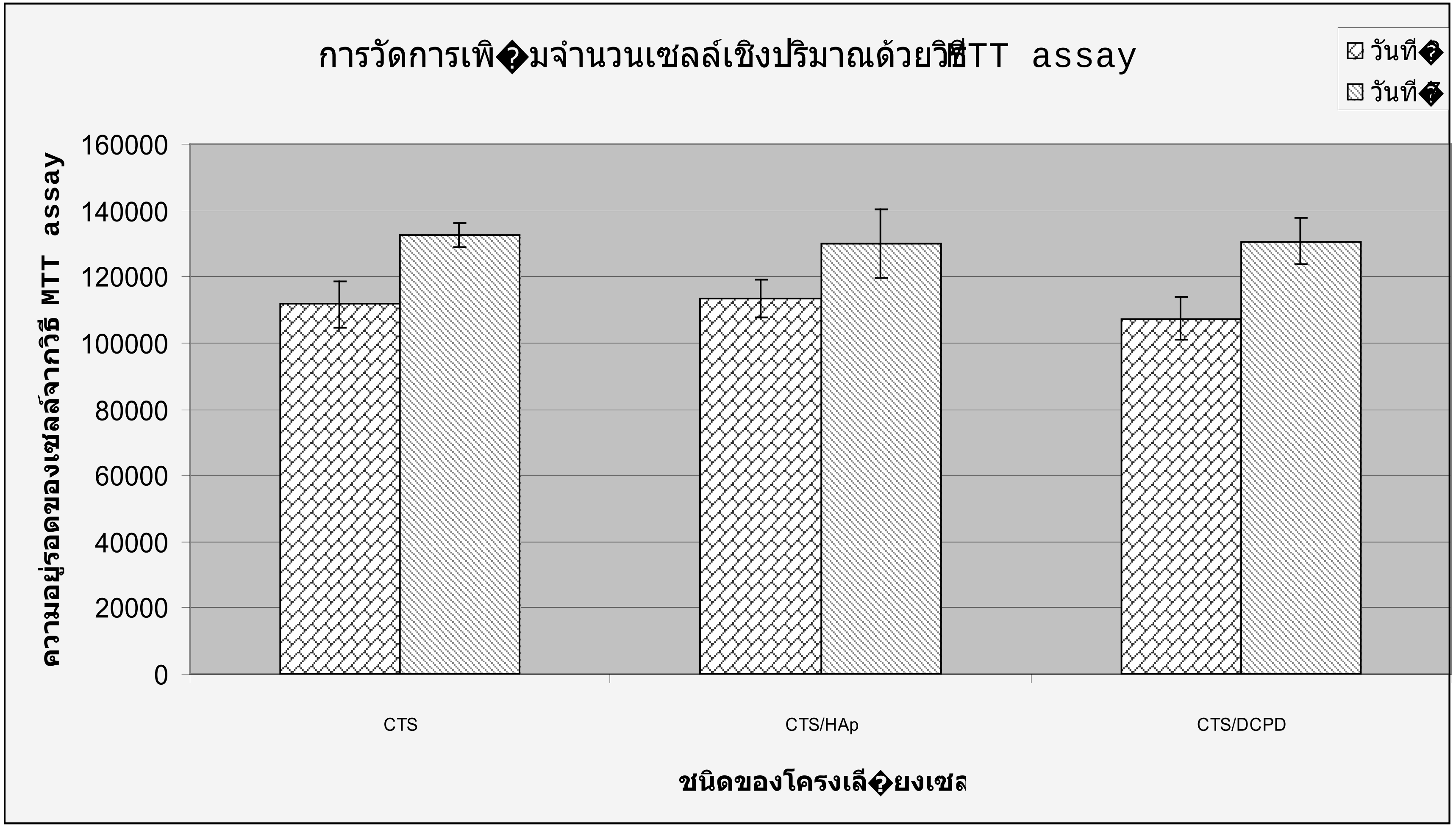
ตารางที่ 4.6 การวัดความอยู่รอดของเซลล์เชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay วันที่ 7

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	วัดความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี เอ็มทีที (MTT assay)								
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ค่าเฉลี่ย	S.D.
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน	1.380	1.310	1.320	1.300	1.270	1.352	1.352	1.326	0.037
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์	1.258	1.370	1.356	1.216	1.210	1.218	1.480	1.301	0.103
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต	1.274	1.372	1.328	1.278	1.182	1.310	1.392	1.305	0.070

นำค่าเฉลี่ยมาเทียบเป็นจำนวนเซลล์จากกราฟรูปที่ 4.13ตามสมการ $Y = 10^{-5} X - 0.1785$ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยของความอยู่รอดของเซลล์เชิงปริมาณเทียบเป็นจำนวนเซลล์จากกราฟรูปที่ 4.13

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	วันที่ 3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	วันที่ 7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน	111600.1785	132600.1785
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์	113200.1785	130100.1785
โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต	107300.1785	130500.1785



รูปที่ 4.18.กราฟแห่งการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์เชิงปริมาณด้วยวิธี MTT assay ในวันที่ 3 และ วันที่ 7

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์หาอัตราส่วนของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ด้วยเทคนิคเทอร์มอกราวิเมติกแอนาลิซิส (TGA) พบว่าเปอร์เซ็นต์ของแคลเซียมฟอสเฟตในวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์และวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตในบริเวณที่แตกต่างกัน 3 บริเวณของตัวอย่างแต่ละชนิด มีค่าเปอร์เซ็นต์ของแคลเซียมฟอสเฟต (ไฮดรอกซีอะพาไทต์หรือไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต) ที่ประกอบอยู่ในวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ใกล้เคียงกัน พิจารณาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าค่อนข้างต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์และวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่สังเคราะห์ได้มีแคลเซียมฟอสเฟตที่กระจายตัวหรือแทรกอยู่ภายในเนื้อของไคโตซานค่อนข้างสม่ำเสมอ โดยมีสัดส่วนของแคลเซียมฟอสเฟตประมาณ 35-45%

2. การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าวัสดุเชิงประกอบที่มีองค์ประกอบของแคลเซียมฟอสเฟตมีลักษณะโครงสร้างของรูพรุนเป็นสามมิติที่มีการเชื่อมต่อของรูพรุนภายในโครงสร้าง ทั้งในส่วนของบริเวณผิวหน้าและบริเวณพื้นที่ตัดขวาง โดยโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตมีขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วงระหว่าง 50 ไมโครเมตร ถึง 400 ไมโครเมตร โดยในโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 200 ไมโครเมตร ถึง 400 ไมโครเมตร และโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 50 ไมโครเมตร ถึง 100 ไมโครเมตร และมีผลึกแคลเซียมฟอสเฟตมีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปภายในโครงเลี้ยงเซลล์

3. การวิเคราะห์ธาตุด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ประกอบกับเครื่องวิเคราะห์ในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ พบว่าอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของไฮดรอกซีอะพาไทต์และไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรตที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุ แสดงค่าเป็นไปตามทฤษฎี

4. การวิเคราะห์วัสดุเชิงประกอบด้วย XRD พบพีกวัสดุเชิงประกอบโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ 2θ ที่ตำแหน่งประมาณตำแหน่ง 2θ=26° และ 32°

นอกจากนี้พบตำแหน่ง 2 θ = 20.94, 29.25, 30.50, 34.15 และ 34.42 ในวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

5. การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/เซียมฟอสเฟตให้ค่ามอดุลัสการอัดสูงที่ลดลง ในภาวะที่แช่ในสารละลาย โดยมีค่าต่ำสุดเมื่อแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM

6. การวิเคราะห์และทดสอบทางชีวภาพ พบว่าโครงเลี้ยงที่สังเคราะห์ได้มีความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของกระดูก MCT3T-E1 ตามวิธีการทดสอบด้วยมาตราฐาน ISO 10993-5 [46] ซึ่งพิจารณาจากมีการห้อมล้อมของเซลล์ในบริเวณผิวของวัสดุ นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุที่เตรียมได้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี กล่าวคือ พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายหลังการทดสอบการสัมผัสโดยตรงซึ่งแสดงถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์

7. จากผลการวิเคราะห์ SEM-EDX และ XRD ชี้ให้เห็นว่าแคลเซียมฟอสเฟตทั้งชนิดของ HAp และ DCPD สามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไคโตซานด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ ตามด้วยขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนโดยการทำแห้งเยือกแข็งได้ และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนของสารประกอบดังกล่าวนี้ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไลน์กระดูก ดังนั้นวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต ที่เตรียมโดยวิธีนี้มีความปลอดภัยในระดับห้องปฏิบัติการสามารถพัฒนาไปเป็นวัสดุทดแทนกระดูกต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

1.เพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นวัสดุทดแทนกระดูกได้จริง ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อดูความสามารถในการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนเซลล์ รวมทั้งการสร้างแคลเซียมและการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป รวมถึงมีการทดลองในสัตว์ทดลอง โดยการแทนที่กระดูกที่เสียหายเพื่อศึกษาความเป็นไปได้การสร้างกระดูกใหม่ทดแทน

รายการอ้างอิง

[1] An, Y.B.; and Lee, W.H. Synthesis of porous titanium implants by environmental-electro-discharge-sintering process. Materials Chemistry and Physics 95 (2006): 242–247.

[2] Zhang, N.; Nichols, H.L.; Tylor, S.; and Wen, X. Fabrication of nanocrystalline hydroxyapatite doped degradable composite hollow fiber for guided and biomimetic bone tissue engineering. Materials Science and Engineering C 27 (2007): 599–606.

[3] Yuehuei, H.A.; and Kylie, L.M. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Totowa, N.J. : Humana Press, 2003: 64-65.

[4] Kleinman, T.E.; Golenser, J.; and Domb, A.J.; "Polysaccharide scaffolds for tissue engineerng" in Ma, P.X.; and Elisseeff, J., Ed, Scaffolding in tissue engineering. USA: Taylor & Francis Group, CRC Press, 2006.

[5] Langer, R. Tissue engineering. Molecular Therapy 1 (2000) : 12-15.

[6] นพ.พิบูลย์ อิทธิระวิวงศ์ . กระดูก วัสดุชีวภาพ กลศาสตร์ชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์บริษัทเท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น, 2547.

[7] "Bone Structure". [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.cliffsnotes.com/WileyCDA/CliffsReviewTopic/Bone-Structure.topicArticleId-22032,articleId-21902.html

[8] "Structure of Bone Tissue". [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html

[9] Atala, A.; and Lanza, R.P. Methods of tissue engineering. 1st ed. San Diego : Academic Press, 2001.

[10] Boyan, B.D.; Lohmann C.H.; Romero, J.; and Schwartz, Z. Bone and cartilage tissue engineering. Clinical Plastic Surgery 26 (1999).

[11] Ghosh, S. B. Bone as a Collagen-hydroxyapatite Composite and its Repair. Trends in Biomaterials & Artificial Organs. 22 (2008): 112-120.

[12] Lu, L.; Zhu, X.; Valenzuela, R.G.; Currier, B.L.; and Yaszemski, M.J. Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. Clinical Orthopedics and related research 391 (2001): S251-S270.

[13] Cancedda, R.; Dozin, B.; Giannoni, P.; and Quarto R. Mini Review: Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Matrix Biology 22 (2003): 81-91.

[14] Hutmacher, D.W.; Ng, K.W.; Kaps, C.; Sittinger, M.; and Kläring, S. Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier. Biomaterials 24 (2003): 4445-4458.

[15] “วัสดุเชิงประกอบ”. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.bg.ic.ac.uk/Lecture/Hench/BioCamp/Chap3.html

[16] วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ. เอกสารประกอบการสอนวิชาพอลิเมอร์ที่ใช้ทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

[17] “Henri Braconnot From Wikipedia”. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Henri_Braconnot.

[18] “เรื่องน่ารู้ไคติน-ไคโตซาน”. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.poodang.net.

[19] “Preparation of chitin and chitosan”. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : www.mse.uiuc.edu/biomaterials/research.

[20] Li, J.; Chen, Y.; Yin, Y.; Yao, F.; and Yao, K. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan–gelatin network film in situ. Biomaterials 28 (2007):781–790.

[21] Chen, X.G.; Liu , C.S..; Liu , C.G.; Meng, X.H.; Lee, C.M.; and Park, H.J. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. Biochemical Engineering Journal 27 (2006):269–274.

[22] Min, B.M.; Lee, S.W.; Lim, J.N.; You, Y.; Lee, T.S.; Kang, P.H.; and Park, W.H. Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. Polymer 45 (2004):7137–7142.

[23] Hong, H.; Wei, J.; and Liu, C. Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration. Composites: Part B 38 (2007):311–316.

[24] Francis Suh, J.K.; and Matthew, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials 21 (2000): 2589-2598.

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

[26] Zhang, Y.; and Zhang, M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research 55 (2001):304–312.

[27] Chow, K.S.; Khor, E.; and Wan, A.C.A. Porous chitin matrices for tissue engineering: fabrication and in-vitro cytotoxic assessment. Journal of Polymer Research 8 (2001):27–35.

[28] Aoki, H. Medical Application of hydroxyapatite. Tokyo: Ishiyaky Euro America, (1994).

[29] ดุสิดา สหาวัตร. การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซานและไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยกระบวนการแพร่ผ่านแผ่นเยื่อ. หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

[30] LeGeros, R.Z.; and LeGeros, J.P. “Dense Hydroxyapatite” in Hench, L.L.; and Wilson, J., Ed., An introduction to bioceramics. Singapore: World Scientific Publishing, (1993).

[31] de Leeuw, N. H. Local ordering of hydroxy groups in hydroxyapatite. Chemical Communications. (2001): 1646–1647.

[32] “Index of kanedalabo”. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/kanedalabo/

[33] Ge, Z.; Baguenard, S.; Lim, L.Y.; Wee, A.; and Khor, E. Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. Biomaterials 25 (2004):1049–1058.

[34] Cheng , G.J.; Pirzada , D.; Cai , M.; Mohanty , P.; and Bandyopadhyay, A. Bioceramic coating of hydroxyapatite on titanium substrate with Nd-YAG laser. Materials Science and Engineering C 25 (2005):541 – 547.

[35] Arinzeh, T.L.; Tran, T.; Mcalary, J.; and Daculsi, G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. Biomaterials 26 (2005):3631-3638.

[36] "HA Ultrogel® Hydroxyapatite Chromatography Sorbent". [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.pall.com/datasheet_biopharm_35681.asp.

[37] Sun, Y.; Guo, G.; Tao, D.; and Wang, Z. Reverse microemulsion-directed synthesis of hydroxyapatite nanoparticles under hydrothermal conditions. Journal of Physics and Chemistry of Solids 68 (2007): 373–377.

[38] Somiya, S.; Loku, K.; and Yoshimura, M. Hydroxyapatite synthesis and characterization of fine apatite crystals. Ceramic Developments 34(1988): 371-378.

[39] Willmann, G. Material properties of hydroxylapatite ceramics. Interceram 42(4) (1993): 206-208.

[40] "ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) วัสดุทดแทนกระดูก". [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.mtec.or.th/th/news/cool_stuff/cool.html.

[41] LeGeros, R.Z. "Calcium phosphate in oral biology and medicine" in Myers, H. M., Ed., Monographs in Oral Science. New York : S. Karger AG, 1991.

[42] Lima, F. R.; Mendonca, C. X.; Alvarez, J. C.; Ratti, G.; Lenharo, S. L. R.; Kahn, H.; and Garzillo, J. M. F. Chemical and physical evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of biologically available phosphorus for broiler chicks. Poultry Science. 74 (1995):1659-1670.

[43] "ปรึกษาแพทย์". [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : www.bangkokhealth.com/consult_htdoc /Question.asp?GID=61040

[44] He, L.; and Feng, Z. Preparation and characterization of dicalcium phosphate dehydrate coating on enamel. Materials Letters 61 (2007):3923-3926.

[45] Biological Evaluation of medical devices - Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity. 2004, ISO copyright office. p. 1-8.

[46] Freshney, R.I. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3th edition. New York: Wiley-Liss, Inc.,1994.

[47] Alvarez, R.; Evans, L. A.; Milham, P. J.; and Wilson, M. A. Effects of humic material on the precipitation of calcium phosphate. Geoderma 118 (2004):245-260.

[48] Kumar, M.; Xie, J.; Chittur, K.; and Riley, C. Transformation of modified brushite to hydroxyapatite in aqueous solution: effects of potassium substitution. Biomaterials 20 (1999):1389-1399.

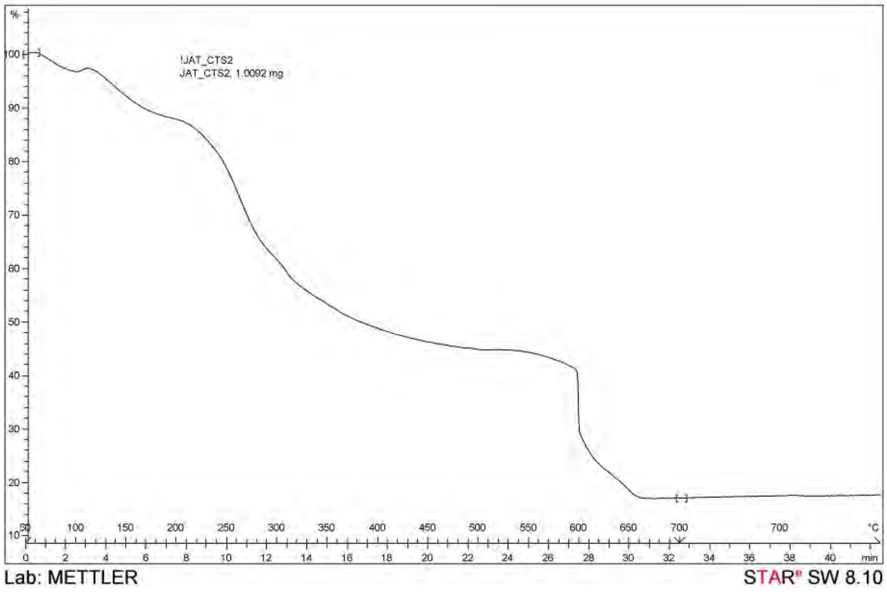
[49] Oh, S. H.; Park, I. K.; Kim, J. M.; and Lee, J. H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. Biomaterials 28 (2007):1664-1671.

[50] Ishuag-Riley, S. L.; Crane-Kruger, G. M.; and Yaszemski, M. J. Three-dimentional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. Biomaterials 19 (1998):1405-1412.

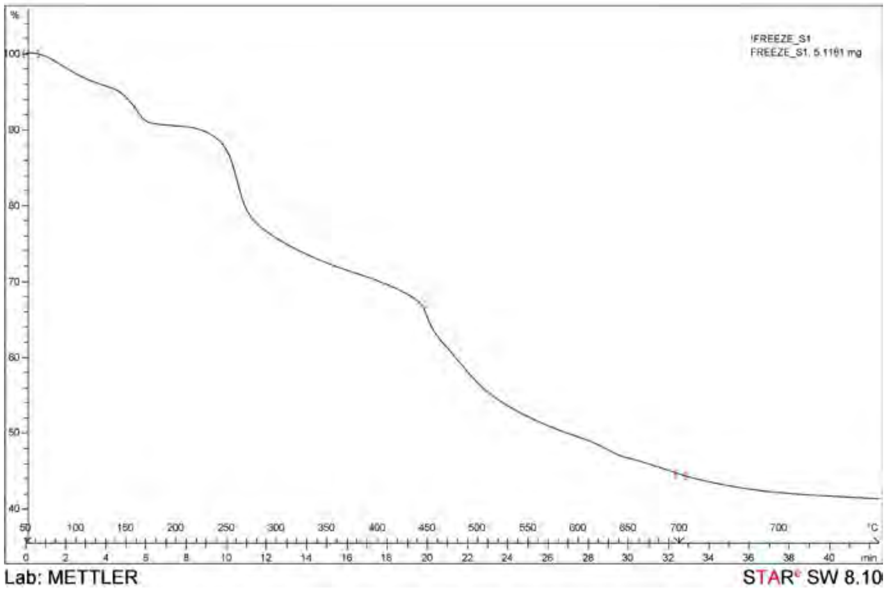
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

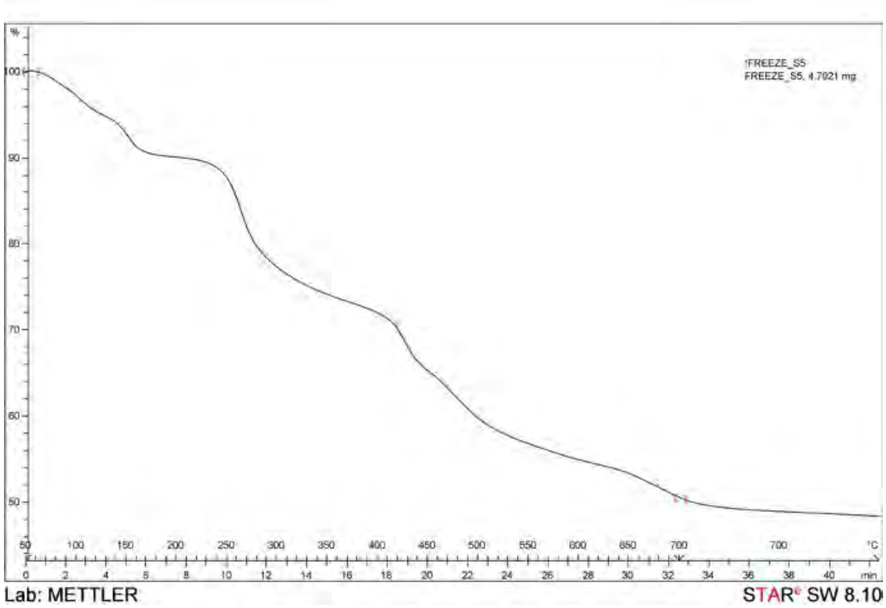
การเตรียมวัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟต



รูปที่ ก.1 TGA เทอร์มอแกรมของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน



รูปที่ ก.2 TGA เทอร์มอแกรมของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ
ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์



รูปที่ ก.3 TGA เทอร์มอแกรมของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุด้วยเทคนิค EDS

ตาราง ข.1 อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณผิวหน้า)

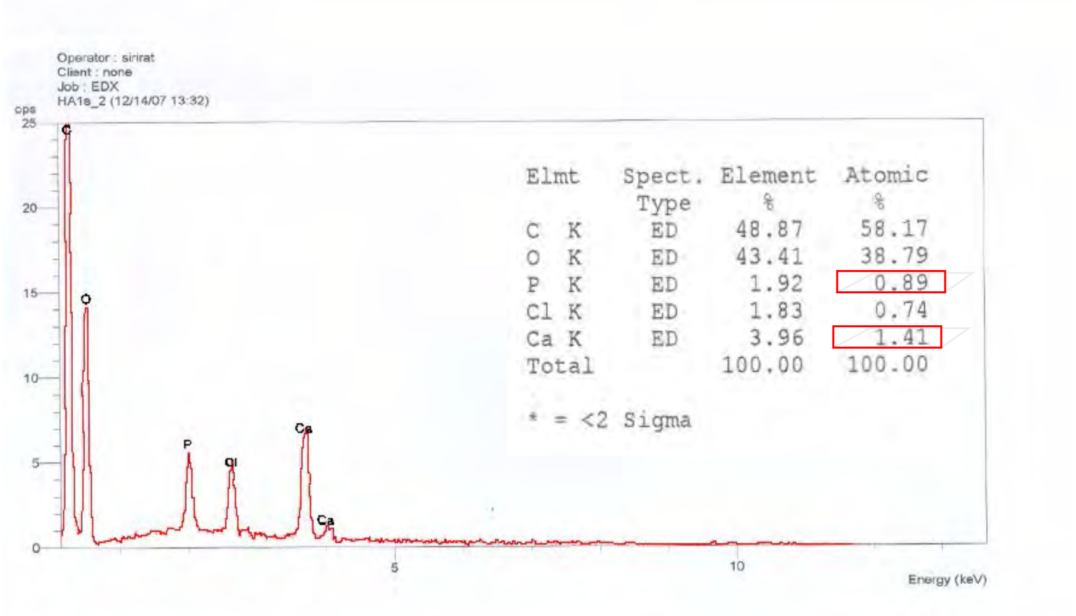
ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	% องค์ประกอบธาตุ		อัตราส่วน Ca/P[c]	ค่าตามทฤษฎี Ca/P[d]
	Ca[a]	P[b]		
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณผิวหน้า)	1.41	0.89	1.58	1.67 [28]

a ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

b ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

c ได้จากการคำนวณ % Atomic ของค่า a หารด้วย b

d ได้จาก % Atomic ที่มีการคำนวณค่าตามทฤษฎี



รูปที่ ข.1 EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณผิวหน้า)

ตาราง ข.2 อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของโครงเลี้ยงเซลล์ วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)

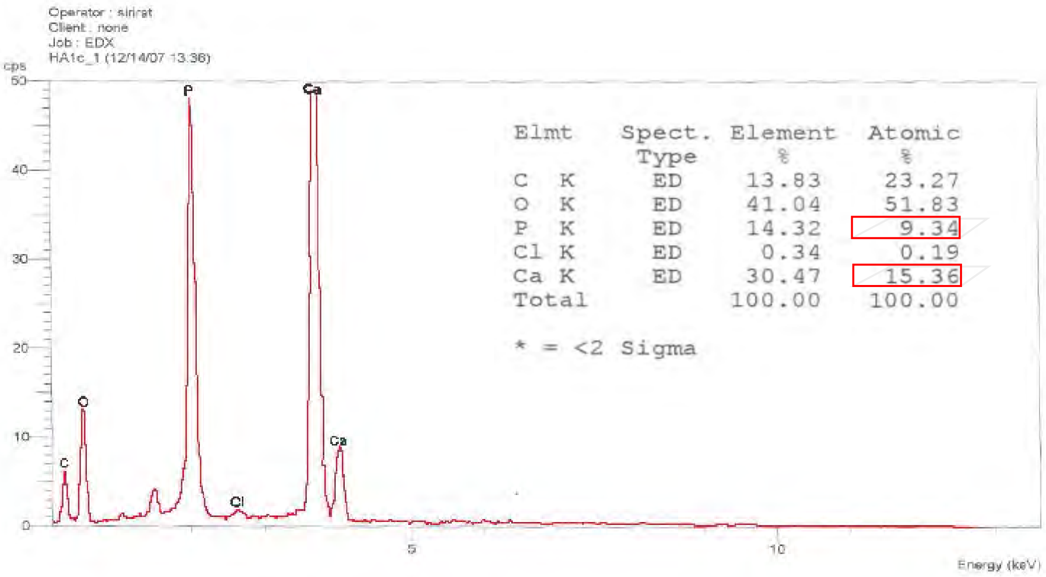
ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	% องค์ประกอบธาตุ		อัตราส่วน	ค่าตามทฤษฎี
	Ca[a]	P[b]	Ca/P[c]	Ca/P[d]
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)	15.36	9.34	1.64	1.67 [28]

a ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

b ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

c ได้จากการคำนวณ % Atomic ของค่า a หารด้วย b

d ได้จาก % Atomic ที่มีการคำนวณค่าตามทฤษฎี



รูปที่ ข.2 EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)

ตาราง ข.3 อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณผิวหน้า)

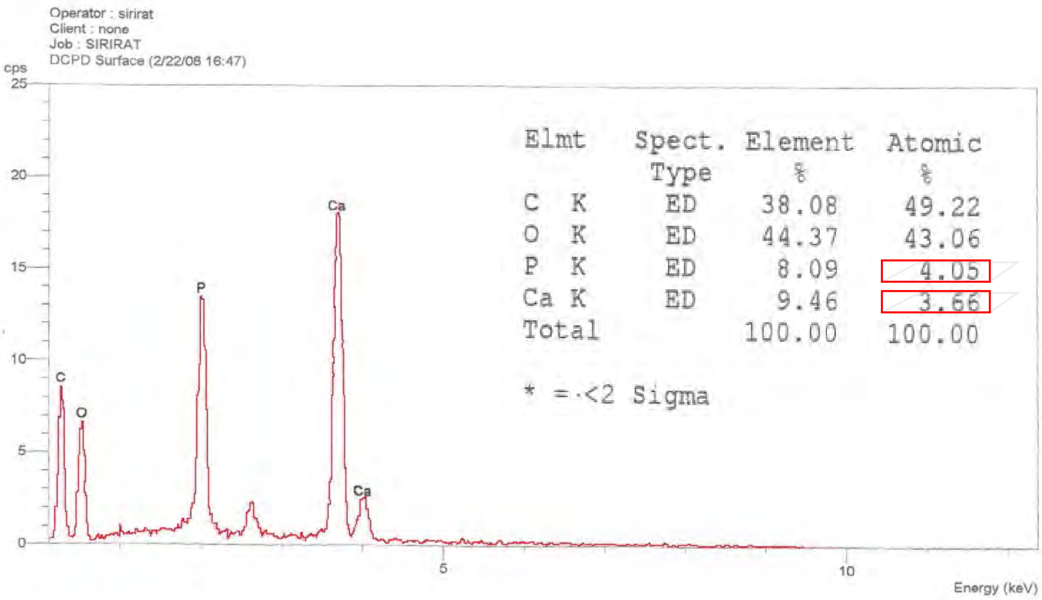
ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	% องค์ประกอบธาตุ		อัตราส่วน Ca/P[c]	ค่าตามทฤษฎี Ca/P[d]
	Ca[a]	P[b]		
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณผิวหน้า)	3.66	4.05	0.90	1.00 [28]

a ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

b ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

c ได้จากการคำนวณ % Atomic ของค่า a หารด้วย b

d ได้จาก % Atomic ที่มีการคำนวณค่าตามทฤษฎี



รูปที่ ข.3 EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณผิวหน้า)

ตาราง ข.4 อัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)

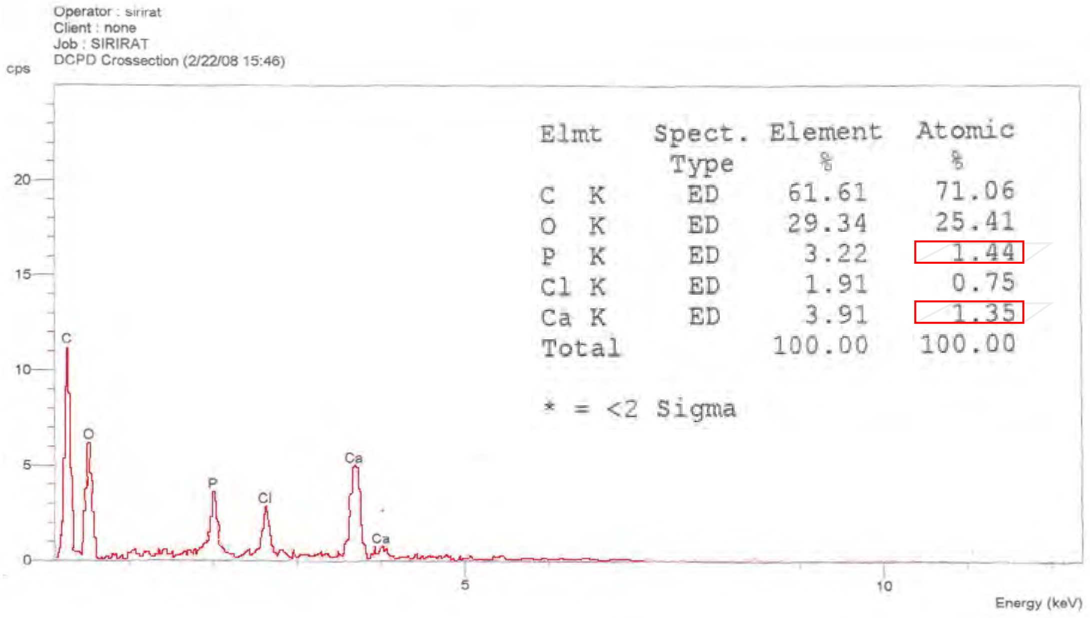
ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	% องค์ประกอบธาตุ		อัตราส่วน	ค่าตามทฤษฎี
	Ca[a]	P[b]	Ca/P[c]	Ca/P[d]
วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)	1.35	1.44	0.93	1.00 [28]

a ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

b ได้จาก % Atomic ที่วิเคราะห์จาก EDS

c ได้จากการคำนวณ % Atomic ของค่า a หารด้วย b

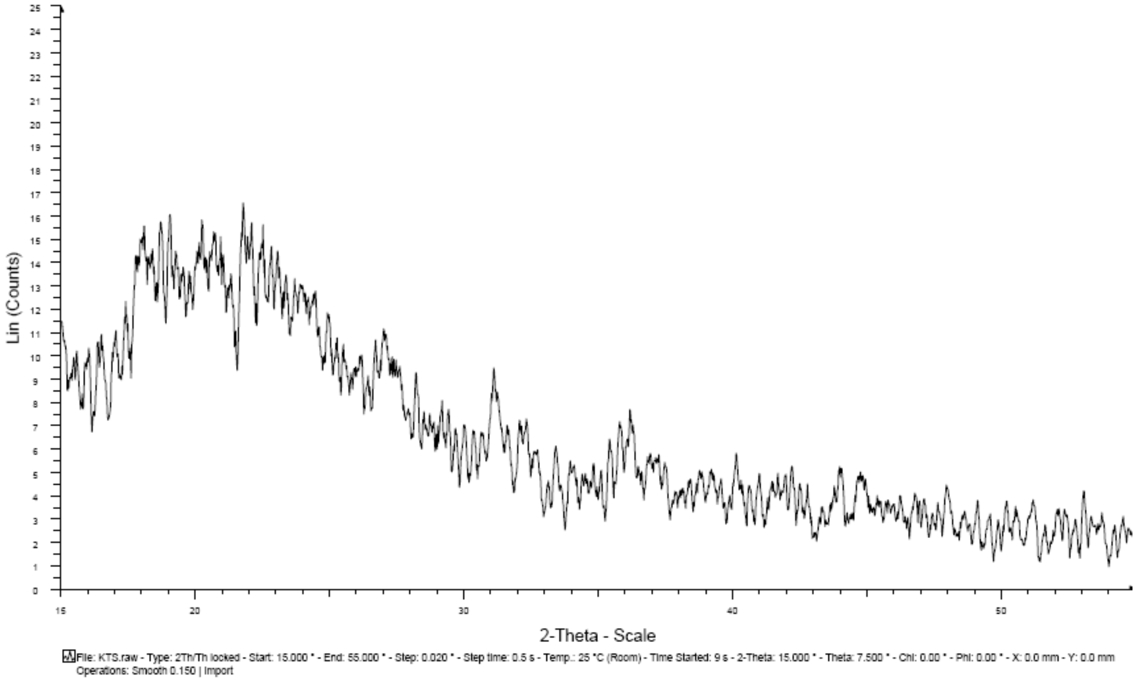
d ได้จาก % Atomic ที่มีการคำนวณค่าตามทฤษฎี



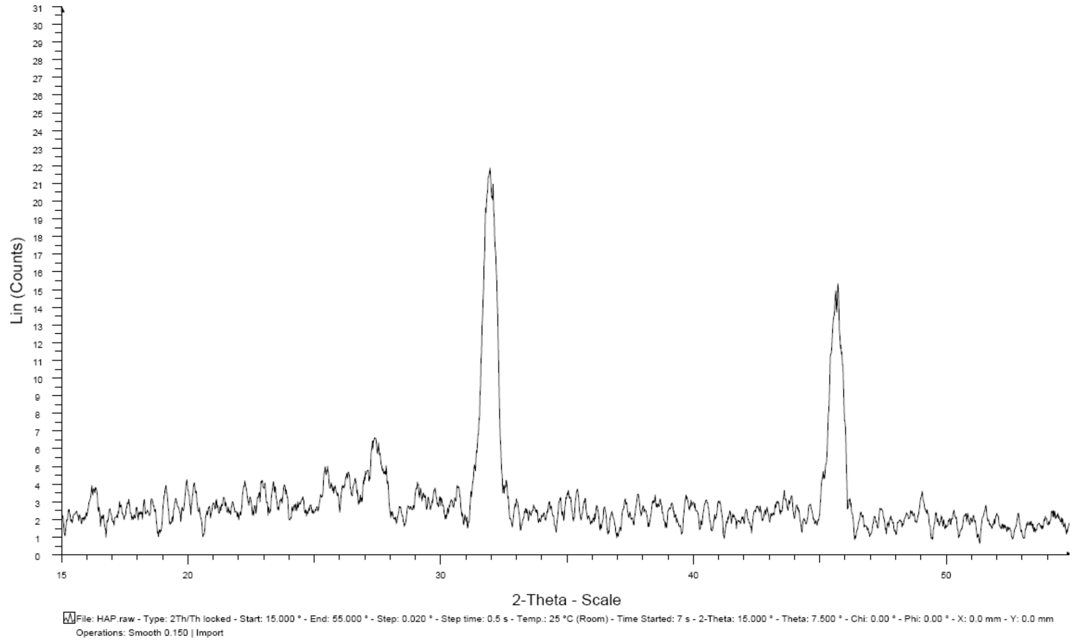
รูปที่ ข.4 EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง)

ภาคผนวก ค

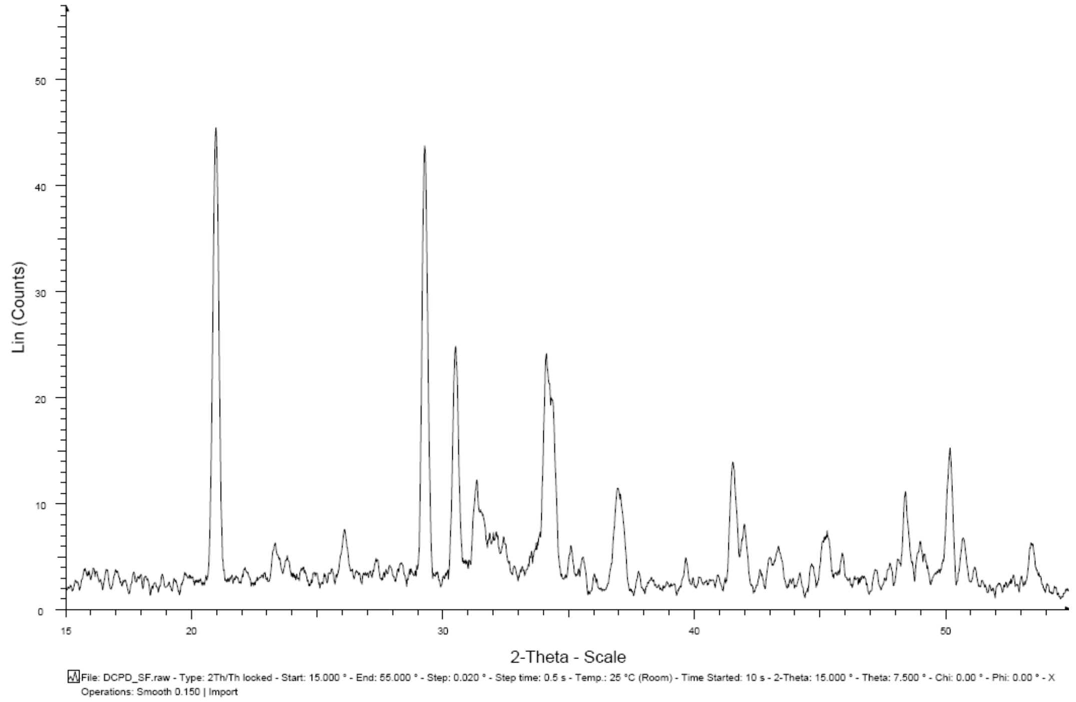
การวิเคราะห์ความเป็นผลึกแคลเซียมฟอสเฟตด้วยเทคนิค XRD



รูปที่ ค.1 XRD ของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน



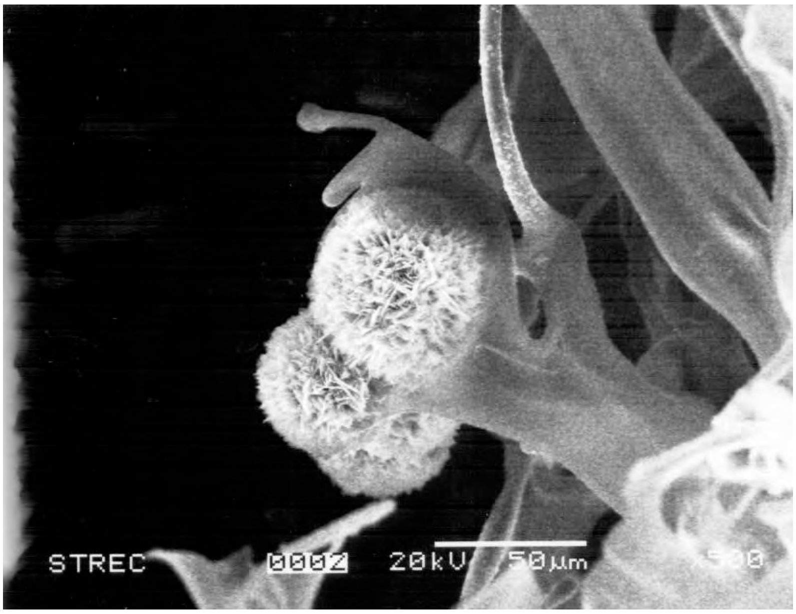
รูปที่ ค.2 XRD ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์



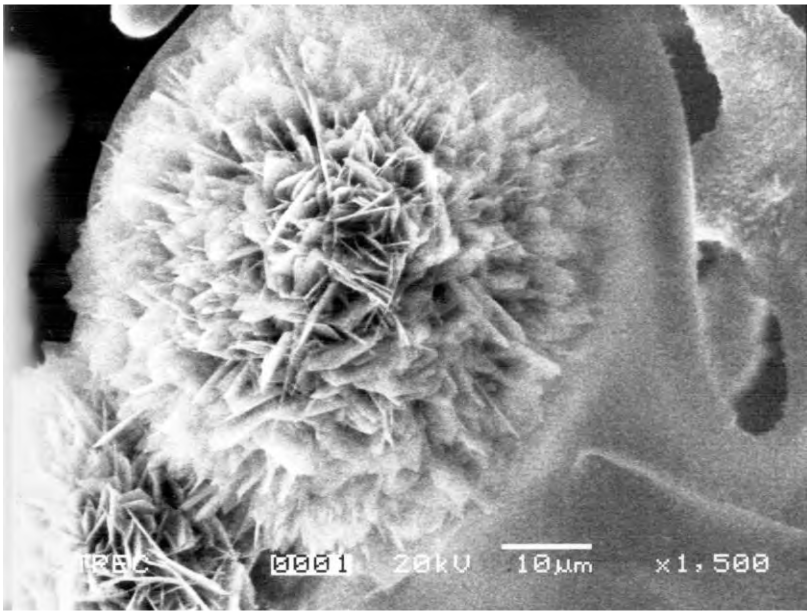
รูปที่ ค.3 XRD ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

ภาคผนวก ง

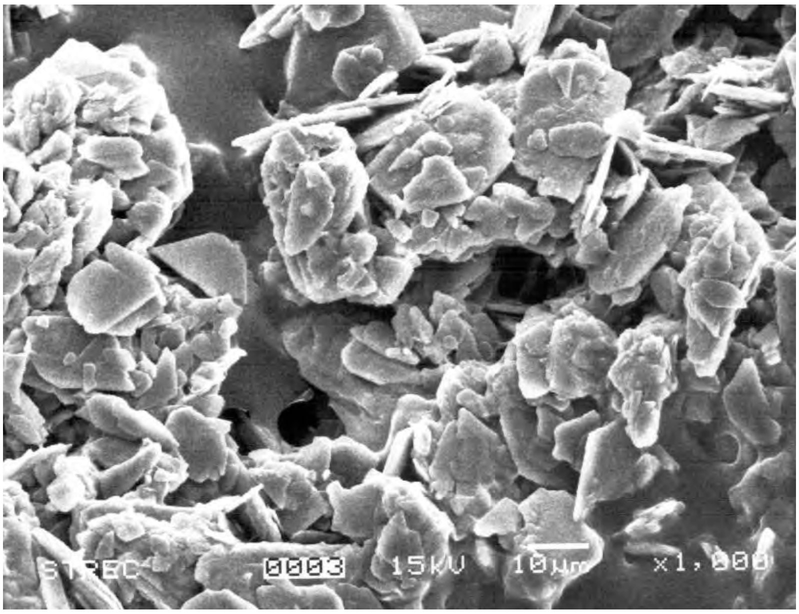
การวิเคราะห์สัณฐานภายนอกของวัสดุเชิงประกอบด้วยเทคนิค SEM



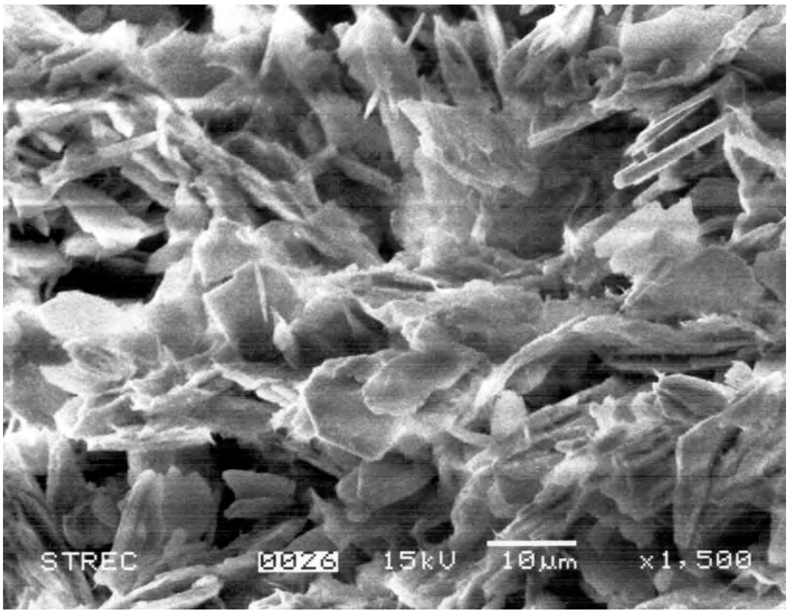
รูปที่ ง.1 SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ
ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง) ที่ 500 เท่า
และไม่ผ่านการเคลือบทองคำ



รูปที่ ง.2 SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ
ไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง) ที่ 1500 เท่า
และไม่ผ่านการเคลือบทองคำ



รูปที่ ง.3 SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ
ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง) ที่ 1000 เท่า
และไม่ผ่านการเคลือบทองคำ



รูปที่ ง.4 SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบ
ไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (บริเวณพื้นที่ตัดขวาง) ที่ 1500 เท่า
และไม่ผ่านการเคลือบทองคำ

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ความทนแรงอัดของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่อง DMA

ตัวอย่างการคำนวน

วัดขนาดตัวอย่างเพื่อใส่ค่าให้กับเครื่อง DMA ชิ้นงานไคโตซาน

ความยาว 5.4 มิลลิเมตร ความกว้าง 5 มิลลิเมตร ความหนา 3.3 มิลลิเมตร

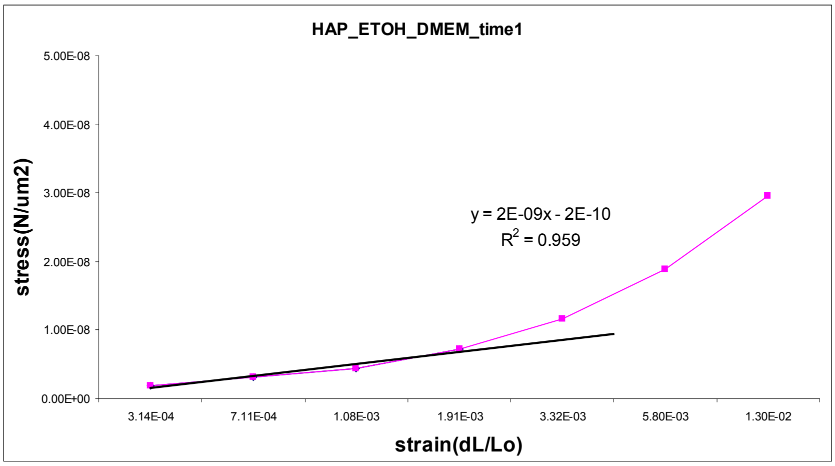
เครื่องจะทำการทดสอบพร้อมการคำนวณ แสดงค่าดังตารางโดยแต่ละตัวอย่างจะทดสอบ 5 ครั้ง

HAP_time1												
Length	5.4	mm	Width	5	mm	Thickness	3.3	mm	Geometry	factor	122.2222	1/m
x	value	area	L	F\A	dL\Lo							
[um]	[N]	(um2)	(um)	[N/um2]								
1.03741	0.049148	27000000	3300	1.8203E-09	0.000314367							
2.34506	0.08337	27000000	3300	3.08779E-09	0.000710624							
3.57956	0.120003	27000000	3300	4.44456E-09	0.001084715							
6.29546	0.195041	27000000	3300	7.22374E-09	0.001907715							
10.9492	0.316208	27000000	3300	1.17114E-08	0.003317939							
19.1553	0.511178	27000000	3300	1.89325E-08	0.005804636							
42.771	0.796876	27000000	3300	2.95139E-08	0.012960909							

คำนวณจากสมการ $E = \sigma / \varepsilon$

☐	stress (MPa) = F\A
☐	strain (dimensionless) = dL\Lo
E	Young's modulus of elasticity (MPa)

เมื่อนำค่า F\A กับค่า dL\Lo มาสร้างกราฟจะได้ค่าความชันเท่ากับมอลดุลัสการอัด (Compressive modulus)



รูปที่ จ.1 กราฟ DMA ของโครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

จากนั้นนำค่าความชันที่เท่ากับมอดุลัสการอัดของแต่ละสภาวะมาหาค่าเฉลี่ยแสดงดังตาราง

	ไม่ผ่านการแช่สารใดๆ			ผ่านการแช่สารฆ่าเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล			ผ่านการแช่สารอาหารเลี้ยงเซลล์(DMEM)			
	CTS pure	DCPD	HAP	CTS pure	DCPD	HAP	CTS pure	DCPD	HAP	
ครั้งที่ 1	2.00E-10	5.00E-09	2.00E-09	4.00E-11	2.00E-08	2.00E-10	8.00E-12	6.00E-11	2.00E-12	
ครั้งที่ 2	2.00E-09	6.00E-09	3.00E-09	1.00E-10	5.00E-09	2.00E-10	6.00E-12	9.00E-11	3.00E-12	
ครั้งที่ 3	1.00E-10	6.00E-09	2.00E-09	2.00E-11	4.00E-09	3.00E-10	2.00E-12	8.00E-11	2.00E-12	
ครั้งที่ 4	7.00E-10	7.00E-09	1.00E-09	1.00E-10	5.00E-09	4.00E-10	4.00E-12	8.00E-11	2.00E-12	
ครั้งที่ 5	6.00E-10	8.00E-09	2.00E-09	9.00E-11	5.00E-09	2.00E-10	1.00E-12	7.00E-11	3.00E-12	
ค่าเฉลี่ย	7.20E-10	6.40E-09	2.00E-09	7.00E-11	7.80E-09	2.60E-10	4.20E-12	7.60E-11	2.40E-12	N/um^2
	1.00E+12	1.00E+12	1.00E+12	1.00E+12	1.00E+12	1.00E+12	1.00E+12	1.00E+12	1.00E+12	แปลงหน่วย
	7.20E+02	6.40E+03	2.00E+03	7.00E+01	7.80E+03	2.60E+02	4.20E+00	7.60E+01	2.40E+00	N/m^2

CTS pure หมายถึง โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน

DCPD หมายถึง โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์

HAP หมายถึง โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุเชิงประกอบไคโตซาน/ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต

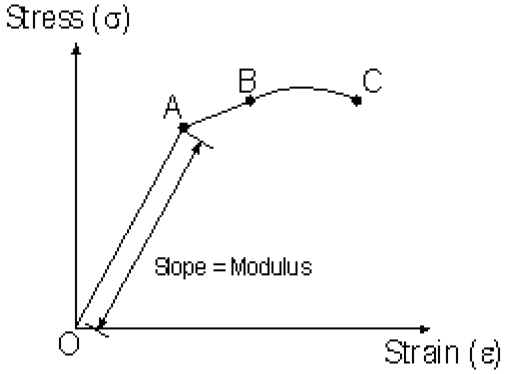
มอดุลัส

มอดุลัส หมายถึง ค่าอัตราส่วนระหว่างความเค้นและความเครียด ซึ่งนำไปใช้ได้ไม่ว่าจะเป็นความเครียดดึง ความเครียดอัด ความเค้นดึง และความเค้นอัด Thomas Young (ค.ศ. 1773 - 1829) มีผลงานทางฟิสิกส์มากมาย รวมทั้งการที่เขาค้นพบว่า "ภายในขีดสภาพยืดหยุ่น อัตราส่วนระหว่างความเค้นและความเครียดของวัตถุชนิดหนึ่ง ๆ จะมีค่าคงตัวเสมอ" เราพบว่า ความเครียดที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับความเค้น ทั้งนี้เมื่อขนาดของแรงดึงไม่เกินขีดจำกัดของการยืดหยุ่น จะสามารถเขียนความสัมพันธ์เป็นสมการคณิตศาสตร์ได้ว่า

$$E = \sigma / \varepsilon$$

เมื่อ σ (อ่านว่า rho) เป็นความเค้นตามยาว (ความเค้นดึง) มีหน่วยเป็นนิวตันต่อตารางเมตร (N/m^2) ε เป็นความเครียดตามยาว (ความเครียดดึง) ไม่มีหน่วย เพราะเป็นอัตราส่วนระหว่างความยาวที่เปลี่ยนไปกับความยาวเดิม และ E (อ่านว่า epsilon) เป็นค่าคงตัวของการแปรผันซึ่งเป็นค่าจำเพาะของวัสดุนั้น ๆ และเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ค่ามอดุลัสของยัง (Young' modulus)มอดุลัสของยังมีหน่วยเป็น นิวตันต่อตารางเมตร (N/m^2) วัตถุที่มีมอดุลัสของยังสูงแสดงว่าวัตถุนั้นทนต่อการเปลี่ยนแปลงความยาว หรือเปลี่ยนความยาวได้น้อยขณะที่มีความเค้นมาก การดึงทำให้วัสดุยืด ในขณะที่การอัดทำให้ความยาวหด การยืดและหดเป็นไปตามค่ามอดุลัสของยังค่าเดียวกัน นอกจากมอดุลัสของยังแล้ว ยังมีมอดุลัสประเภทอื่นอีก ได้แก่ มอดุลัสเฉือน (shear modulus) และมอดุลัสเชิงปริมาตร (bulk modulus) อีกด้วย มอดุลัสเชิงปริมาตร (bulk modulus) มีแนวคิดคล้ายกับมอดุลัสของยัง

เมื่อนำค่าความเค้นตามยาว (Stress) กับค่าความเครียดตามยาว (Strain) มาเขียนกราฟจะได้ความชันของกราฟคือค่ามอดุลัสความยืดหยุ่นของของแข็งดังกราฟ 2จ.



รูปที่ จ.2 กราฟการหาค่ามอดุลัสความยืดหยุ่นจากความชัน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวผกามาส ธนพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 7 พฤษภาคม พ.ศ.2525 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ สาขาวิชาปิโตรเคมีและวัสดุพอลิเมอร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2548 หลังจากนั้นจึงเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อภาคต้นปีการศึกษา 2549 และสำเร็จการศึกษาในภาคต้นของปีการศึกษา 2551 รวมระยะเวลาในการศึกษา 2 ปีครึ่ง