



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

โครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติไฟโบรอิน-แอลฟาไทรแคลเซียมฟอสเฟต
สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

THREE-DIMENSIONAL FIBROIN-ALPHA TRICALCIUM PHOSPHATE
COMPOSITE SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING

โดย

อาจารย์ทันตแพทย์วรเดช พิชัยอุตทกฤษฎ์
อาจารย์ทันตแพทย์หญิงวิริยา จุวัฒน์สำราญ

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

(ปีที่ได้รับทุน) 2554

ชื่อเรื่อง : โครงเลี้ยงเซลล์คอมโพลิตสามมิติไฟโบรอิน-แอลฟาโทรแคลเซียมฟอสเฟตสำหรับงาน
วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

ผู้วิจัย : วรเดช พิษขุคกฤษฎ์ และ วิริยา จูวัฒนสำราญ

สถาบัน : คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2559

สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์: มหาวิทยาลัยรังสิต จำนวนหน้างานวิจัย81.... หน้า

คำสำคัญ : โครงเลี้ยงเซลล์ ไฟโบรอิน แอลฟาโทรแคลเซียมฟอสเฟต

ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

รายงานการวิจัย เรื่อง โครงเลี้ยงเซลล์คอมโพลิตสามมิติไฟโบรอิน-แอลฟาโทรแคลเซียมฟอสเฟตสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการ มุ่งศึกษาให้ทราบถึงขนาดรูพรุน ร้อยละของรูพรุน ความหนาแน่น ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัส ค่าโมดูลัสแรงกด และปฏิกิริยาของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายและชะละลายอนุภาค โดยละลายไฟโบรอินที่สกัดจากไหมไทยสายพันธุ์ผสมระหว่าง นางน้อยศรีสะเกษ 1 และ ม. ในเฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและใช้น้ำตาลซูโครสที่มีขนาดอนุภาค 250-450 ไมโครเมตรเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน การเก็บรวบรวมข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างจำนวน 210 ชิ้น ซึ่งกลุ่มตัวอย่างประกอบด้วยโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP (SF) และโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (SF/TCP -4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16 ตามลำดับ)

ผลจากการวิจัย พบว่าค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่า 265.70 ± 67.45 ไมโครเมตร ส่วนค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 67.74 - 86.88 โดยที่พบว่ากลุ่ม SF/TCP-4 มีค่ามากที่สุด (85.12 ± 0.87) ส่วนค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ของกลุ่ม SF/TCP-12 มีค่ามากที่สุด ($16.53 \pm 4.93 \times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) ส่วนค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะชุ่มน้ำพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม เมื่อพิจารณาพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของกลุ่ม SF/TCP-8 มีค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดสูงสุด (64.84 ± 16.65 กิโลปาสกาล) ปริมาณแคลเซียมสูงสุด (0.87 ± 0.47 ร้อยละโดยมวล) และปริมาณฟอสฟอรัสสูงสุด (0.41 ± 0.29 ร้อยละโดยมวล) และค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มากที่สุดหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ($3.75 \pm 0.66 \times 10^4$ เซลล์)

Title: Three-dimensional fibroin-alpha tricalcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering.

Researcher: Woradej Pichaiakrit and Wiriya Juwattanasamran

Institution: Faculty of Dental Medicine, Rangsit University

Year of Publication: 2016

Publisher: Rangsit University

Sources: Rangsit University

No. of page:81..... page

Keyword: scaffold fibroin alpha-tricalcium phosphate

Copyright: Rangsit University

Abstract

The title of this research is three-dimensional fibroin-alpha tricalcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. The objective of this study was to assess the pore size, percentage of porosity, density, calcium and phosphorus contents, compressive modulus, and toxicity of scaffolds. The scaffolds were fabricated using a solvent casting and salt leaching technique. The hybrid strain of degummed Thai silk fibroin, Nangnoi Srisaket 1 x Mor, was dissolved in hexafluoroisopropanol at 16% (w/v) and sucrose (particle size 250-450 μm) was used as a porogen. The data was collected from 210 scaffolds which divided into 5 groups: silk fibroin scaffolds (SF) as a control group and silk fibroin that incorporated with alpha tricalcium phosphate (α -TCP) to produce 4, 8, 12, and 16 wt% (SF/TCP-4, SF/TCP-8, SF/TCP-12, and SF/TCP-16, respectively)

The result showed that the average pore size of the scaffolds was $265.70 \pm 67.45 \mu\text{m}$. The porosity of the scaffolds was in the range of 67.74 – 86.88% and the SF/TCP-4 presented the highest porosity ($85.12 \pm 0.87 \%$). The SF/TCP-12 showed the highest density in dry state ($16.53 \pm 4.93 \times 10^{-5} \text{ g/mm}^3$). Moreover, the density in wet state of scaffolds presented no different among group. The SF/TCP-8 exhibited the highest compressive modulus ($64.84 \pm 16.65 \text{ kPa}$), the highest calcium and phosphorus content ($0.87 \pm 0.47 \text{ weight } \%$ and $0.41 \pm 0.29 \text{ weight } \%$), and the number of cells at 120 hr ($3.75 \pm 0.66 \times 10^4$).

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ รศ.ดร.ทพ.ธีระศักดิ์ คำรุ่งเรือง อาจารย์ประจำภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ ผศ.ดร. โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ซึ่งทั้งสองท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัย นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.ดร.ทพญ.สมพร สวัสดิศรทรัพย์ ผู้อำนวยการศูนย์ทดสอบชีววัสดุ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิธีการเลี้ยงเซลล์และการทดสอบความเป็นพิษของชีววัสดุ และ ผศ.ดร.ทพ.นิยม ชำรงอนันต์สกุล อาจารย์ประจำภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการทดสอบสมบัติทางกลของชีววัสดุ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก ศูนย์วิจัยทันตวัสดุศาสตร์และศูนย์ทดสอบชีววัสดุ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต และนิสิตหลังปริญญา ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วรเดช พิชัยอุตกฤษฎ์

วิริยา จุวัฒน์สำราญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญแผนภูมิ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
สมมติฐานการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	31
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	34
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	35
การเก็บรวบรวมข้อมูล	37
การวิเคราะห์ข้อมูล	41
บทที่ 4 ผลการวิจัย	42
บทที่ 5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ	62
สรุปผลการวิจัย	62
อภิปรายผลการวิจัย	64
ข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก	78
ประวัติผู้วิจัย	

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบของไหมจากหนอนไหม <i>Bombyx mori</i>	9
2. เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลระหว่างไหมจากหนอนไหมและจากแมงมุมกับชีววัสดุที่มีลักษณะเป็นเส้นใยชนิดต่างๆ และเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของร่างกาย	14
3. ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และ ค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์	42
4. ค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์	45
5. ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของ โครงเลี้ยงเซลล์	46
6. ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งในสภาวะแห้งและสภาวะชุ่มน้ำ	47
7. ค่าเฉลี่ยปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสใน โครงเลี้ยงเซลล์	49
8. ค่าเฉลี่ย โมดูลัสแรงกดของ โครงเลี้ยงเซลล์	51
9. ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มตามระยะเวลาเพาะเลี้ยง	54

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. เส้นไหมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	11
2. โครงสร้างปฐมภูมิของไฟโบรอิน	12
3. โครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอิน	12
4. ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยูนิตของ α -TCP	25
5. ลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ที่กำลังขยาย 35 เท่า	44
6. ประเภทของแร่ธาตุที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์จากกล้อง SEM/EDX	50
7. เซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ ชนิดหัวกลับที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	52
8. ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 6,000 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง	56
9. ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 1,500 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	57
10. ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 700 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	58
11. ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 3,000 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	59
12. ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 700 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง	60
13. ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 3,000 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง	61

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์	43
2. กราฟแท่งเปรียบเทียบระหว่างความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งในสถานะแห้งและชุ่มน้ำ	48
3. กราฟเส้นตรงที่ได้จากการวัดจำนวนเซลล์ในสารละลายมาตรฐาน	53
4. กราฟแท่งเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง	55



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันกระดูกที่เกิดการแตกหักหรือมีความพิการ (defect) ส่วนใหญ่ได้รับการรักษาด้วยกระดูกปลูกถ่าย (bone graft) ทดแทนเพื่อบูรณะการทำหน้าที่ให้กลับมาดังเดิม โดยกระดูกที่นำไปใช้ในการบูรณะนั้นอาจเป็นเนื้อเยื่อปลูกถ่ายอัตพันธุ์ (autograft) เนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันธุ์ (allograft) หรือ เนื้อเยื่อปลูกถ่ายวิวิธพันธุ์ (xenograft) ซึ่งเนื้อเยื่อปลูกถ่ายแต่ละชนิดนั้นมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันออกไป เช่น เนื้อเยื่อปลูกถ่ายอัตพันธุ์ได้รับการพิจารณาเป็นมาตรฐานของการรักษา เนื่องจากมีข้อดีคือเป็นการนำกระดูกมาจากตัวของผู้ป่วยเองจึงไม่มีปฏิกิริยาการต่อต้านจากร่างกาย ซึ่งส่วนใหญ่นำมาจากบริเวณสันปีกกระดูกสะโพก (iliac crest) แต่ข้อเสียคือผู้ป่วยต้องได้รับการผ่าตัดอีกตำแหน่งหนึ่งเพื่อนำกระดูกมา ส่วนเนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันธุ์นั้นนำกระดูกมาจากบุคคลอื่น ซึ่งมีข้อดีคือผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดในอีกตำแหน่งหนึ่ง แต่มีข้อเสียคือผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อปฏิกิริยาของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอม (foreign body reaction) และการติดต่อของโรค ในขณะที่เนื้อเยื่อปลูกถ่ายวิวิธพันธุ์นั้น กระดูกที่นำมาปลูกถ่ายได้มาจากสัตว์ เช่น วัว และหมู ซึ่งมีข้อเสียคือผู้ป่วยเสี่ยงต่อการปฏิเสธเนื้อเยื่อปลูกถ่าย (reject graft) หรือติดโรคจากสัตว์ได้ เป็นต้น จากข้อจำกัดต่างๆ ของการปลูกถ่ายกระดูกส่งผลให้เกิดการพัฒนาและค้นคว้าวิธีการรักษาแบบใหม่ขึ้น ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นวิธีการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ โดยอาศัยชีววัสดุ (biomaterial) ปัจจัยกระตุ้นการเติบโต (growth factor) และเซลล์ ซึ่งชีววัสดุที่นำมาใช้นั้นควรมีลักษณะเป็นโครงสามมิติ (scaffold) ที่มีรูพรุน เพื่อให้เกิดการยึดติด (adhesion) ของเซลล์ และสร้างสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) ของเซลล์ จนกระทั่งเกิดสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาพร้อมกับการสลายตัวของโครงสามมิติซึ่งจากบทบาทของโครงสามมิติที่กล่าวมานั้นอาจทำให้โครงสามมิติถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นจึงมีการนำหลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ในการบูรณะกระดูกที่แตกหัก ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกนั้นควรมีลักษณะทางเคมี กายวิภาคศาสตร์ (morphology) และ โครงสร้างที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการยึดติดของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และออสติโอโปรเจนิเตอร์ เซลล์ (osteoprogenitor cell) การย้ายที่ (migration) การเปลี่ยนแปลงสภาพ และการสังเคราะห์เมทริกซ์กระดูก (bone matrix) ขึ้นมาใหม่

ชีววัสดุที่สามารถนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้นั้นแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทได้แก่พอลิเมอร์ (polymer) เซรามิก (ceramic) และ คอมโพสิต (composite) ซึ่งพอลิเมอร์สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น พอลิเมอร์จากธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable

synthetic polymer) ในขณะที่เซรามิกแบ่งออกได้เป็น ไบโอแอคทีฟ เซรามิก (bioactive ceramic) และ กลาส-เซรามิก (glass-ceramic) ส่วนชีววัสดุประเภทคอมโพสิตนั้นเกิดจากชีววัสดุ 2 ประเภทมารวมกัน เพื่อปรับปรุงสมบัติของชีววัสดุให้ดีขึ้น

ไหมเป็นโปรตีนเส้นใยในธรรมชาติ ซึ่งได้มาจากรังไหมของหนอนไหมพันธุ์ *Bombyx mori* (*B. mori*) และแมงมุมพันธุ์ *Nephila clavipes* และ *Araneus diadematus* เนื่องจากไหมที่ได้จากหนอนไหมมีสมบัติด้านความตึงเชิงกลที่ดีจึงนำมาทำเป็นไหมเย็บแผลและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอานหลายศตวรรษในขณะที่ไหมจากแมงมุมไม่มีการนำมาใช้ในทางชีววิทยาการแพทย์ ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณผลผลิตของไหมที่ได้มีน้อยกว่า เหตุผลที่เลือกไหมจากหนอนไหมมาใช้ในการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องมาจากสมบัติของไหมจากหนอนไหมมีความเหมาะสมในการใช้เป็นชีววัสดุในการทำโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งได้แก่ มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นสามารถในการให้น้ำและออกซิเจนซึมผ่านได้ สามารถทำให้อยู่ในรูปฟองน้ำ เส้นใย หรือแผ่นเยื่อบาง (membrane) ได้ มีความเข้ากันทางชีวภาพ (biocompatibility) อัตราการสลายตัวสอดคล้องไปกับอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ หาได้ง่ายและราคาไม่แพง

เส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม *B. mori* มีองค์ประกอบของโปรตีนหลักๆ อยู่ 2 ชนิด คือ ไฟโบรอิน (fibroin) และเซอริซิน (sericin) โดยที่ไฟโบรอินประกอบไปด้วยผลึกของแผ่นบีตา (β -sheet) ที่จัดเรียงตัวกันอยู่อย่างเป็นระเบียบ ซึ่งมีประโยชน์หลายอย่างในแง่การนำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับการวิศวกรรมเนื้อเยื่อเช่น สามารถนำมาออกแบบเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้หลายประเภทเพื่อเป็นโครงสร้างที่รองรับในร่างกายเช่น กระดูก เอ็น หลอดเลือด กระดูกอ่อน เป็นต้น โดยมีสมบัติเชิงกล (mechanical property) และปฏิกิริยาทางชีวที่ที่เหมาะสม ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการนำไปสู่ความสำเร็จในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในขณะที่เซอริซินเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ดังนั้น ก่อนนำไหมมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ควรทำการกำจัดเซอริซินออกก่อนเพื่อลดอาการแพ้ที่จะเกิดขึ้น

อัลฟาไทรแคลเซียมฟอสเฟต (α -tricalcium phosphate: α -TCP) มีลักษณะเป็นผงละเอียดของแคลเซียมฟอสเฟต ซิเมนต์ ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทางทันตแพทยศาสตร์ ศัลยศาสตร์ใบหน้าและขากรรไกร และออร์โทพีดิกส์ (orthopaedic) สำหรับการซ่อมแซมและการปรับรูป (remodel) กระดูกซึ่งจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo) พบว่า α -TCP มีสมบัติทางชีวภาพหลายประการ เช่น กระตุ้นทำให้เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้น และช่วยส่งเสริมกระบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis) โดยช่วยเพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen) และการมีแคลเซียมเกาะ (calcification) ของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix)

ดังนั้นจึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้เพื่อสร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนซึ่งทำจากไฟโบรอินที่สกัดจากไหมไทยที่มีการเติม α -TCPเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนซึ่งทำจากไฟโบรอินที่สกัดจากไหมไทยสายพันธุ์ผสมระหว่าง นางน้อยศรีสะเกษ 1 และ ม.ที่มีการเติม α -TCP ด้วยวิธีการขึ้นรูปด้วยตัวทำละลายและชะละลายอนุภาค (solvent casting and particulate leaching: SC/PL)

2. ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติทางกายภาพ (physical properties) ของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุน ซึ่งได้แก่ ขนาดรูพรุน ค่าร้อยละรูพรุน ความหนาแน่น และ ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัส

3. ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติเชิงกล (mechanical properties) ของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนซึ่งได้แก่ค่าโมดูลัสแรงกด (compressive modulus)

4. ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติเชิงชีววิทยา (biological properties) ของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนซึ่งได้แก่ปฏิกิริยาของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ และการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ที่ 6 24 72 และ 120 ชั่วโมง

สมมติฐานการวิจัย

1. ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ไม่แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP

2. ร้อยละของรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ไม่แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP

3. ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP

4. ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP

5. ค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP

6. ปฏิกิริยาของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP

7. การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ที่ 6 24 72 และ 120 ชั่วโมงของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP แตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP

ขอบเขตของการวิจัย

ด้านเนื้อหา เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุน โดยใช้โปรตีนไฟโบรอินจากไหมไทยและมีการเติม α -TCP ลงไปในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากนั้นจึงนำมาศึกษาเกี่ยวกับสมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงกล และสมบัติเชิงชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุน

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง โครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนจำนวน 210 ชิ้น

ระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย มีนาคม พ.ศ. 2555 - กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559

กรอบแนวคิดในการวิจัย

สร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนโดยใช้พอลิเมอร์จากธรรมชาติผสมกับเซรามิก ด้วยวิธีขึ้นรูปด้วยตัวทำละลายและชะละลายอนุภาคจากนั้นนำมาศึกษาสมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงกล และสมบัติเชิงชีววิทยา เพื่อนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้โครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนที่ผลิตได้ในประเทศ เพื่อลดการนำเข้าโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง
2. เป็นพื้นฐานในการพัฒนานำไปใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการสร้างกระดูกในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นสหสาขาวิชาที่รวมเอาศาสตร์หลายแขนงเข้าไว้ด้วยกัน ซึ่งได้แก่ เคมี ชีววิทยา ฟิสิกส์ พันธุศาสตร์ เภสัชศาสตร์ แพทยศาสตร์ และวิศวกรรมศาสตร์ เพื่อนำมาสร้างชีวิตจากวัสดุที่มาจากธรรมชาติหรือจากวัสดุสังเคราะห์ เพื่อนำมาใช้ทดแทนเนื้อเยื่อและอวัยวะที่ถูกทำลาย หรือมีข้อบกพร่อง (Arca and Senel, 2008) ในขณะที่ Langer and Vacanti (1993) ได้กล่าวว่าวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นการรวมหลักการทางวิทยาศาสตร์สุขภาพและวิศวกรรมศาสตร์เข้าไว้ด้วยกัน เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างหน้าที่และโครงสร้างของเนื้อเยื่อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และเพื่อพัฒนาสิ่งทดแทนทางชีวภาพเพื่อนำมาบูรณะ คงสภาพ หรือ ปรับปรุงการทำหน้าที่ของเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนโดยทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน เริ่มจากการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมและมีความเข้ากันทางชีวภาพ จากนั้นใส่เซลล์ ปัจจัยกระตุ้นการเติบโต และปัจจัยการเปลี่ยนสภาพ เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ส่งผลให้เซลล์ยึดเกาะกับโครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเกิดการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนสภาพ จากการกระตุ้นและการชักนำของโครงเลี้ยงเซลล์ จนเกิดเป็นชิ้นส่วนเนื้อเยื่อและทำการฝังเนื้อเยื่อที่สร้างได้นั้นในสิ่งมีชีวิต เพื่อให้เกิดการเติบโตและการปรับตัวของเนื้อเยื่อที่ฝังเข้าไป พร้อมกับกับการสลายตัวหรือการละลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์

การพัฒนาอย่างมีประสิทธิภาพของวิศวกรรมเนื้อเยื่อส่งผลให้เกิดการสร้างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อทดแทนและกลยุทธ์การดำเนินงานใหม่ๆ ขึ้น โดยอาศัยความก้าวหน้าทางด้านชีววัสดุ เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ปัจจัยกระตุ้นการเติบโต ปัจจัยการเปลี่ยนสภาพ และสิ่งแวดล้อมที่ลอกเลียนแบบลักษณะทางชีวภาพ (biomimetic) ที่ถูกสร้างขึ้นมาอย่างจำเพาะ

โครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นโครงร่างให้เซลล์เกิดการยึดเกาะในระยะเริ่มต้น แล้วเกิดการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และยังทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ที่ลอกเลียนแบบสภาพแวดล้อมให้ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อที่ต้องการจะสร้าง ขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเสริมสร้างความมั่นคงทางโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

ลักษณะสมบัติของ โครงเลี้ยงเซลล์ในอุคมคติ (Hutmacher, 2007; Liu, Xia, and Czernuszka, 2007)

1. รูปร่าง 3 มิติ ที่มีขนาดรูพรุนที่เหมาะสมและเชื่อมต่อกันอย่างทั่วถึง ส่งผลให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่เข้ามา ยึดเกาะ และเพิ่มจำนวนภายใน โครงเลี้ยงเซลล์ และส่งผลให้ออกซิเจนและสารอาหารสามารถลงไปหล่อเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ภายใน โครงเลี้ยงเซลล์ และถ่ายเทของเสียออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ได้ง่าย

2. สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยที่สามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพให้ใกล้เคียงกับอัตราการสร้างและการเติบโตของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่

3. มีความเข้ากันทางชีวภาพ ส่งผลให้เกิดการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์และไม่เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ฝังเข้าไป

4. โครงเลี้ยงเซลล์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายของ โครงเลี้ยงเซลล์ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่

5. มีพื้นผิวที่เหมาะสมสำหรับการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์

6. ขั้นตอนการผลิต ไม่ยุ่งยากซับซ้อน เพื่อให้ได้รูปร่างและขนาดที่หลากหลายและเหมาะสม

7. มีสมบัติทางกลที่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อในบริเวณที่จะทำการฝังเพื่อคงสภาพของโครงสร้างและหน้าที่ของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากฝังและระหว่างการสร้างเนื้อเยื่อ

ชีววัสดุสำหรับการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์

การเลือกวัสดุเพื่อนำมาใช้เป็นชีววัสดุควรคำนึงถึงสมบัติของวัสดุนั้นก่อน เช่น สมบัติทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการละลาย รูปร่างและโครงสร้าง การชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือการไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ความลื่น พลังงานพื้นผิว (surface energy) การย่อยสลาย (degradation) จากการดูดซึมน้ำ (water absorption) และกลไกการสึกกร่อน (erosion) ซึ่งวัสดุประเภทพอลิเมอร์ได้รับความสนใจนำมาใช้เป็นชีววัสดุสำหรับสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากมีสมบัติเฉพาะตัวของพอลิเมอร์แต่ละชนิด ส่งผลให้พอลิเมอร์แต่ละชนิดมีข้อดีที่แตกต่างกันออกไป เช่น ความเข้ากันทางชีวภาพ สมบัติทางเคมี และสมบัติต่างๆ ด้านชีววิทยา ซึ่งล้วนเป็นสิ่งสำคัญในการนำพอลิเมอร์มาประยุกต์ใช้กับวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการทดแทนอวัยวะที่สูญเสียไป

ในปัจจุบันชีววัสดุที่สามารถนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้นั้นแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ พอลิเมอร์ เซรามิก และ คอมโพสิต ซึ่งพอลิเมอร์ยังสามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น พอลิเมอร์จากธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ในขณะที่เซรามิก แบ่งออกได้เป็น ไบโอแอคทีฟ เซรามิกและกลาส-เซรามิก ส่วนชีววัสดุประเภทคอมโพสิตนั้นเกิดจากชีววัสดุ 2 ประเภทมารวมกัน เพื่อปรับปรุงสมบัติของชีววัสดุให้ดีขึ้น

1. พอลิเมอร์จากธรรมชาติ (Dhandayuthapani et al., 2011)

พอลิเมอร์จากธรรมชาติเป็นชีววัสดุที่มีความสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และเป็นชีววัสดุชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้ทางคลินิก เนื่องจาก ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงช่วยส่งเสริมการทำหน้าที่ของเซลล์ได้ ซึ่งพอลิเมอร์จากธรรมชาติสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เช่น เซลลูโลส (cellulose) ไคติน (chitin) และ ไกลโคซามิโนไกลแคนส์ (glycosaminoglycans) เป็นต้น พอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) และ โปรตีน เช่น คอลลาเจน ไคโทซาน(chitosan) และ ไหมจากหนอนไหม

2. พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Dhandayuthapani et al., 2011)

พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้เป็นพอลิเมอร์ที่ได้รับความนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เนื่องจากสมบัติบางประการ เช่น ความพรุน (porosity) ระยะเวลาของการย่อยสลาย และสมบัติเชิงกล ส่งผลให้สามารถสร้างรูปร่างที่มีลักษณะจำเพาะได้ ซึ่งข้อดีของพอลิเมอร์ประเภทนี้คือ ราคาถูกกว่าพอลิเมอร์จากธรรมชาติ สามารถผลิตได้ปริมาณมากในรูปแบบที่เหมือนเดิม โดยที่สมบัติเชิงกลและสมบัติทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง และมีอายุการใช้งานนาน ส่วนข้อเสียเช่น ผลผลิตพลอยได้ (by-product) จากการย่อยสลายเป็นกรด ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบขึ้นได้ ตัวอย่างของพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น พอลิแลคติก แอซิด (polylactic acid: PLA), พอลิไกลโกลิก แอซิด (polyglycolic acid: PGA, และ พอลิคาโพรแลคโตน (polycaprolactone: PCL)

3. เซรามิก (Dhandayuthapani et al., 2011)

เซรามิกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ เซรามิก เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite: HA) ไทแรคเคลเซียมฟอสเฟตและกลาสที่มีส่วนประกอบของซิลิเกต (silicate) และ ฟอสเฟตหรือที่เรียกว่า ไฮดรอกซีอะพาไทต์ กลาส (bioactive glass) ส่วนอีกชนิดหนึ่งคือกลาส-เซรามิก เช่น อะพาไทต์-วูลลาสโตไนต์ (wollastonite) เซรามิกจะเกิดปฏิกิริยากับของเหลวในร่างกาย ทำให้เกิดแรงยึดกับเนื้อเยื่อแข็ง อย่างไรก็ตาม ความเข้ากันทางชีวภาพและการย่อยสลายทางชีวภาพของเซรามิกยังไม่เพียงพอ จึงทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำมาใช้ทางคลินิก

4. คอมโพสิต

ชีววัสดุประเภทคอมโพสิตได้รับความนิยมมากขึ้นการนำมาสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากสามารถแก้ไขข้อบกพร่องของชีววัสดุแต่ละชนิดได้ ทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสมบัติต่างๆ ตามต้องการ เช่น เพิ่มการยึดเกาะของเซลล์ เพิ่มสมบัติเชิงกล ควบคุมการย่อยสลาย และปรับปรุงความ

เข้ากันได้ทางชีวภาพ ซึ่งชีววัสดุประเภทนี้อาจเกิดจากการผสมกันระหว่างพอลิเมอร์จากธรรมชาติและเซรามิก เช่น การเติมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite nanoparticle) ลงไปในไฟโบรอินจากไหม พบว่าการเติมที่ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติเชิงกลดีที่สุด และไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก (Kim et al., 2014)

การผสมกันระหว่างพอลิเมอร์จากธรรมชาติ 2 ชนิด เช่น การผสมไคโทซานกับไฟโบรอินจากไหม พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการดูดซับน้ำและสมบัติเชิงกลดีขึ้น และเซลล์สร้างกระดูกอ่อน (chondrocyte) มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินจากไหมเพียงอย่างเดียว (Ruan et al., 2011) หรือเกิดจากการผสมระหว่างพอลิเมอร์จากธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น การนำไฟโบรอินจากไหมมาปั่นรวมกับคาร์บอกซีเอทิล ไคโทซาน (carboxyethyl chitosan) และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (poly vinyl alcohol) แล้วนำมาสร้างเป็นแผ่นเยื่อบางคอมโพสิตนาโนไฟบรัส (composite nanofibrous membrane) ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นที่แต่งแผล (dressing) สำหรับการเจริญทดแทนของผิวหนัง (skin regeneration) ได้ (Zhou et al., 2013)

ไหม

ไหมจัดเป็นสิ่งคัดหลั่งไฟบรัส โปรตีน (fibrous protein secretion) ชนิดหนึ่งที่ถูกพ่นออกมาจากสัตว์ที่อยู่ในชั้น (class) Arachnida เช่น แมงมุม และแมงป่อง และจากสัตว์ที่อยู่ในชั้น Insecta อันดับ (order) Lepidoptera ซึ่งได้แก่ ผีเสื้อกลางวัน และ ผีเสื้อกลางคืน ซึ่งโปรตีนไหมสร้างจากเซลล์เยื่อบุผิวชนิดพิเศษ (specialized epithelial cells) ของต่อมที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนไหมโดยเฉพาะ ซึ่งหลังจากสังเคราะห์โปรตีนไหมเสร็จแล้ว โปรตีนไหมจะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์เพื่อเข้าไปเก็บในช่องภายในหลอด (lumen) ของต่อมดังกล่าวก่อนที่จะพ่นออกมาเป็นเส้นใย

ไหมแต่ละชนิดนั้นมีส่วนประกอบ โครงสร้างและสมบัติที่แตกต่างกันออกไป ขึ้น โดยอยู่กับแหล่งที่มาของไหมซึ่งไหมที่ได้รับความนิยมนำมาใช้มากที่สุดเป็นไหมที่ได้จากหนอนไหมสายพันธุ์ *B. mori* และแมงมุมสายพันธุ์ *Nephila clavipes* และ *Araneus diadematus* แต่เนื่องจากไหมจากแมงมุมซึ่งได้มาจากใยแมงมุมนั้นไม่สามารถม้วนหรือปั่นให้เป็นไหมเส้นเดี่ยวๆ ได้เหมือนไหมจากรังไหมของหนอนไหมจึงส่งผลให้ไม่ได้รับความนิยมมากเท่ากับไหมจากหนอนไหม

ไหมจากหนอนไหม (Mondal, Triedy, and Kumar, 2007)

ไหมจากหนอนไหมสายพันธุ์ *B. mori* ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและทางการแพทย์มาเป็นเวลานาน โปรตีนไหมถูกสังเคราะห์ในต่อมที่อยู่ด้านข้างทั้งสองข้างใต้ช่องอาหาร (alimentary canal) ซึ่งต่อมแบ่งออกได้เป็น 3 บริเวณตามหน้าที่และกายวิธานวิทยา ได้แก่ ต่อมส่วนหลัง ต่อมส่วนกลาง และต่อมส่วนหน้า โดยที่ต่อมส่วนหลังมีความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ประกอบไปด้วย

เซลล์สร้างสิ่งคัดหลั่ง (secretary cell) ประมาณ 500 เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไฟโบรอิน ในขณะที่ต่อมส่วนกลางมีความยาวประมาณ 7 เซนติเมตร ประกอบไปด้วยเซลล์สร้างสิ่งคัดหลั่ง ประมาณ 300 เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเซอริซินและเป็นที่เก็บโปรตีนใหม่ก่อนที่จะพ่นออกมาภายนอก ส่วนต่อมส่วนหน้ามีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นท่อต่างๆ ที่ประกอบด้วยเซลล์ จำนวน 250 เซลล์ ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน

ส่วนประกอบ (Mondal, Triyedy, and Kumar, 2007)

ไหมจากหนอนไหม *B. mori* ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 2 ชนิดที่มีสมบัติทางชีววิทยาและสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical) แตกต่างกันได้แก่ ไฟโบรอิน และเซอริซิน นอกจากนี้ยังประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไขผึ้ง (wax) เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) และ สารสี (pigment) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของไหมจากหนอนไหม *B. mori* (Mondal, Triyedy, and Kumar, 2007)

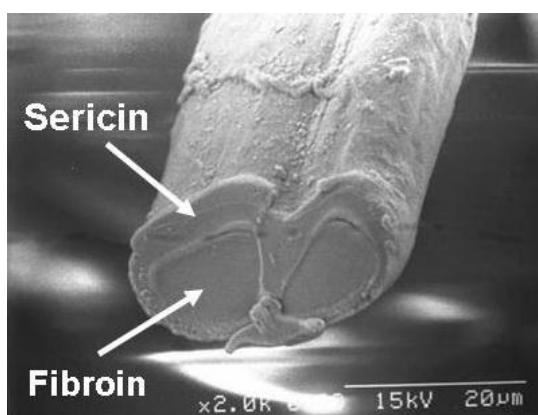
ส่วนประกอบ	ร้อยละ
ไฟโบรอิน	70-80
เซอริซิน	20-30
คาร์โบไฮเดรต	1.2-1.6
ไขผึ้ง	0.4-0.8
เกลืออนินทรีย์	0.7
สารสี	0.2

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนของเส้นใยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 ไมโครเมตร ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ โปรตีนสายยาว (heavy chain) โปรตีนสายสั้น (light chain) และ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) P25 ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 350, 26 (Yamaguchi et al., 1989) และ 30 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ (Tanaka, Inoue, and Mizuno, 1999a) ซึ่งจากการทำ quantitative enzyme-linked immunosorbent assay พบว่าโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้มีอยู่ในอัตราส่วนโมลาร์ (molar ratio) เท่ากับ 6:6:1 (Inoue et al., 2000) ซึ่งโปรตีนสายยาวและสายสั้นเชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยวไดซัลไฟด์ (single disulfide bond) โดยเชื่อมระหว่าง Cys-c20 ซึ่งเป็นหมู่ไทโธล (thiol group) ของกรดอะมิโนซิสทีน (cysteine) ที่อยู่ส่วนที่เหลือตำแหน่งที่ 20 (20th residue) จากปลายสายหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl terminus) ของโปรตีนสายยาว และ Cys-172 ซึ่งเป็นหมู่ไทโธลของกรดอะมิโนซิสทีนในตำแหน่งที่ 172

ของโปรตีนสายสั้น (Tanaka et al., 1999b) โดยที่โปรตีนสายสั้นทำหน้าที่ในการป้องกันโปรตีนสายยาวไม่ให้ยัดติดในเอ็นโดพลาสมิก เรติคิวลัม (endoplasmid reticulum) โดยการสร้างพันธะไคซัลไฟด์เชื่อมกับ Cys-c20 ของโปรตีนสายยาว

ไกลโคโปรตีน P25 ทำหน้าที่ในการคงสภาพโครงสร้างของหน่วยพื้นฐาน (elementary unit) ที่ประกอบด้วยไดเมอร์ (dimer) ของโปรตีนสายยาวและสายสั้นจำนวน 6 หน่วย ซึ่ง Inoue et al. (2000) ได้เสนอรูปแบบการรวมตัวกันของหน่วยพื้นฐานของไฟโบรอินในต่อมส่วนหลัง และการขนส่งและการหลั่งภายในเซลล์ของหน่วยพื้นฐาน ดังนี้ โปรตีนสายยาวสร้างพันธะไคซัลไฟด์กับโปรตีนสายสั้นทันทีหลังจากออกมาจากเอ็นโดพลาสมิก เรติคิวลัม จากนั้นไดเมอร์ของโปรตีนสายยาวและสายสั้นจำนวน 6 หน่วยจะรวมตัวกับไกลโคโปรตีน P25 โดยผ่านทางปฏิกิริยาไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และพันธะไฮโดรเจนระหว่างไกลโคโปรตีน P25 และโปรตีนสายยาว ส่งผลให้เกิดการสร้างหน่วยพื้นฐานของไฟโบรอินขึ้น จากนั้นจะถูกหลั่งเข้ามาในต่อมส่วนหลังและถูกพ่นออกมาเป็นเส้นใยที่ต่อมส่วนหน้า

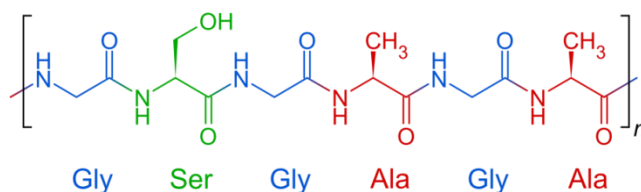
เซอรีซินเป็นโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกาว (glue-like protein) มีมวลโมเลกุล 20-310 กิโลดาลตันและมีสมบัติชอบน้ำมีปริมาณอยู่ร้อยละ 25-30 ของเส้นไหมทำหน้าที่ประสานและห่อหุ้มไฟโบรอิน 2 เส้นเข้าไว้ด้วยกัน ดังภาพที่ 1 ทำให้ไหมมีสมบัติเหนียวและยึดได้น้อย (Vepari and Kaplan, 2007) เซอรีซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ซึ่งร้อยละ 70 เป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว เนื่องจากมีโซ่ข้าง (side chain) เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) และหมู่คาร์บอกซิล จึงส่งผลให้เซอรีซินมีสมบัติชอบน้ำ โดยที่กรดอะมิโนที่พบมากในเซอรีซินคือ เซอรีน (serine) และแอสพาทิก แอซิด (aspartic acid) ซึ่งมีปริมาณมากถึงร้อยละ 33.4 และ 16.7 ตามลำดับ (Aramwit, Siritientong, and Srichana, 2012) นอกจากนี้เซอรีซินยังเป็นโปรตีนที่เป็นสาเหตุของปัญหาอันไม่พึงประสงค์เกี่ยวกับความเข้ากันทางชีวภาพและภาวะภูมิแพ้ไวเกินประเภทที่ 1 (Type I hypersensitivity) ของไหม



ภาพที่ 1 เส้นไหมเมื่อตัดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) แสดงให้เห็นว่าไหมประกอบด้วยไฟโบรอินจำนวน 2 เส้นที่ถูกห่อหุ้มด้วยเซอริซิน (<http://www.la-soie.appspot.com/images/cocoon.jpg>)

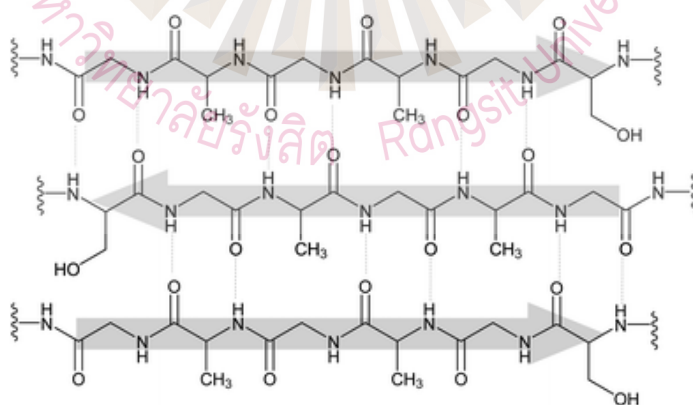
โครงสร้าง

ไฟโบรอินของไหมจากหนอนไหมพันธุ์ *B. mori* ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโน ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) และเซอริน ในอัตราส่วนร้อยละ 43, 30 และ 12 ตามลำดับ (Vepari and Kaplan, 2007) โดยโปรตีนสายยาวประกอบด้วยบริเวณที่มีความเป็นผลึกประมาณ 2 ใน 3 และถูกแทรกด้วยบริเวณที่มีลักษณะอสัณฐาน (amorphous) (Cao and Wang, 2009) โดยโดเมน (domain) ส่วนที่เป็นผลึกนั้นมีอยู่ 12 โดเมน ซึ่งแต่ละโดเมนประกอบไปด้วยกรดอะมิโน Gly-X ที่เรียงตัวซ้ำๆ กัน โดยที่ X อาจเป็นได้ทั้งอะลานีน เซอริน ทรีโอนีน (threonine) และวาเลีน (valine) และในแต่ละโดเมนของบริเวณผลึกนั้นประกอบด้วยโดเมนย่อย (sub-domain) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ชนิดเรียงตัวกันเพื่อสร้างเป็นโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของไฟโบรอินซึ่งอาจจะเป็น GAGAGS GAGAGY GAGAGA หรือ GAGYGA โดยที่ G A S และ Y คือ ไกลซีน อะลานีน เซอริน และ ไทโรซีน (tyrosine) ตามลำดับ ดังภาพที่ 2 โดยบริเวณปลายสุดของโดเมนย่อยเหล่านี้มีลักษณะเป็นเทตระเปปไทด์ (tetrapeptide) เช่น GAAS หรือ GAGS เป็นต้น ส่วนบริเวณที่มีความเป็นผลึกน้อยกว่านั้นประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนที่ไม่ซ้ำกัน (non-repetitive sequence) โดยที่กรดอะมิโนเหล่านี้เป็นกรดอะมิโนชนิดมีขั้วที่ไม่สามารถพบได้ในบริเวณผลึก (Zhou et al., 2001)



ภาพที่ 2 โครงสร้างปฐมภูมิของไฟโบรอินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงตัวซ้ำกันเป็นบล็อก (block) (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3f/Silk_fibroin_primary_structure.svg/2000px-Silk_fibroin_primary_structure.svg.png)

การเรียงตัวของกรดอะมิโนในลำดับปฐมภูมิ (primary sequence) ของโปรตีนไฟโบรอิน ส่งผลให้ไฟโบรอินมีสมบัติไม่ชอบน้ำที่มีการเรียงตัวของพอลิเมอร์เป็นบล็อก ซึ่งประกอบไปด้วยบล็อกส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่มีกรดอะมิโนโซ่ข้างสายสั้น เช่น ไกลซีนและอะลานีน และบล็อกส่วนที่ชอบน้ำที่มีกรดอะมิโนโซ่ข้างสายยาวและกรดอะมิโนชนิดมีขั้วโดยทั่วไปแล้วโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของไฟโบรอินมี 2 ลักษณะได้แก่ลักษณะขดเป็นวงอย่างสุ่ม (random coil) และอสัณฐาน และลักษณะแผ่นพับบีต้าแบบสวนขนาน (antiparallel β plate sheet) ซึ่งลักษณะแรกนั้นเกิดจากโดเมนส่วนที่ไม่ชอบน้ำเชื่อมกันด้วยโซ่สั้น เกิดเป็นส่วนอสัณฐานขึ้นและส่งผลให้ไหมมีความยืดหยุ่นในขณะที่ลักษณะแบบหลังนั้นเกิดจากโดเมนส่วนที่ไม่ชอบน้ำเกิดการรวมตัวกันเป็นผลึกนาโน (nano-crystal) ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายเปปไทด์ข้างเคียง (Cao and Wang, 2009) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินที่มีลักษณะเป็นแผ่นพับบีต้าแบบสวนขนานที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายเปปไทด์

(<http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2009/JM/b905802h/b905802h-fl.gif>)

ลักษณะพื้นฐานของไหม (Vepari and Kaplan, 2007)

ไหมจากหนอนไหมพันธุ์ *B. mori* มีสถานะอยู่ 3 รูปแบบได้แก่ silk I เป็นไหมที่อยู่ภายในต่อม (glandular state) ก่อนการตกผลึก (crystallization) มีโครงสร้างที่ละลายน้ำได้ และสามารถเปลี่ยนเป็นโครงสร้างเป็น silk II ได้เมื่อได้รับความร้อน การปั่นทางกายภาพ หรือ การแช่ในเมทานอล (methanol) หรือ โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) ส่วนลักษณะพื้นฐานของไหมแบบที่ 2 คือ silk II เป็นไหมในสภาวะปั่นแล้ว (spun silk state) ประกอบด้วยโครงสร้างทุติยภูมิที่เป็นแผ่นบีต้า ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่สมมาตร เนื่องจากที่ปลายด้านหนึ่งเป็นโซ่ข้างไฮโดรเจนของกรดอะมิโนไกลซีน ในขณะที่อีกปลายด้านหนึ่งเป็นโซ่ข้างเมทิลของกรดอะมิโนอะลานีน ที่อยู่ในโดเมนไม่ชอบน้ำ

การจัดเรียงตัวเป็นแผ่นบีต้าเกิดจากหมู่เมทิลและหมู่ไฮโดรเจนของแผ่นตรงข้ามเกิดพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) ขึ้น ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีความเสถียร (stable) ทางอุณหพลวัต (thermodynamic) โดยที่ระหว่างกรดอะมิโนที่เรียงตัวตั้งฉากกับแกนของสายโซ่และเส้นใยนั้นจะเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งแบบระหว่างสายโซ่ (inter-chain) และภายในสายโซ่ (intra-chain) ขึ้น จึงส่งผลให้โครงสร้างของ silk II เป็นส่วนที่กั้นน้ำและไม่ละลายในตัวทำละลายหลายชนิดทั้งกรดและด่างอ่อน ส่วนลักษณะพื้นฐานของไหมแบบที่ 3 เรียกว่า silk III เป็น air/water assembled interfacial silk ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเกลียว (helical structure)

ลักษณะสมบัติทางเคมี

ไหมมีสมบัติไม่ละลายในน้ำ และในสารละลายกรดและด่างเจือจาง แต่ละลายได้ในสารละลายด่างแก่ สมบัติการไม่ชอบน้ำของไหมเกิดขึ้นเนื่องจากไหมมีพันธะไฮโดรเจนมาก และมีความเป็นผลึกสูง ซึ่งทั้งนี้เกิดเนื่องจากส่วนประกอบส่วนใหญ่ของไหมคือ ไพโบรอนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ และละลายได้ในสารละลายด่างแก่ ในขณะที่เซอร์ซินละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและสารละลายด่างอ่อน

ลักษณะสมบัติเชิงกล

เส้นไหมจากหนอนไหมพันธุ์ *B. mori* เมื่อนำมาวัดสมบัติเชิงกลพบว่ามีความทนต่อแรงดึง (tensile strength) ประมาณ 0.5 จิกะปาสกาล (GPa) (Shao and Vollrath, 2002) หรือประมาณ 650 ± 40 เมกะปาสกาล (MPa) (Pe´rez-Rigueiro et al., 2000) ค่าการยืดตัวจนขาด (breaking elongation) อยู่ที่ร้อยละ 15 (Shao and Vollrath, 2002) ค่าโมดูลัสความยืดหยุ่น (elastic modulus) ประมาณ 16 ± 1 จิกะปาสกาล และความเค้นวิกฤติที่ทำให้เกิดการคราก (yield strength) ประมาณ 230 ± 10 เมกะปาสกาล (Pe´rez-Rigueiro et al., 2000) นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบสมบัติเชิงกลระหว่างไหมจากหนอนไหมและจากแมงมุม กับชีววัสดุที่มีลักษณะเป็นเส้นใยชนิดต่างๆ และเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของร่างกายสัตว์ต่างที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลระหว่างไหมจากหนอนไหมและจากแมงมุม กับชีววัสดุที่มีลักษณะเป็นเส้นใยชนิดต่างๆ และเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของร่างกาย (Altman et al.,2003)

Material	UTS (MPa)	Modulus (GPa)	% Strain at break
<i>B. mori</i> silk (w/ sericin) ^a	500	5-12	19
<i>B. mori</i> silk (w/o sericin) ^b	610-090	15-17	4-16
Spider silk ^c	875-972	11-13	17-18
Collagen ^d	0.9-7.4	0.018-0.046	24-68
Collagen cross-linked ^e	47-72	0.4-0.8	12-16
PLA ^f	28-50	1.2-3	2-6
Tendon	150	1.5	12
Bone	160	20	3

^a*B. mori* silkworm silk-determined from bave

^b*B. mori* silkworm silk-determined from single brins

^c*Nephila clavipes* silk produced naturally and through controlled silking

^dRat-tail collagen Type I extracted fibers tested after stretching from 0% to 50%

^eRat-tail collagen dehydrothermally cross-linked and tested after stretching from 0% to 50%

^fPolylactic acid with molecular weights ranging from 50,000 to 300,000

ลักษณะสมบัติทางชีวภาพ

1. การย่อยสลายทางชีวภาพ

การย่อยสลายของชีววัสดุเป็นสิ่งที่จำเป็นและสำคัญมากสำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ และสามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ โดยที่อัตราการย่อยสลายของชีววัสดุควรเท่ากับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และผลผลิตพลอยได้จากการย่อยสลายนั้นต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่และบริเวณใกล้เคียง เมื่อแบ่งตามวิธีการย่อยสลายแล้วไหมถูกจัดว่าเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ (enzymatically degradable polymer) ซึ่งการย่อยสลายนั้นเกิดจากปฏิกิริยาต่อสิ่งแปลกปลอมและไม่เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogenic response) โดยทั่วไปขั้นตอนของการย่อยสลายของชีววัสดุด้วยเอนไซม์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การดูดซับ (adsorption) เอนไซม์บนพื้นผิวโดยผ่านทางโดเมนสำหรับการยึดติดบนพื้นผิว (surface-binding domain) และการสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) ของพันธะเอสเทอร์ (ester bond)

ไฟโบรอินจากไหมจัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่เกิดการย่อยสลายได้ทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วชีววัสดุที่ทำจากไหมมีขั้นตอนการย่อยสลายทางชีวภาพประกอบด้วย 2 ขั้นตอนเช่นกัน คือ เอนไซม์ถูกดูดซับบนพื้นผิวของชีววัสดุ หลังจากนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้ได้ผลผลิตพลอยได้เป็นกรดอะมิโนซึ่งสามารถดูดซึมได้อย่างง่ายดาย ซึ่งลักษณะเฉพาะของการย่อยสลายทางชีวภาพของไหมนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์

โปรติเอส (proteases) มีความจำเพาะต่อโครงสร้างทางเคมีของบริเวณที่เกิดการแตก (cleavage site) น้อยที่สุด จึงเกิดการย่อยสลายได้เร็วที่สุดส่วนแอลฟาไคโมทริปซิน (α -chymotrysin) มีความจำเพาะมากขึ้น จึงย่อยสลายบริเวณอสังฐานของไฟโบรอิน (Li, Ogiso, and Minoua, 2003) ซึ่งการแตกเกิดที่บริเวณพันธะ X-Y โดยที่ X อาจเป็นได้ทั้งสายโซ่อะโรมาติก (aromatic side chain) หรือสายโซ่ที่ไม่ชอบน้ำขนาดใหญ่ ในขณะที่คอลลาจีเนส (collagenase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเฉพาะบริเวณพันธะ X-Gly ในลำดับของ X-Gly-Pro เท่านั้น แต่เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของไฟโบรอินไหมนั้นเป็น Gly-Y มากกว่าร้อยละ 90 จึงทำให้ความสามารถในการแตกสลายของคอลลาจีเนสน้อยกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ (Arai et al., 2004)

เมื่อวัดค่าเฉลี่ยของมวลโมเลกุลของแผ่นไฟโบรอินไหมหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์พบว่าแผ่นไฟโบรอินไหมที่ย่อยด้วยแอลฟาไคโมทริปซิน มีค่าเฉลี่ยมวลโมเลกุลมากที่สุด รองลงมาคือคอลลาจีเนส และน้อยที่สุดคือโปรติเอส 14 (protease XIV) ซึ่งผลผลิตจากการย่อยสลายมากกว่าร้อยละ 50 เป็นกรดอะมิโนอิสระ (Li, Ogiso, and Minoua, 2003) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 240 กิโลดาลตัน และส่วนที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 50 กิโลดาลตัน ที่มีลักษณะเป็นชิ้นส่วน (fragment) (Numata, Cebe, and Kaplan, 2010)

อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของไฟโบรอินไหมนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะทางโครงสร้างและกายสังฐานวิทยา และสภาวะเชิงกลและชีววิทยาของไหมในบริเวณที่ทำการฝังซึ่งการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าไฟโบรอินไหมที่มีลักษณะเป็นเส้นใยเกิดการย่อยสลายได้ช้ากว่าลักษณะที่เป็นแผ่นฟิล์ม โดยประเมินจากน้ำหนักที่หายไป ซึ่งน้ำหนักที่หายไปนั้นเกิดขึ้นพร้อมกับมวลโมเลกุลที่ลดลง (Arai et al., 2004) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเส้นใยมีความต้านทานต่อการแยกสลายของเอนไซม์ได้ดีกว่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากเส้นใยมีพื้นผิวเรียบมากกว่า สายโซ่ไฟโบรอินเรียงตัวเป็นระเบียบและยึดติดกันแน่นมากกว่า และมีการเรียงตัวของโครงสร้างเส้นใยที่ดีกว่า (Tsukada et al., 1992) ในขณะที่ลักษณะแบบแผ่นฟิล์มนั้นมีวัฏภาคอสังฐานที่เกิดการบวมได้ง่าย ส่งผลให้เอนไซม์เข้ามาถึงบริเวณที่เกิดการแตกได้ง่ายขึ้น (Minoura, Tsukada, and Nagura, 1990)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพอีก ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อไฟโบรอินไหม และระยะเวลาที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา ซึ่งพบว่า การย่อยสลายเกิดมากขึ้นเมื่อ

อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อไฟโบรอินใหม่เพิ่มขึ้น (Arai et al., 2004) และระยะเวลาที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยานานขึ้น (Arai et al., 2004; Li, Ogiso, and Minoua, 2003; Zhou et al., 2010) ในปี ค.ศ. 2011 Lu et al. ได้สรุปถึงกลไกการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินใหม่ว่าขึ้นอยู่กับปริมาณผลึกและปฏิกิริยาชอบน้ำภายในไฟโบรอิน ซึ่งการย่อยสลายเริ่มเกิดขึ้นที่บล็อกส่วนที่ชอบน้ำก่อน จึงส่งผลให้บล็อกส่วนที่ไม่ชอบน้ำซึ่งเป็นส่วนที่เป็นผลึกเกิดการแยกตัวออกเป็นอนุภาคอิสระ และถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ตามมา (Lu et al., 2011)

การย่อยสลายของไฟโบรอินใหม่ที่อยู่ในลักษณะฟองน้ำที่มีรูพรุนหรือมีรูปทรง 3 มิติขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น วิธีการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ ความเข้มข้นของไฟโบรอินใหม่ และขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ จากการทดลองในห้องปฏิบัติการของ Kim et al. (2005) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างด้วยการละลายไฟโบรอินใหม่ในตัวทำละลาย เช่น เฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (hexafluoroisopropanol: HFIP) มีการย่อยสลายที่ช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากไฟโบรอินใหม่ที่อยู่ในรูปของเหลว ซึ่งพบว่าการสร้างด้วยวิธีแรกนั้นยังคงเหลือน้ำหนักไฟโบรอินใหม่อยู่ประมาณร้อยละ 65 เมื่อผ่านไป 21 วัน ในขณะที่การสร้างด้วยวิธีหลังนั้นเกิดการย่อยสลายหมดในวันที่ 4 ของการทดลอง

ในขณะที่การทดลองในสัตว์ทดลองของ Wang et al. (2008) ได้ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันคือ เมื่อการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ในกล้ามเนื้อ (intramuscular) ของ nude และ Lewis rat นาน 8 สัปดาห์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากไฟโบรอินใหม่ที่ละลายในน้ำ เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่แทรกซึมเข้าไปในรูพรุนจนสมบูรณ์ และส่วนใหญ่ของโครงเลี้ยงเซลล์เกิดการสูญเสียความแข็งแรงของโครงสร้างไป แต่ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างด้วยการละลายไฟโบรอินใหม่ใน HFIP นั้น เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่เข้าไปแทรกซึมในรูพรุนบางส่วนเท่านั้น

ส่วนปัจจัยที่เกี่ยวกับความเข้มข้นของไฟโบรอินใหม่นั้น จากการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากไฟโบรอินใหม่ที่ละลายในน้ำในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ของ Lewis rat พบว่าไฟโบรอินใหม่ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 6 เริ่มเกิดการย่อยสลายและมีเนื้อเยื่อใหม่แทรกซึมเข้าไปจนสมบูรณ์หลังทำการฝัง 2 สัปดาห์ ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 นั้น ยังคงไม่เกิดการย่อยสลาย แต่เริ่มย่อยสลายมากขึ้นเมื่อสัปดาห์ที่ 8 และย่อยสลายหมดหลังทำการฝัง 1 ปี (Wang et al., 2008) นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างด้วยการละลายไฟโบรอินใหม่ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 17 ใน HFIP ที่มีขนาดรูพรุนแตกต่างกันดังนี้ 100-200, 500-600 และ 800-1,000 μm โดยทำการฝังในชั้นใต้ผิวหนังของ Lewis rat พบว่าหลังทำการฝัง 12 เดือน โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุน 100-200 μm ยังคงมีรูพรุนจำนวนมากที่ไม่มีการแทรกซึมเข้ามาของเนื้อเยื่อใหม่ (Wang et al., 2008)

2. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunological response)

ปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันต่อชีววัสดุนั้นเป็นสิ่งสำคัญที่ควรพิจารณา เนื่องจากชีววัสดุที่ฝังเข้าไปในเนื้อเยื่อนั้นจัดเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายมีการตอบสนองในรูปแบบของการอักเสบ จากการศึกษาของ Wang et al. (2008) พบว่าเมื่อทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรง 3 มิติที่ขึ้นรูปด้วยสารละลายในน้ำ และการชะละลายอนุภาค และด้วยตัวทำละลาย (HFIP) และการชะละลายอนุภาคใน Lewis rat นาน 8 สัปดาห์ พบแมคโครฟาจ (macrophage) และ มัลตินิวเคลียตเทตไจแอนท์เซลล์ (multinucleated giant cell) เฉพาะบริเวณที่ทำการฝัง และมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการอักเสบเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการศึกษา 1 ปี ทั้ง $TNF-\alpha$, IL-4, IL-6, IL-13 และ INF- γ

ลักษณะวิทยาของชีววัสดุจากไฟโบรอินไหม

ไฟโบรอินไหมถูกนำมาใช้เป็นชีววัสดุสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยมีลักษณะทางกายภาพลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามการนำไปใช้งาน ซึ่งได้แก่ เส้นใยเจล (gel) โฟม (foam) แผ่นฟิล์ม (film) ทรงกลม (sphere) และแคปซูล (capsule) ส่วนตัวทำละลายไฟโบรอินไหมนั้นมีอยู่ 2 ประเภท ได้แก่ ตัวทำละลายในน้ำ (aqueous solvent) และ ตัวทำละลายที่ไม่ใช่น้ำ (non-aqueous solvent) เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) HFIP เป็นต้น

การเตรียมสารละลายในน้ำ (aqueous solution) นั้นเตรียมจากการละลายเส้นใยไหมในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (lithium bromide) ที่ความเข้มข้น 9 โมลาร์ (molar) หรือในสารละลายที่ประกอบด้วย แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (calcium chloride dihydrate) น้ำปราศจากไอออน (deionized water) และ เอทานอล (ethanol) ในอัตราส่วนโดยโมล 1:8:2 และนำสารละลายที่ได้ไปทำการแยกสารผ่านเยื่อไดอะไลซิส (dialysis) ในน้ำ ทำให้ได้สารละลายไหมในน้ำ (aqueous silk solution) ซึ่งลักษณะต่างๆของไฟโบรอินจากไหมที่มีการนำมาทำเป็นชีววัสดุมีดังต่อไปนี้

1. เส้นใย

1.1 เส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระดับไมโครเมตร

เส้นใยประเภทนี้สามารถเตรียมได้จากทั้งสารละลายไฟโบรอินไหมในน้ำและสารละลายไฟโบรอินไหมในตัวทำละลาย โดยที่สารละลายประเภทแรกนั้นสามารถนำมาสร้างเป็นเส้นใยได้ด้วยการปั่นด้วยมือ (hand-drawing) การสปinningแบบเปียก (wet spinning) และ การใช้เครื่องมือที่เรียกว่า microfluidic device ซึ่งเส้นใยที่ได้จากการปั่นด้วยมือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ไม่สม่ำเสมอและสมบัติเชิงกลต่ำ ในขณะที่เส้นใยที่ได้จากการสปinningแบบเปียกนั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใกล้เคียงกัน และมีสมบัติเชิงกลที่เพียงพอต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไปได้ ส่วนตัวทำละลายอื่นๆ ที่นำมาใช้ละลายไฟโบรอินไหม เช่น HFIP เอ็กซะฟลูออโรอะซิโตนไฮเดรต

(hexafluoroacetone hydrate: HFA-hydrate) และ ของเหลวที่มีไอออน (ionic liquid) จากนั้นจึงนำไปสร้างเป็นเส้นใยด้วยการปั่นนิ่งแบบเปียก

1.2 เส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระดับนาโนเมตร

การสร้างเส้นใยประเภทนี้สามารถทำได้โดยการปั่นด้วยไฟฟ้า (electrospinning) ซึ่งสารละลายไฟโบรอินไหมสามารถใช้ได้ทั้งแบบสารละลายในน้ำและสารละลายในตัวทำละลาย เช่น HFIP และ HFA-hydrate การปั่นด้วยไฟฟ้าที่ใช้แรงทางไฟฟ้าแทนแรงทางกลในการสร้างเส้นใยไฟโบรอินไหมภายใต้สนามไฟฟ้าความแรงสูงระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วที่มีประจุไฟฟ้าต่างกัน ซึ่งขั้วหนึ่งอยู่ที่บริเวณปลายกระบอกลิดสารละลายไฟโบรอินไหม ส่วนอีกขั้วนั้นอยู่ที่แผ่นรองรับซึ่งต่อกับสายดิน เมื่อสารละลายไฟโบรอินไหม ถูกฉีดออกมาทางหลอดโลหะขนาดเล็กซึ่งอยู่ที่ปลายกระบอกลิดด้วยความเร็วคงที่ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใส่เข้าไปจะส่งผลให้หยดสารละลายไฟโบรอินไหมเกิดประจุไฟฟ้าขึ้นที่ผิวหน้า ซึ่งประจุที่เกิดขึ้นนั้นมีขั้วเหมือนกันจึงเกิดการผลักกันระหว่างประจุ เมื่อแรงผลักที่เกิดขึ้นนี้มากกว่าแรงตึงผิวของสารละลายไฟโบรอินไหม ส่งผลให้หยดสารละลายไฟโบรอินไหมเปลี่ยนเป็นเส้นใยและตกลงบนแผ่นรองรับ จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกและเหลือไว้แต่แผ่นเส้นใยที่มีรูพรุน

ความหนาของเส้นใย เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นเส้นใย และ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยปัจจัยดังนี้ ความเข้มข้นของไฟโบรอินไหม การเลือกตัวทำละลาย อัตราเร็วการฉีดสารละลายไฟโบรอินไหม ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ เส้นผ่านศูนย์กลางของปลายกระบอกลิด วัสดุที่ใช้ทำแผ่นรองรับ และระยะทางระหว่างหลอดโลหะและแผ่นรองรับซึ่งข้อดีของการสร้างเส้นใยด้วยวิธีปั่นด้วยไฟฟ้า ได้แก่ เส้นใยที่สร้างได้มีขนาดเล็กและมีพื้นที่ผิวมากขึ้น จึงเหมาะสำหรับการยึดเกาะและการเติบโตของเซลล์ และการที่มีรูพรุนมากยังส่งผลทำให้การขนส่งออกซิเจนและสารอาหารเข้าไปยังเซลล์ดีขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเติบโตของเนื้อเยื่อ

เส้นใยที่ได้จากการปั่นด้วยไฟฟ้าสามารถนำมาทำเป็น โครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้เช่น งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งอาจมีการเติมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีอะปาทิต (Kim et al., 2014) หรือปั่นร่วมกับพอลิคาโพรแลคโตน อะโลเวล่า (aloe vera) และไฮดรอกซีอะปาทิต (Shanmugavel et al., 2013) การทำเป็นเยื่อเพื่อใช้สำหรับส่งเสริมการเจริญทดแทนของกระดูก (Kim et al., 2005) งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท (Qu et al., 2013) และส่งเสริมการเจริญทดแทนของเส้นประสาท (Hu et al., 2013)

นอกจากนี้ยังนำมาใช้เป็นวัสดุที่ช่วยทำให้เกิดการเจริญทดแทนของชั้นหนังแท้ ซึ่งจากการศึกษาของ Lee et al. (2014) พบว่าให้ผลการเจริญทดแทนของชั้นหนังแท้ไม่แตกต่างจาก MatriDerm™ ซึ่งเป็นวัสดุทดแทนชั้นหนังแท้ที่ปราศจากเซลล์ (acellular dermal substitute) ที่

ประกอบด้วยคอลลาเจนที่ทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์และอีลาสติน (elastin) ที่ทำหน้าที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่และสังเคราะห์อีลาสติน แต่สามารถย่อยสลายได้หมดและไม่เหนียวนำไปให้เกิดการหดตัวของบาดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับ MatriDerm™ และเมื่อนำไฟโบรอินใหม่มาปั่นรวมกับคาร์บอกซีเอซิล ไลโทซาน และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (poly vinyl alcohol) สามารถสร้างเป็นเยื่อคอมโพสิตนาโนไฟบรัส ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนแต่งแผลสำหรับการเจริญทดแทนของผิวหนังได้ (Zhou et al., 2013) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของ normal human oral keratinocytes (NHOK) บนแผ่นไฟโบรอินใหม่ที่สร้างจากเส้นใยไมโครที่สร้างจากการปั่นด้วยไฟฟ้า เส้นใยนาโนที่สร้างจากการปั่นด้วยไฟฟ้า และแผ่นฟิล์มไฟโบรอินใหม่พบว่าแผ่นไฟโบรอินใหม่ที่เป็นเส้นใยนาโนให้ผลการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของ NHOK ที่ดีกว่า ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้ เช่น ส่วนแต่งแผล และโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Min et al., 2004)

2. เจล

เจลเป็นวัสดุคล้ายของแข็ง (solid-like material) ที่มีเครือข่ายพอลิเมอร์รูปร่าง 3 มิติ ซึ่งมีความทนทานทางกายภาพต่อการบวม (swelling) ในสารละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในสารละลายนั้น เจลประกอบด้วยของเหลวที่ถูกตรึงรูป (immobilize) ด้วยเจลเลเตอร์ (gelator) ซึ่งเจลหรือไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่สร้างจากสารละลายใหม่ในน้ำที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 23 โดยน้ำหนัก เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้สามารถเกิดไฮโดรเจลได้เอง (spontaneous hydrogelation) ซึ่งการเกิดนี้เป็นปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้น (concentration-dependent) ของไฟโบรอินใหม่ จากนั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะจากสารละลายเป็นเจลด้วยการเติมกรดไอออนหรือใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความดัน 2 บาร์ และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้เกิดฟองในสารละลายในน้ำ (Mallepally, Martin, and, McHugh, 2014) โดยระหว่างขั้นตอนที่เกิดเป็นเจลนั้น ไฟโบรอินใหม่เปลี่ยนโครงสร้างจากลักษณะขดเป็นวงอย่างสุ่มเป็นแผ่นบีต้า เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไม่ชอบน้ำและมีพันธะไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้การละลายของไฟโบรอินในน้ำลดลงและสนับสนุนให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ (physical cross-link formation) ระหว่างโปรตีน ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลให้ระยะเวลาในการเกิดเจลลดลงได้แก่

1. ค่าความเป็นกรดเบส (pH) ของสารละลาย โดยถ้าค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายใกล้เคียงกับจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ของไฟโบรอินซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 3.8-3.9 จะส่งผลให้โปรตีนรวมกลุ่มกัน
2. การมีไอออนบวกในสารละลายโดยเฉพาะแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เนื่องจากแคลเซียมไอออนเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทั้งระหว่างและภายในโมเลกุลของโปรตีน

3. อุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียสทำให้เกิดเจลเร็วขึ้นอาจเนื่องจาก บริเวณไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินใหม่ละลายได้น้อยลง จึงส่งเสริมให้เกิดการรวมกลุ่มกันของไฟโบรอินโดยผ่านทางปฏิกิริยาไม่ชอบน้ำหรือเกิดการคลายเกลียวของโปรตีน ส่งผลให้บริเวณไม่ชอบน้ำเผยผิวด้านหน้า และส่งเสริมการรวมกลุ่มกัน

4. อัลตราโซนิเคชัน (ultrasonication) ทำให้บริเวณไม่ชอบเกิดการน้ำเกิดการเสียน้ำ จึงส่งเสริมการรวมกลุ่มของโปรตีน

สามารถนำไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่มาใช้ในการขนส่งโบนมอร์โฟเจนิคโปรตีน 2 (bone morphogenic protein 2) เพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดการซ่อมความพิการของกระดูกต้นขาในหนู Sprague Dawley โดยใช้ร่วมกับพอลิแคปโรแลคโตน นาโนไฟเบอร์ เมช ทิว (polycaprolactone nanofiber mesh tube) (Diab et al., 2012) ในการควบคุมการปลดปล่อยยา (controlled drug release) (Mandal, Kapoor, and Kundu, 2009a) และการขนส่งยา (drug delivery) (Elia et al., 2013)

3. โฟม

โฟมมีลักษณะทางกายศาสตร์ 3 มิติที่สามารถควบคุมการเกิดรูปร่างและสมบัติเชิงกลได้ ซึ่งอาจสร้างได้จากทั้งสารละลายไฟโบรอินใหม่ในน้ำและสารละลายไฟโบรอินใหม่ในตัวทำละลาย โดยที่ถ้าใช้สารละลายในน้ำเป็นตัวตั้งต้น ลักษณะของโฟมสามารถสร้างได้ด้วยการทำแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) และการชะละลายเกลือ (salt leaching) ซึ่งวิธีแรกนั้นทำการเติมเมธานอลลงไปในสารละลายไฟโบรอินใหม่เพื่อทำให้สารละลายอยู่ในรูปครีมเจล (gel paste) จากนั้นจึงเทใส่ในแบบหล่อและนำไปแช่แข็งและทำแห้งเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ส่วนการชะละลายเกลือเป็นวิธีการที่สามารถควบคุมขนาดของรูพรุนได้ โดยการใช้สารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่มีขนาดอนุภาคตามต้องการ ซึ่งสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่ใช้เป็นผลึกเกลือที่ผ่านการร่อนผ่านตะแกรงตามขนาดที่ต้องการมาแล้วจากนั้นเติมสารที่ทำให้เกิดรูพรุนลงในสารละลายไฟโบรอินใหม่ในน้ำที่อยู่ในแบบหล่อ (mold) แล้วปิดฝาแบบหล่อและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายไฟโบรอินใหม่กลายเป็นของแข็ง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเป็นเวลา 2 วัน เพื่อละลายสารที่ทำให้เกิดรูพรุนออก (Kim et al., 2005) ขนาดรูพรุนที่ได้มีขนาดเล็กกว่าขนาดของผลึกเกลือเนื่องจากพื้นผิวของอนุภาคเกิดการละลายไปบางส่วนในระหว่างการอิ่มตัวด้วย (supersaturation) ของสารละลายใหม่ก่อนที่เกิดการกลายเป็นของแข็ง (solidification)

ในกรณีที่ใส่สารละลายไฟโบรอินใหม่ในตัวทำละลายเป็นตัวตั้งต้น ลักษณะของโฟมที่มีรูพรุนสามารถสร้างได้ด้วยวิธีชะละลายเกลือ และ แก๊สโฟมมิ่ง (gas foaming) ซึ่งทั้งสองวิธีนั้นควรนำสารละลายไฟโบรอินใหม่ไปทำแห้งเยือกแข็งก่อน จากนั้นจึงนำมาละลายในตัวทำละลายที่ไม่ละลายสารที่ทำให้เกิดรูพรุน เช่น HFIP แต่ทั้งสองวิธีแตกต่างกันที่สารที่ทำให้เกิดรูพรุนและวิธีการทำ คือ ถ้า

เป็นวิธีชะละลายเกลืออาจใช้ผลึกเกลือหรือน้ำตาล เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ซึ่งขนาดของรูพรุนที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของอนุภาคของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ส่วนวิธีการขึ้นรูปนั้นคล้ายกับการใช้สารละลายไฟโบรอินไหมในน้ำเป็นสารตั้งต้น คือ เติมสารที่ทำให้เกิดรูพรุนลงในสารละลายไฟโบรอินไหมใน HFIP ซึ่งอยู่ในแบบหล่อ จากนั้นปิดฝาแบบหล่อเพื่อลดการระเหยของ HFIP และเพื่อให้มีระยะเวลาที่เพียงพอสำหรับการกระจายของสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วันเมื่อครบระยะเวลาแล้วนำไปแช่ในเมธานอลนาน 30 นาทีเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแผ่นบีต้าและนำไปแช่ในน้ำนาน 2 วัน เพื่อละลายเอาสารที่ทำให้เกิดรูพรุนออก (Kim et al., 2005)

ถ้าเป็นวิธีแก๊สโฟมมิ่งนั้น คล้ายกับวิธีการชะละลายเกลือ แต่ใช้แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (ammonium bicarbonate) เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนแทนเกลือหรือน้ำตาล เมื่อสารละลายไฟโบรอินไหมกลายเป็นของแข็งแล้ว จึงระเหยตัวทำละลายออกและแช่ในเมธานอลเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแผ่นบีต้า จากนั้นนำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแก๊สโฟมมิ่ง แชนกว่าไม่เห็นฟองอากาศลอยขึ้นมา จากนั้นจึงทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Nazarov, Jin, and Kaplan, 2004)

จากการศึกษาของ Kim et al. (2005) พบว่าเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากสารละลายไฟโบรอินไหมในน้ำและสารละลายไฟโบรอินไหมใน HFIP ที่มีขนาดรูพรุน 900 ± 50 ไมโครเมตรเท่ากัน มาเพาะเลี้ยงกับเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกมนุษย์ (human bone marrow stem cell) นาน 28 วัน พบว่าสามารถทำให้เกิดการสร้างลักษณะคล้ายเส้นใยกระดูก (bone-like trabeculae) ได้ นอกจากนี้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงกับเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์มนุษย์ (human mesenchymal stem cell) พบว่าเกิดการสร้างเครือข่ายที่มีการสะสมแร่ธาตุลักษณะคล้ายเส้นใยกระดูกหรือคล้ายกระดูกที่ต่อเนื่องกัน (interconnected trabecular- or cortical-like mineralized network) (Uebersax et al., 2006)

การผสมโคโทซานกับไฟโบรอินไหม พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการดูดซับน้ำและสมบัติเชิงกลดีขึ้น และเซลล์สร้างกระดูกอ่อนมีการเพิ่มจำนวนได้มากกว่า เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียว (Ruan et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเซลล์ murine embryonic fibroblast ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินไหม เจลาติน และไฮดรอกซีอะปาทาइट เซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียว (Moisenovich et al., 2014)

4. แผ่นฟิล์ม

แผ่นฟิล์มเป็นอีกหนึ่งลักษณะทางกายวิธานวิทยาที่สามารถสร้างได้จากทั้งสารละลายไฟโบรอินไหมในน้ำและสารละลายไฟโบรอินไหมในตัวทำละลาย ด้วยวิธีการขึ้นรูปด้วยตัวทำละลายโดยการเทลงในแบบหล่อ แล้วระเหยตัวทำละลายออก หลังจากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างแผ่นบีต้า

ด้วยเมธานอล แล้วจึงลอกออกจากแบบหล่อ ซึ่งแผ่นฟิล์มที่สร้างจากสารละลายไฟโบรอินไหมในน้ำ มีสมบัติเชิงกลค่อนข้างต่ำ แต่สามารถเพิ่มสมบัติเชิงกลได้ด้วยการเชื่อมโยงข้าม นอกจากนี้ยังสามารถเติมสารที่ทำให้เกิดรูพรุนลงไปเพื่อทำให้เกิดแผ่นฟิล์มที่มีรูพรุนได้ แผ่นฟิล์มมีความสามารถในการให้อากาศและไอน้ำซึมผ่านได้ และมีพื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้นซึ่งช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์โดยที่สมบัติเชิงกลและสมบัติทางกายภาพของฟิล์มไฟโบรอินไหมสามารถปรับปรุงได้ โดยการเติม PLA ที่ร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก (Zhu et al., 2009)

เมื่อนำแผ่นฟิล์มไฟโบรอินไหมมาทำเป็นสิ่งแต่งแผล พบว่าช่วยส่งเสริมให้การเจริญทดแทนของเนื้อเยื่อชั้นนอกและหนังแท้ในหนู mice ได้เร็วกว่าแผ่นปิดแผล Duo Active™ ซึ่งเป็นสิ่งแต่งแผลไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid dressing) โดยพบการคืนสภาพของคอลลาเจนที่มากกว่าและมีการอักเสบที่น้อยกว่า (Sugihara et al., 2000) และยังช่วยในการซ่อมแซมเยื่อเมือกข้างแก้ม (buccal mucosa) ในหนู SD rat ได้ โดยพบการหดตัวของบาดแผลและการกระจายตัวของนิวโทรฟิล (neutrophil) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (Ge et al., 2014) นอกจากนี้แผ่นฟิล์มถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการสร้างแผ่นเยื่อบางที่สลายตัวได้ทางชีวภาพสำหรับการปิดชั้นดูรา มาเทอร์ (dura mater) (Flanagan et al., 2014) และเมื่อมีการเติมด้วยแคลเซียมซิลิเกต (calcium silicate) ส่งผลให้เกิดการสร้างชั้นของไฮดรอกซีคาร์บอเนตอะพาไทต์ (hydroxycarbonate apatite) บนพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม หลังจากแช่ใน simulated body fluid (SBF) นาน 7 วัน และเกิดการยึดเกาะและกระจายตัวของเซลล์จากมะเร็งกระดูก MG63 มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินไหม ซึ่งแสดงว่ามีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกโดยออกแบบให้มีลักษณะเป็นโครงเกลี้ยงเซลล์สามมิติต่อไป (Zhu et al., 2011) และเมื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มหลายชั้น (multilayered film) พบว่าฟิล์มไฟโบรอินไหมที่มีการเติมไฮดรอกซีอะพาไทต์มีค่าโมดูลัสของยัง (Young's modulus) มากกว่าฟิล์มไฟโบรอินไหมที่ไม่ได้เติมไฮดรอกซีอะพาไทต์ แต่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MC3T3-E1 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่เป็นตัวตั้งต้นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast precursor cell line) ที่ได้มาจากฝากระโหลกของหนู mouse นอกจากนี้ยังมีจำนวนเซลล์ที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) น้อยกว่าไฟโบรอินไหมไหมที่ไม่ได้เติมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Kino et al., 2007)

นอกจากนี้ยังมีการนำแผ่นฟิล์มไฟโบรอินไหมมาประยุกต์ใช้ในการขนส่งยา (Hofmann et al., 2006; Dyakonov et al., 2012) การควบคุมความคงตัวและการปลดปล่อยเอนไซม์ (Lu et al., 2010) และควบคุมการปลดปล่อยยาหรือโมเลกุลชีวกำมันต์ (bioactive) ได้ เมื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มหลายชั้นที่มีการเติมเจลาตินลงไป (Mandal, Mann, and Kundu, 2009b)

5. ทรงกลมและแคปซูล

ทรงกลมและแคปซูลสามารถสร้างได้จากสารละลายไฟโบรอินใหม่ในน้ำ โดยการสเปรย์แห้ง (spray drying) หลังจากนั้นเหนียวทำให้เกิดการตกผลึกเป็นทรงกลมขนาดเล็ก (microsphere) ที่ไม่ละลายในน้ำ โดยการเก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 89 นาน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ลิพิด (lipid) เพื่อทำให้เกิดเป็นลักษณะถุงเล็ก (vesicle) ทั้งแบบชั้นบางหนึ่งชั้น (unilamellar) และชั้นบางหลายชั้น (multilamellar) โดยที่ไฟโบรอินใหม่ทรงกลมขนาดเล็กสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในสำหรับการควบคุมการปลดปล่อยยาประเภทโปรตีนที่อยู่ในรูปกัมมันต์ (active form) ได้ (Wang et al., 2007; Wenk et al., 2008) และการขนส่งโบน มอร์โฟเจนิค โปรตีน เพื่อนำไปประยุกต์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Bessa et al., 2010)

อัลฟาไตรแคลเซียมฟอสเฟต (alpha-tricalcium phosphate)

ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (TCP) เป็นเกลือแคลเซียม (calcium salt) ของกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ลักษณะเป็นผงสีขาว มีความหนาแน่น 3.14 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ บีต้าไตรแคลเซียมฟอสเฟต (β -TCP) อัลฟาไตรแคลเซียมฟอสเฟต (α -TCP) และ อัลฟาไพรมแคลเซียมฟอสเฟต (α' -TCP) แต่ α' -TCP ไม่นิยมนำมาใช้เนื่องจากพบได้ที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 1,430 องศาเซลเซียส และมักเปลี่ยนรูปเป็น α -TCP เมื่อทำให้เย็นตัวลงที่ต่ำกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะ (transition temperature) ซึ่งต่างจาก β -TCP ที่เสถียรที่อุณหภูมิห้องและสามารถเปลี่ยนสถานะไปเป็น α -TCP ได้ที่อุณหภูมิประมาณ 1,125 องศาเซลเซียส และสามารถคงรูปร่างได้ระหว่างการเย็นตัวที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งในปัจจุบันทั้ง α -TCP และ β -TCP ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้หลากหลายทั้งทันตกรรม ศัลยศาสตร์ช่องปากและใบหน้าและออร์โทพีดิกส์ โดยที่ β -TCP นั้นเป็นส่วนประกอบของไบโอเซรามิก (bioceramic) ซึ่งอาจเป็นโมโนเฟซิก (monophasic) หรือไบเฟซิก (biphasic) ก็ได้ และคอมโพสิตก็เป็นผลิตภัณฑ์ที่วางขายในท้องตลาดแล้ว ในขณะที่ α -TCP นั้นเป็นส่วนประกอบหลักของผงที่นำมาใช้เป็นไฮดรอลิก โบนซีเมนต์ (hydraulic bone cement)

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าทั้ง α -TCP และ β -TCP มีส่วนประกอบทางเคมีที่เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันในด้านโครงสร้าง ความหนาแน่น และความสามารถในการละลาย ซึ่งส่งผลต่อสมบัติทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้งานทางคลินิกเป็นอย่างมาก กล่าวคือ ส่วนมากใช้ β -TCP นั้นสำหรับการเตรียมไบโอเซรามิกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งมีรูปร่างเป็นเม็ดเล็ก (granule) และบล็อกที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ (macro-porous) ส่วน α -TCP ถูกนำมาใช้ในรูปผงละเอียดในการเตรียมแคลเซียมฟอสเฟตซีเมนต์ (calcium phosphate cement) แต่ก็อาจพบบางผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดนำมาทำ

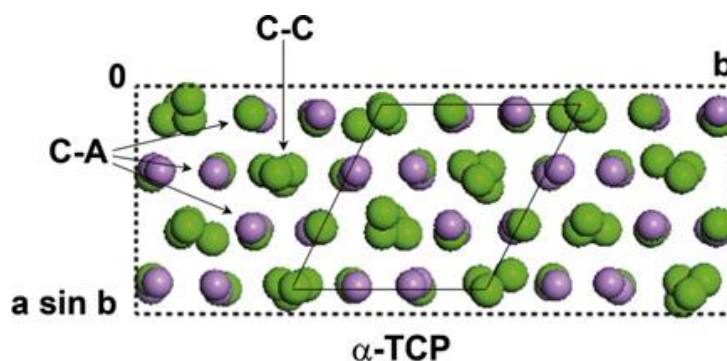
ไบโอเซรามิกที่มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กและบดละเอียดบ้าง แต่โดยรวมแล้วทั้ง α -TCP และ β -TCP ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกสำหรับการซ่อมแซมกระดูกและการปรับรูปของกระดูก

ลักษณะทางโครงสร้าง

แคลเซียมและฟอสเฟตไอออนที่เป็นส่วนประกอบในยูนิตเซลล์ (unit cell) ของ α -TCP นั้นเรียงตัวเป็นแถว (column) ซึ่งมีอยู่ 2 ลักษณะด้วยกัน ได้แก่ ลักษณะแรกเรียกว่า C-C ที่ประกอบด้วยแคลเซียม แคลด์ไอออน (calcium cation) และลักษณะที่สองเรียกว่า C-A ซึ่งประกอบไปด้วยแคลเซียม แคลด์ไอออนและฟอสเฟตแอนไอออน (phosphate anion) โดยที่แต่ละแถวของ C-C นั้นถูกล้อมรอบด้วยแถวของ C-A จำนวน 6 แถว และ ในขณะที่แถวของ C-A แต่ละแถวถูกล้อมรอบด้วยแถวของ C-C และแถวของ C-A อย่างละ 3 แถว ดังภาพที่ 4 และนอกจากนี้หนึ่งยูนิตเซลล์ของ α -TCP มีลักษณะที่สัมพันธ์กับไฮดรอกซีอะปาทิต โดยที่แถวของ OH สามารถแทนที่แถวของ C-C ที่อยู่บริเวณมุมของยูนิตเซลล์ได้ ส่งผลให้แต่ละแถวของ C-A ถูกล้อมรอบด้วยแถวของ C-A จำนวน 3 แถว แถวของ C-C จำนวน 2 แถว และ แถวของ OH จำนวน 1 แถว

ความสามารถในการละลายและการย่อยสลายทางชีวภาพ

เนื่องจากโครงสร้างของ α -TCP เรียงตัวกันด้วยความแน่นที่น้อยกว่า β -TCP และ α' -TCP ดังนั้นการละลายและการเสื่อมสลายของ α -TCP ในสภาพแวดล้อมของร่างกาย (physiological environment) จึงเร็วกว่า β -TCP และ α' -TCP โดยที่ความสามารถในการละลายของ α -TCP ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและพีเอช 7.2-7.4 เท่ากับ 0.24 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณอัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca/P) พบว่า α -TCP มีค่าเท่ากับ 1.5 ในขณะที่ไฮดรอกซีอะปาทิตนั้นมีค่าเท่ากับ 1.67 ส่วนการย่อยสลายทางชีวภาพของ α -TCP เกิดขึ้นโดยการละลายในของเหลวในเนื้อเยื่อ (tissue fluid) และการกลืนกินของแมคโครฟาจ (phagocytosis) ซึ่งสามารถพบอนุภาคของ α -TCP ในแมคโครฟาจได้ ก่อนที่จะเกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งขึ้นมาใหม่



ภาพที่ 4 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยูนิตของ α -TCP โดยที่สีเขียวคือ Ca^{2+} และสีม่วงคือ P^{5+} ในขณะที่ C-C คือ แกวของแคดไอออน-แคดไอออน C-A คือ แกวของแคดไอออน-แอนไอออน ส่วนเส้นสีดำรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูนคือขอบเขตของเซลล์ที่มีรูปร่างสัมพันธ์กับไฮดรอกซีอะปาไทต์

ลักษณะสมบัติทางชีวภาพ

สมบัติทางชีวภาพของ α -TCP ทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง พบว่าเมื่อถูกนำมาทำเป็นแคลเซียมฟอสเฟต ซีเมนต์ สามารถทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast-like cell) ได้ ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นเมทริกซ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพสำหรับการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (Oh, Lee, and Park, 2010) และนอกจากนี้ยังทำให้มีการเพิ่มขึ้นของกระดูกในแนวตั้ง (vertical bone augmentation) ที่บริเวณด้านข้างของกระดูกข้างขม่อม (parietal bone) ของฝากะโหลก (calvaria) ในหนูถึงร้อยละ 251 ± 32 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 179.2 ± 30.3 หลังการฝังนาน 8 สัปดาห์ (Nyan et al., 2014) ในขณะที่เมื่อนำมาเป็นวัสดุฝัง (implant) ในกระดูกต้นขา (femur) ของ Wistar rat พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ในบริเวณที่เกิดความพิการขนาดเล็กได้ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กระดูกอัตพันธุ์ (autogenous bone) (Pinto et al., 2011)

นอกจากนี้เมื่อนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน 3 มิติ โดยใช้พาราฟิน (paraffin) ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเล็กเป็นตัวที่ทำให้เกิดรูพรุนพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าร้อยละรูพรุนสูงถึงร้อยละ 86 และรูพรุนเป็นรูปทรงกลมที่มีการเชื่อมต่อกันอย่างทั่วถึง และยังมีสภาพให้ซึมผ่านได้ (permeability) ที่เหมาะสมเพียงพอต่อการนำไปใช้งาน เมื่อนำไปทดสอบความมีชีวิตกับเซลล์ L1210 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia cell) ที่ได้จากหนู mice พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถช่วยส่งเสริมความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ (de Moraes Machado et al., 2011) แต่จากการทดลองของ Wójtcowicz et al. (2014) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ α -TCP มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกน้อยกว่าไบเฟสิก แคลเซียม ฟอสเฟต (biphasic calcium

phosphate: BCP) เนื่องจากพบว่า BCP ส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ที่มาจากกระดูกมนุษย์ (human bone derived cell) ที่มากกว่า α -TCP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อนำมาทำเป็น โครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตเช่นเมื่อนำมาผสมรวมกับสารละลายอัลจินต (alginate) พบว่าช่วยส่งเสริมเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้ยึดเกาะ เพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ และเมื่อทำการฝังในฝากระโหลกของหนู rat พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อและสามารถทำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ภายในรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Lee et al., 2011) และยังสามารถนำมาใช้กับการขนส่งโปรตีนได้ โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากอัลจินตที่ส่วนผสมของ α -TCP ร้อยละ 75 พบว่าสามารถทำให้ไซโทโครม ซี (cytochrome C) คงตัวอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์และเกิดการปลดปล่อยออกอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในวันที่ 40 พบว่ามีการปลดปล่อย ไซโทโครม ซี ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 90 ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขนส่งปัจจัยเติบโตในวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งได้ (Perez and Kim, 2013)

จากการทดลองของ Sakai et al. (2011) เมื่อทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่มี α -TCP ขนาดต่างๆ กันที่กะโหลกของ Clawn mini-pig นาน 8 สัปดาห์ พบว่า α -TCP ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 136.2 ไมโครเมตร มีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และมีการสร้างกระดูกได้มากกว่า α -TCP ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 580.8 ไมโครเมตร และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าขนาดอนุภาคของ α -TCP อาจส่งผลต่อการสร้างกระดูกในบริเวณบกร่อง นอกจากนี้ยังสามารถนำมาทำเป็นวัสดุปิดเนื้อเยื่อในฟันได้ โดยจากการศึกษาของ Lee et al. (2014) ทั้งในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองพบว่า α -TCP มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพไม่ต่างจาก MTA ซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน แต่ α -TCP มีสมบัติเชิงกลที่ต่ำกว่า และที่ใช้ระยะเวลาในการแข็งตัวเร็วกว่า MTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สมบัติเชิงกล

สมบัติเชิงกลของ α -TCP สามารถปรับปรุงได้โดยการใส่สารเติมแต่งลงไป เพื่อลดความเปราะและเพิ่มความแข็งแรง ทำให้สามารถนำไปใช้ได้ในพื้นที่รับแรงได้ ตัวอย่างของสารเติมแต่ง เช่น 2-ไฮดรอกซีเอทิลเมทาคริเลท (2-hydroxyethylmethacrylate: HEMA) ซึ่งเป็นมอนอเมอร์ (monomer) ที่ละลายน้ำได้ เมื่อเติมลงไปร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ส่งผลให้ความทนต่อการทดสอบแรงโค้งแบบ 4 จุด (4-point bending strength) เพิ่มขึ้นจาก 9 เมกะปาสกาล เป็น 15 เมกะปาสกาล ในขณะที่ค่ามอดูลัสแรงโค้ง (bending modulus) ลดลงจาก 19 จิกะปาสกาล เหลือ 4 จิกะปาสกาล (Christel et al., 2013)

จากคุณสมบัติทางชีวภาพข้างต้น ส่งผลให้ α -TCP เป็นวัสดุฝังในอูมคติ สามารถถูกแทนที่ด้วยกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่ได้เร็วกว่าวัสดุที่มีส่วนผสมของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดอื่นๆ ที่มีจำหน่าย

ในปัจจุบัน และนอกจากนี้ α -TCP ยังเป็นวัสดุตัวเลือกที่น่าสนใจสำหรับการคิดค้นชีววัสดุตัวใหม่เพื่อนำมาใช้ในการซ่อมแซมกระดูกโดยใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อร่วมด้วย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิธีการรักษากระดูกที่เกิดการแตกหักหรือความพิการในปัจจุบันคือการปลูกถ่ายกระดูก ซึ่งกระดูกที่นำมาใช้นั้นอาจเป็นได้ทั้งเนื้อเยื่อปลูกถ่ายออดพันซ์ หรือเนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันซ์ แต่เนื้อเยื่อทั้งสองประเภทนั้นยังคงมีข้อจำกัดหลายในหลายด้าน ดังนั้นจึงเกิดการพัฒนารักษาโดยการนำหลักการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ โดยการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติที่มีรูพรุน เพื่อให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกมากที่สุด ไหมเป็นชีววัสดุชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติที่มีรูพรุน ซึ่งสามารถเตรียมได้จากสารละลายไหมในน้ำและสารละลายไหมในตัวทำละลายเช่น HFIP ส่วนวิธีการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติที่มีรูพรุนที่ง่ายที่สุดและมีประสิทธิภาพมากที่สุดวิธีหนึ่ง คือการชะละลายเกลือ

การศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติที่มีรูพรุนที่สร้างจากสารละลายไหมในน้ำและสารละลายไหมในตัวทำละลาย โดยการเพาะเลี้ยงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากไขมันมนุษย์ (human adipose-derived stem cell) ในออสทีโอเจนิคมีเดีย (osteogenic medium) นาน 7 สัปดาห์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากสารละลายไหมในตัวทำละลาย HFIP มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกที่มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากสารละลายไหมในน้ำ อย่างไรก็ตามมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยประเมินจากโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งได้แก่ ออสติโอพอนติน (osteopontin) คอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I collagen) และ โบนไซอะโลโปรตีน (bone sialoprotein) ปริมาณแคลเซียมสะสมที่เพิ่มมากขึ้น และปริมาตรกระดูกทั้งหมดที่เกิดขึ้น (Correia et al., 2012) และยังมีสมบัติเชิงกลซึ่งได้แก่ ค่าโมดูลัสแรงกด (Correia et al., 2012) และความแข็งแรงกดที่ดีกว่าอีกด้วย (Nazarov, Jin, and Kaplan, 2004) นอกจากนี้เมื่อวัดปริมาณเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นและเกิดการสะสมแร่ธาตุภายในโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยเครื่อง micro-computed tomography (micro-CT) พบว่าความหนาของเส้นใยกระดูกและการแยกตัวของเส้นใยกระดูกเพิ่มขึ้น (Hofmann et al., 2007) และปริมาตรกระดูกต่อปริมาตรทั้งหมดเพิ่มขึ้น (Thimm et al., 2011) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 และ 7 สัปดาห์ ตามลำดับ

ในขณะที่การศึกษาของ Kim et al. (2005) ที่เพาะเลี้ยงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกมนุษย์ในออสทีโอเจนิคมีเดียมนาน 28 วัน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากสารละลายไหมในน้ำมีเซลล์ที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสปริมาณแคลเซียม และ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก ซึ่งได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 ออสติโอพอนตินและ โบนไซอะโลโปรตีน มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากสารละลายไหมในตัวทำละลาย HFIP (Kim et al., 2005) และนอกจากนี้ยังมีค่าโมดูลัส

แรงกดที่มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณหูของกระต่าย นาน 8 สัปดาห์ (Makaya et al., 2009)

จากการศึกษาสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิติที่มีรูพรุนที่สร้างจากไฟโบรอินไหมทั้งจากสารละลายไหมในน้ำและในตัวทำละลาย HFIP พบว่ามีค่าโมดูลัสแรงกดตั้งแต่ 10 ± 3 กิโลปาสกาล (kPa) จนถึง $1,819.5 \pm 606.3$ กิโลปาสกาล (Makaya et al., 2009; Nazarov, Jin, and Kaplan, 2004) ในขณะที่ค่าโมดูลัสแรงกดของกระดูกทึบ (cortical bone) และกระดูกโปร่ง (cancellous bone) มีค่าตั้งแต่ 12-18 กิจะปาสกาล และ 0.1-0.5 กิจะปาสกาล ตามลำดับ (Wagoner Johnson and Herschler, 2011) ดังนั้นจึงมีการผสมชีววัสดุชนิดอื่นๆ ลงไป เพื่อปรับปรุงสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกของไฟโบรอินไหม ซึ่งไบโอแอคทีฟเซรามิก เป็นชีววัสดุชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก เช่น ไฮดรอกซีอะปาทาइट (Norman et al., 1994; Dong et al., 2001; Damien et al., 2003; Wilson et al., 2004) แคลเซียมฟอสเฟต (Barralet et al., 2002; Krut et al., 2004) β -TCP (von Doernberg et al., 2006; Miranda et al., 2006; Yuan et al., 2007; He et al., 2007; Xie et al., 2006; Xie et al., 2014) และ α -TCP (Oh, Lee, and Park, 2010)

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีงานนำไบโอแอคทีฟเซรามิก มาผสมกับไฟโบรอินไหมเพื่อสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิต 3 มิติที่มีรูพรุนสำหรับการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก เช่น จากการศึกษาของ Bhumiratana et al. (2013) ที่สร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตจากไฟโบรอินไหมในตัวทำละลาย HFIP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและไฮดรอกซีอะปาทาइटด้วยวิธีการขึ้นรูปด้วยตัวทำละลายและการชะล้างอนุภาคพบว่าไฮดรอกซีอะปาทาइटสามารถรวมตัวกับโครงเลี้ยงเซลล์ได้ โดยการไปเคลือบบนผิวโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้ผนังโครงเลี้ยงเซลล์มีความหนาเพิ่มขึ้น และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงกับเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์มนุษย์นาน 10 สัปดาห์ พบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่เพาะเลี้ยง แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างปริมาณไฮดรอกซีอะปาทาइटที่เติมลงไป เมื่อวัดจากปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) และการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต (Live/ Dead assay) และเมื่อศึกษาด้วย micro-CT พบว่าโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะคล้ายเส้นใยกระดูกที่มีความต่อเนื่องกันสูง นอกจากนี้เมื่อวัดโมดูลัสแรงกดพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้น ปริมาณแคลเซียมสะสมพบว่ามีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และเมื่อย้อมโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) พบว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 ออสติโอพอนดินและ โบนโอไซโทโปรตีนมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยการเพิ่มมากขึ้นนี้แปรผันตามปริมาณไฮดรอกซีอะปาทาइटที่เติมลงไป และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Bhumiratana et al., 2011)

นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากสารละลายไหมในน้ำด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง จากนั้นนำไปสร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตโดยนำไปแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) และ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) อย่างละ 1 ชั่วโมงเมื่อศึกษาลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์จาก

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สะสมบนผิวโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะเป็น dense flake-like HA crystals และเมื่อวัดอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัสด้วยเครื่อง energy dispersive x-ray (EDX) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.52 และเมื่อเพาะเลี้ยงด้วย bone marrow-derived mesenchymal stromal cell นาน 14 วัน พบว่าปริมาณเซลล์จาก MTT assay และปริมาณดีเอ็นเอมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จำนวนเซลล์ที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการแสดงออกระดับยีนของ Runx-related transcription factor 2 (Runx2) คอลลาเจนชนิดที่ 1 ออสติโอพอนตินและ ออสติโอเนกติน (osteonectin) พบว่ามีค่าเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง (Jiang et al., 2013) เมื่อทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์นาโนคอมโพสิตที่สร้างด้วยการขึ้นรูปด้วยตัวทำละลายและการทำแห้งเยือกแข็งในหนู rat พบว่ามีความเข้ากันทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี (Gholipourmalekabadi et al., 2014)

นอกจากไฮดรอกซีอะพาไทต์แล้ว ยังมีการใช้แคลเซียมฟอสเฟตเพื่อสร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิต ซึ่งจากการศึกษาของ Yan et al. (2013) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตที่ประกอบด้วยไฟโบรอินไหมและแคลเซียมฟอสเฟตที่ด้วยวิธีการชะละลายเกลือและการทำแห้งเยือกแข็ง โดยใช้สารละลายไฟโบรอินไหมในน้ำที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 และเติมแคลเซียมฟอสเฟตที่ร้อยละ 4, 8, 16 และ 25 โดยน้ำหนัก และใช้ไซเคียมคอลไรด์เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน พบว่ามีการสร้างอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตขึ้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบลักษณะของ cauliflower-like apatite cluster ที่มีขนาดเล็กกว่า 200 นาโนเมตรบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักเท่านั้น

เมื่อทำการวัดปริมาณแคลเซียมฟอสเฟตภายในโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าปริมาณแคลเซียมฟอสเฟตแปรผันตามปริมาณสารที่เติมลงไป และเมื่อทำการวัดสัดส่วนเชิงอะตอม (atomic ratio) ระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัสพบว่ามีค่าใกล้เคียง 1.67 ซึ่งมีความคล้ายกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ในเชิงองค์ประกอบทางเคมีเมื่อศึกษาถึงสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าทั้งค่าโมดูลัสแรงกดและความแข็งแรงกดไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมแคลเซียมฟอสเฟตลงไป ส่วนการประเมินสมบัติทางชีวภาพพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมแคลเซียมฟอสเฟตมีการใหญ่ขึ้นของ mineralized nuclei บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของเซลล์สร้างเส้นใยจากหนู mouse (mouse fibroblastic cell line) โดยที่ในวันที่ 7 ของการทดลองพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมแคลเซียมฟอสเฟตมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นและมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมแคลเซียมฟอสเฟตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yan et al., 2013)

เมื่อวัดปฏิกิริยาของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส คอลลาเจนชนิดที่ 1 และออสติโอแคลซิน (osteocalcin) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Zhang et al., 2010a) นอกจากนี้การเติมแคลเซียมฟอสเฟตลงไปยังส่งผลให้การเสื่อมสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV ซ้ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติม (Yan et al., 2014) และเมื่อ

ฝังในฝากระโหลกในหนู mice นาน 4 สัปดาห์ แล้วประเมินการสร้างกระดูกด้วย micro-CT พบว่ามี ปริมาตรกระดูกที่ถูกสร้างขึ้นใหม่มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่อย่างเดียวยังมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (Zhang et al., 2010b)



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัยในการทดลองนี้ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ เริ่มจากการกำจัดเซอริซินซึ่งโปรตีนที่เป็นสาเหตุของปัญหาอันไม่พึงประสงค์เกี่ยวกับความเข้ากันทางชีวภาพและภาวะภูมิแพ้ไวเกินประเภทที่ 1 จากนั้นนำไฟโบรอินใหม่ที่ได้มาผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง และนำไปใช้สำหรับการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุน

การกำจัดเซอริซินออกจากไฟโบรอิน

ขั้นตอนการกำจัดเซอริซินออกจากไฟโบรอินใหม่ในการวิจัยนี้ ดัดแปลงมาจาก Rockwood et al. (2011) ดังนี้

1. ทำความสะอาดรังไหมและตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และกำจัดหนอนไหมที่อาจตกค้างอยู่ในรังไหม
2. ต้มน้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure water) จำนวน 2 ลิตรในบีกเกอร์แก้วขนาด 4 ลิตร ที่ปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil) ต้มจนเดือด
3. ใส่ 4.24 กรัม โซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮไดรอส (sodium carbonate anhydrous) ลงในน้ำเดือดเพื่อเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.02 โมลาร์
4. หลังจากโซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮไดรอสละลายหมดแล้ว ใส่รังไหมที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1 น้ำหนัก 30 กรัม ลงในสารละลายในข้อ 3 จากนั้นต้มจนเดือดและต้มทิ้งไว้ 30 นาที ใช้แท่งแก้วคนเป็นระยะเพื่อช่วยให้การกระจายของไฟโบรอินใหม่ดีขึ้น สิ่งที่สำคัญอย่างมากคือ ระยะเวลาที่ใช้ในการต้ม เนื่องจากถ้าใช้เวลานานกว่า 30 นาที ไฟโบรอินใหม่จะถูกย่อยสลายได้
5. เมื่อครบ 30 นาทีแล้ว นำไฟโบรอินใหม่ออกจากบีกเกอร์ที่ใช้ต้ม และนำไปใส่ในบีกเกอร์แก้วขนาด 4 ลิตร แล้วเติมน้ำบริสุทธิ์สูงจำนวน 2 ลิตร และใส่แท่งกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ลงไป จากนั้นนำไปวางบนเครื่องกวนสาร (magnetic stir plate) และปั่นกวนทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อล้างไฟโบรอินใหม่อีกครั้ง โดยทำการล้างซ้ำ 2 ครั้ง
6. ทำขั้นตอนในข้อ 2 ถึง 5 ซ้ำอีก 1 ครั้ง
7. กำจัดน้ำส่วนเกินออกจากไฟโบรอินใหม่ และนำไปวางบนแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ที่สะอาด จากนั้นทิ้งให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน
8. ชั่งน้ำหนักไฟโบรอินใหม่ที่แห้งซึ่งไหมที่กำจัดเซอริซินออกแล้วเรียกว่า degummed silk fibroin สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าต้องการเก็บเป็นเวลานาน ควรเก็บในถุงพลาสติกที่สะอาดหรือห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์แทน

การละลายไฟโบรอินใหม่

การละลายไฟโบรอินในการศึกษานี้ใช้สารละลายที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (calcium chloride dihydrate) น้ำ และ เอทานอล ที่อัตราส่วน โมลเท่ากับ 1:8:2 (Ajisawa, 1998) ซึ่งทำการเตรียมไว้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากผสมแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตจำนวน 65.44 กรัม กับ น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 48 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์แก้วขนาด 200 มิลลิลิตร บน เครื่องกวนสาร โดยใส่แท่งกวนแม่เหล็กในบีกเกอร์แก้ว หลังจากปั่นกวนจนแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตละลายน้ำหมดแล้วจะได้สารละลายใสไม่มีสี จากนั้นจึงเติมเอทานอลปริมาตร 52 มิลลิลิตรลงไป และปั่นกวนต่อจนละลายเข้ากัน สารละลายที่ได้มีลักษณะใสไม่มีสี และหนืดเล็กน้อย จากนั้นทำการละลายไฟโบรอินใหม่ที่อัตราส่วนร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยทำการละลายในขวดแก้วที่มีฝาปิดในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Kuboyama et al., 2013) สารละลายไฟโบรอินใหม่ที่ได้มีสีเหลืองอำพัน มีความหนืดมากและ เมื่อประเมินด้วยสายตาจะต้องไม่มีลักษณะของเส้นใยหลงเหลืออยู่

การแยกสารผ่านเยื่อและการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) สารละลายไฟโบรอินใหม่

การปั่นเหวี่ยงสารละลายไฟโบรอินใหม่ดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Rockwood et al. (2011) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เริ่มจากตัดเยื่อไดอะไลซิส (dialysis membrane) ให้มีความยาวประมาณ 12-15 เซนติเมตร แล้วจากนั้นทำตามวิธีการของบริษัทเพื่อให้ได้เยื่อไดอะไลซิสที่มี molecular weight cut off เท่ากับ 12,000 ดังนี้ เริ่มจากล้างเยื่อไดอะไลซิสในน้ำ 3-4 ชั่วโมง เพื่อกำจัดกลีเซอรอล (glycerol) จากนั้นต้มในสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ (sodium sulfide) ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพื่อกำจัดสารประกอบซัลเฟอร์ แล้วจึงนำไปล้างใน น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นปรับค่าพีเอชของเยื่อไดอะไลซิสให้เป็นกรด ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และสุดท้ายนำเยื่อกรองไปล้างน้ำอุ่น เพื่อกำจัดเอากรดออก

จากนั้นดูดสารละลายไฟโบรอินใหม่ที่ได้ในขั้นตอนที่แล้วใส่ในเยื่อไดอะไลซิสที่ถูกทำให้มีลักษณะเป็นถุงโดยใส่ถุงละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรองในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนเครื่องกวนสารและใส่แท่งกวนแม่เหล็กลงไปด้วย จากนั้นทำการปั่นกวนและทำการเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนทุก 24 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง โดยนำน้ำที่ผ่านการกรองไปวัดการนำไฟฟ้าด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้า เมื่อครบกำหนดระยะเวลาแล้วนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดรูปกรวย (conical tube) สำหรับปั่นเหวี่ยงหลอดละ 20

มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนออกจากสารละลายไฟโบรอินใหม่

จากนั้นเทสารละลายไฟโบรอินใหม่ใส่ในหลอดรูปกรวยสำหรับปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ เพื่อทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหลังจากนั้นวัดค่าร้อยละความเข้มข้นของไฟโบรอินใหม่ในสารละลายโดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งน้ำหนักอะลูมิเนียมฟอยล์ก่อน จากนั้นหยดสารละลายไฟโบรอินใหม่ 1 มิลลิลิตรลงบนอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นนำไปทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วชั่งน้ำหนักไฟโบรอินใหม่ที่แห้ง

สารละลายไฟโบรอินใหม่ที่ได้ควรมีสีเหลืองอ่อน ใส มีความหนืดมากกว่าน้ำ และสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 1 เดือน หลังจากนั้นจะกลายเป็นเจล ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้งานต่อได้ (Rockwood et al., 2011)

การทำแห้งเยือกแข็ง

การทำแห้งเยือกแข็งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเก็บสารละลายไฟโบรอินใหม่ไว้ยาวนานกว่า 1 เดือน เนื่องจากเป็นรูปแบบที่ใหม่มีความคงตัวอยู่ได้นานหลายปี ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถคืนสภาพเป็นสารละลายได้ใน HFIP ซึ่งการทำแห้งเยือกแข็งในงานวิจัยนี้ดัดแปลงจาก Rockwood et al. (2011) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ใส่สารละลายไฟโบรอินใหม่ในหลอดรูปกรวยขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใส่ไม่เกิน 25 มิลลิลิตรต่อหลอด แล้วใช้แผ่นพาราฟิล์ม (Parafilm) ปิดที่ปากหลอด และเจาะรูบนแผ่นพาราฟิล์มจากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายถูกแช่แข็ง แล้วจึงนำเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง ประมาณ 2-3 วัน จนกระทั่งน้ำถูกกำจัดออกหมด เมื่อครบเวลาแล้วนำออกจากเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง ปิดฝาและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุน

งานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นของไฟโบรอินใหม่ต่อตัวทำละลาย HFIP ร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Bhumiratana et al., 2013) และใช้น้ำตาลซูโครสที่มีขนาด 250-450 ไมโครเมตร เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ซึ่งขั้นตอนการเลือกความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในงานวิจัยมีดังนี้

1. เตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ในตัวทำละลาย HFIP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในบีกเกอร์แก้วที่ใส่แท่งกวนแม่เหล็กลงไปด้วย และปิดปากบีกเกอร์ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปวางบนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นกวนจนไฟโบรอินใหม่ละลายจนหมด

2. ชั่งน้ำตาลซูโครสตามความเข้มข้นดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 เท่าของน้ำหนักไฟโบรอินใหม่

3. เหน้ตาลชูโครสลงในบีกเกอร์สารละลายไฟโบรอินใหม่ในข้อ 1 จากนั้นใช้แท่งแก้วกวาดสาร ผสมน้ำตาลให้เป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย โดยทำการผสมในตู้ดูดควัน (fume hood)

4. เทลงในแบบหล่อที่ทำจากพอลิสไตรีน (polystyrene) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตร สูง 18 มิลลิเมตร จากนั้นปิดฝาเพื่อลดการระเหยของตัวทำละลาย และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการก่อตัว (set) ของโครงเลี้ยงเซลล์

5. เปิดฝาเพื่อระเหยตัวทำละลายในอากาศ เป็นระยะเวลา 2 วัน

6. แช่แบบหล่อที่มีโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ในเมธานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแผ่นบีต้าขึ้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์

7. แกะโครงเลี้ยงเซลล์ออกจากแบบหล่อ

8. แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในน้ำปราศจากไอออนเพื่อละลายน้ำตาลชูโครสออกมาจากโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเปลี่ยนน้ำ 2-3 ครั้งต่อวัน เป็นระยะเวลา 2-3 วัน และวัดการนำไฟฟ้าของน้ำด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้าทุกครั้งที่ทำกรเปลี่ยนน้ำ

9. ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความสูง 5-7 มิลลิเมตร จากนั้นทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 วัน

10. หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลชูโครส และค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งจะอธิบายในรายละเอียดในขั้นตอนต่อไป

11. เมื่อได้ความเข้มข้นของน้ำตาลชูโครสที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์โดยในขั้นตอนแรกหลังจากไฟโบรอินใหม่ละลายหมดแล้ว ให้เติม α -TCP ลงในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก โดยใช้เวลาในการปั่นกวนนาน 15 นาที จากนั้นจึงเติมน้ำตาลชูโครส และดำเนินตามขั้นตอนในข้อที่ 3-9 ต่อไป

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้เป็น โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่สร้างได้ ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยที่กลุ่มควบคุมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP (SF) ในขณะที่กลุ่มทดลองเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (SF/TCP -4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16 ตามลำดับ) และทำการเลือกโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) เพื่อนำไปศึกษาเกี่ยวกับ

1. ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ จำนวน 1 ชั้นต่อกลุ่ม
2. ค่าร้อยละรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ จำนวน 5 ชั้นต่อกลุ่ม
3. ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ จำนวน 5 ชั้นต่อกลุ่ม

4. ปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่อยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ จำนวน 1 ชั้นต่อกลุ่ม
5. ค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ จำนวน 5 ชั้นต่อกลุ่ม
6. ปฏิกริยาของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ จำนวน 1 ชั้นต่อกลุ่ม
7. การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ที่ 6 24 72 และ 120 ชั่วโมง จำนวน 24 ชั้นต่อกลุ่ม

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. รางใหม่ไทยสปีชีส์ *B. mori* สายพันธุ์ผสมระหว่างสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษและสายพันธุ์ม.
2. น้ำตาลซูโครส
3. บีกเกอร์แก้วขนาด 4 ลิตร
4. บีกเกอร์แก้วขนาด 200 มิลลิลิตร
5. บีกเกอร์แก้วขนาด 20 มิลลิลิตร
6. ขวดแก้วที่มีฝาปิด
7. แท่งแก้วคนสาร
8. แท่งกวนแม่เหล็ก
9. ซ้อนดวงสาร
10. กระบอกตวง (cylinder)
11. หลอดรูปกรวยความจุ 50 มิลลิเมตร
12. อะลูมิเนียมฟอยล์
13. กรรไกร
14. เชื้อโคอะไลซิส (MWCO: 12,000; Sigma-Aldrich, USA).
15. พาราฟิล์ม
16. แบบหล่อพอลิสไตรีนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตร สูง 18 มิลลิเมตร
17. เครื่องกวนสาร
18. ตู้ดูดควัน
19. ตู้อบที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส (Wise Cube[®] WIG Digital incubator WIG-155; Daihan Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)
20. เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (CDM 230 conductivity meter MeterLab[®]; Radiometer Analytical, France)
21. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Avanti J-E; Beckman Coulter Inc, USA)

22. ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Premium U570; Eppendorf Inc, Germany)
23. เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilizer) (Christ Gamma 2-16 LSC; SciQuip, UK)
24. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (GR-200; A&D Co., Ltd., Japan)
25. SEM (Quanta 250; FEI, USA)
26. SEM-EDX (scanning electron microscopy/energy-dispersive X-ray spectroscopy) (JSM-6610LV; JEOL Ltd, Japan)
27. กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ (inverted phase contrast microscope) (Olympus CK2; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)
28. เครื่องทดสอบแรงอัด Shimadzu 500 N (EZ Test; Shimadzu, Japan)
29. ตระแกรงแยกสาร (sieve) ที่มีขนาดช่องว่าง 250 และ 450 ไมโครเมตร (Retsch Technology GmbH; Haan, Germany)
30. เครื่องแยกสารด้วยตระแกรง (sieve shaker) (AS 200 digit; Retsch Technology GmbH; Haan, Germany)
31. เครื่องเขย่า (shaker) (Orbital shaker S03; Stuart Scientific, Staffordshire, England)
32. เวลเพลท (well plate) ก้นหลุมแบน ชนิด 48 และ 96 หลุม (Corning™ Costar™; Sigma-Aldrich, USA)
33. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. โซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต
3. เอทานอล
4. โซเดียมซัลไฟด์
5. กรดซัลฟูริก
6. HFIP (Merck, Germany)
7. เมทานอล
8. α -TCP (Sigma-Aldrich, Switzerland)
9. เซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ (human gingival fibroblast) พาสเซจ (passage) ที่ 5
10. น้ำยาเลี้ยงเซลล์ดัลเบคโคซิมมอดิฟายด์อีเกิลมีเดีย (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
11. โบวายซีรัม (bovine serum) (Invitrogen, USA)
12. แอล-กลูตามีน (L-glutamine) (Invitrogen, USA)

13. ยาปฏิชีวนะและยาด้านเชื้อรา (antibiotic and antimycotic solution) (Invitrogen, USA)
14. ขี้ผึ้งเหนียว (sticky wax)
15. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
16. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
17. กลูตารัลดีไฮด์ (glutaldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 4
18. น้ำบริสุทธิ์สูง
19. น้ำปราศจากไอออน
20. เฮกเซน (hexane)
21. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
22. โซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต (sodium citrate dehydrate)
23. Hoechst stain

การเก็บรวบรวมข้อมูล

สมบัติทางกายภาพ

1. ขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์

นำโครงเลี้ยงเซลล์มาตัดขวาง จากนั้นนำไปติดบนสตัดป์ทองเหลือง และนำไปเคลือบด้วยทอง จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะของรูพรุนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 35 เท่า และวัดขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์

2. ค่าร้อยละรูพรุน

การวัดความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ใช้วิธีการแทนที่ของของเหลว (liquid displacement) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้เฮกเซน เนื่องจากเฮกเซนสามารถซึมผ่านเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ได้โดยไม่ทำให้เกิดการบวมน้ำหรือหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งขั้นตอนเป็นดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักเฮกเซนที่ใส่อยู่ในหลอดรูปกรวย (W_1)
2. ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ลงไปลงในเฮกเซนและแช่ไว้นาน 1 นาที
3. ชั่งน้ำหนักเฮกเซนและโครงเลี้ยงเซลล์ (W_2)
4. นำโครงเลี้ยงเซลล์ออกจากเฮกเซน
5. ชั่งน้ำหนักเฮกเซนที่คงเหลืออยู่ในหลอดรูปกรวย (W_3)

6. เปลี่ยนน้ำหนักของเฮกเซนทั้ง W_1 , W_2 และ W_3 เป็นปริมาตร V_1 , V_2 และ V_3 ตามลำดับ โดยคำนวณจากสูตร ปริมาตร = น้ำหนัก / ความหนาแน่น โดยที่ความหนาแน่นของเฮกเซนเท่ากับ 0.6548 กรัมต่อมิลลิเมตร

7. คำนวณค่าร้อยละรูพรุนจากสูตร

$$\text{Porosity (\%)} = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)$$

3. ความหนาแน่น

ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์คำนวณจากสูตร

ความหนาแน่น = มวลของโครงเลี้ยงเซลล์ (กรัม) / ปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ (ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)

ส่วนปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาตร} = 22/7 \times (\text{รัศมี})^2 \times \text{ความสูง}$$

โดยที่ทั้งรัศมีและความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์วัดโดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper) ซึ่งความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์วัดทั้งในสถานะแห้งและสถานะชุ่มน้ำ โดยที่ในสถานะชุ่มน้ำนั้น นำโครงเลี้ยงเซลล์แช่ในน้ำปราศจากประจุจนชุ่มน้ำ จากนั้นซับให้แห้งด้วยกระดาษเป็นจำนวน 5 ครั้ง แล้วจึงนำมาวัดรัศมีและความสูง

4. ปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในโครงเลี้ยงเซลล์

นำโครงเลี้ยงเซลล์มาตัดขวาง จากนั้นนำไปติดบนสตัปทองเหลือง และนำไปเคลือบด้วยคาร์บอน จากนั้นนำไปหาส่วนประกอบของแคลเซียมและฟอสฟอรัสด้วย SEM/EDX ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยใช้พลังงานกระตุ้น 15 kV และทำการสั้ววัด 5 ตำแหน่งโดยเลือกตำแหน่งที่มุมทั้งสี่และกึ่งกลางของชิ้นโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งผลการตรวจสอบปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติด้วยกล้อง SEM/EDX สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ข้อมูลเชิงคุณภาพ และข้อมูลเชิงปริมาณ โดยที่ข้อมูลเชิงคุณภาพที่ได้นั้นจะแสดงในรูปแบบของกราฟที่มีพีค (peak) ของแร่ธาตุต่างๆ โดยที่แกน y แสดงถึง intensity หรือจำนวนครั้งที่ยิงรังสีเอ็กซ์ และแกน x แสดงถึงค่าพลังงานที่อิเล็กตรอนปลดปล่อยออกมาซึ่งอยู่ในหน่วย keV ในขณะที่ข้อมูลเชิงปริมาณนั้นจะแสดงออกมาในรูปแบบของตารางร้อยละของแร่ธาตุในหน่วย weight% และ atomic% ซึ่งความเข้มข้นนี้คำนวณมาจากพื้นที่ใต้กราฟโดยโปรแกรมภายในเครื่อง EDX

สมบัติเชิงกล

สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกศึกษาในสถานะชุ่มน้ำ โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์แช่ในน้ำปราศจากประจุจนชุ่มน้ำ และซบให้แห้งด้วยกระดาษเป็นจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงก่อนนำไปวัดค่าโมดูลัสแรงกดด้วยเครื่อง Shimadzu 500 N โดยใช้แรงกด 0.1 กิโลนิวตัน ความเร็วหัวกด 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที และค่า strain ที่ร้อยละ 10 (Correia et al., 2012)

สมบัติเชิงชีววิทยา

สมบัติเชิงชีววิทยาในการศึกษานี้ใช้เซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ พาสเซจที่ 5 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ทดสอบชีววัสดุ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยคัลเบค โคล์มอดิฟายด์อีเกิลมีเดียม ร้อยละ 88, โบวายซีรัม ร้อยละ 10, แอล-กลูตามีน ร้อยละ 1, และ ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา ร้อยละ 1

1. ปฏิกิริยาของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ถูกตัดให้มีขนาดประมาณ $1 \times 5 \times 0.5$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากนั้นแต่ละชิ้นถูกยึดในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยขี้ผึ้งเหนียวซึ่งใช้ชิ้นส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์จำนวน 3 ชิ้นต่อหนึ่งกลุ่ม จากนั้นใส่เซลล์ที่ความเข้มข้น 30,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงบนชั้นของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง และศึกษาปฏิกิริยาของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ

2. การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร ถูกตัดให้มีความสูง 2 มิลลิเมตร และใส่ไว้ใน 48 เวลเพลท (well plate) จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการอบแก๊สเอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide) หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยดลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อช่วยให้เซลล์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีขึ้น หลังจากนั้นย้ายโครงเลี้ยงเซลล์ไปยังเวลเพลทใหม่ และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปหุลุมละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด เป็นเวลา 5 วัน และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน หลังจากนั้นเก็บโครงเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลาดังต่อไปนี้ หลังหยดเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ทันที 6 ชั่วโมง และ 1 3

และ 5 วัน โดยที่ 4 แถวแนวนอนใช้สำหรับการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น และอีก 2 แถวแนวนอนใช้สำหรับศึกษาภายใต้ SEM ที่กำลังขยาย 700 1,500 และ 3,000 เท่า

สำหรับการวัดปริมาณดีเอ็นเอนั้น เมื่อถึงตามกำหนดระยะเวลาการเก็บ โครมเล็งเซลล์ โครมเล็งเซลล์และ cell standard ถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่ -80 องศาเซลเซียสและถูกปล่อยให้ละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิห้องเป็นจำนวนหลายรอบ เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออกก่อนหลังจากนั้นตัดโครมเล็งเซลล์ออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเติม SDS lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในแต่ละโครมเล็งเซลล์และ cell standard ซึ่ง SDS lysis buffer เตรียมจากการผสมกันระหว่าง SDS จำนวน 20 มิลลิกรัม และสารละลาย SSC ที่ความเข้มข้น 20 เท่า ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 95 มิลลิลิตร ส่วนสารละลาย SSC ที่ความเข้มข้น 20 เท่าเตรียมได้จากการละลายโซเดียมคลอไรด์จำนวน 17.999 กรัม และโซเดียมซเตรทไดไฮดเรตจำนวน 8.823 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากนั้น sonicate และนำเข้าตู้เย็นเยื่อหุ้มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์และได้ cell lysate เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปจากนั้นทำ serial dilution ของ cell standard ด้วย SDS lysis buffer เพื่อให้ได้ cell standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากนั้นดูด cell lysate, cell standard และน้ำปราศจากไอออน (เพื่อใช้เป็น blank) ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงไปในเวลเพลทชนิด 96 หลุม ต่อจากนั้นสารละลาย Hoechst 33258 ถูกเติมลงไปปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งสารละลายชนิดนี้เตรียมได้จากการผสม Hoechst ปริมาตร 20 ไมโครลิตร น้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 19 มิลลิลิตร และสารละลาย SSC ความเข้มข้น 20 เท่าปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งหลังจากเติมสารละลายHoechst 33258 แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอทันทีด้วย fluorescent microplate reader ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

การวัดปริมาณดีเอ็นเอนั้น เริ่มจากการวัดในสารละลายมาตรฐานที่ทราบจำนวนเซลล์ที่แน่นอนก่อน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) และสมการเส้นตรง โดยที่กราฟมาตรฐานนั้นมีแกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน และแกนนอนเป็นจำนวนเซลล์ หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากโครมเล็งเซลล์สามมิติ มาคำนวณกลับเป็นจำนวนเซลล์โดยใช้สมการเส้นตรงที่ได้ และนำข้อมูลที่ได้สร้างเป็นกราฟแท่งเพื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มและในแต่ละระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

สำหรับการศึกษาภายใต้ SEM นั้น เมื่อครบระยะเวลาแต่ละช่วงแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นใส่กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 4 ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนท่วมชิ้นของโครมเล็งเซลล์ และทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดกลูตารัลดีไฮด์ออกให้หมด และล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง และแช่ทิ้งไว้จนกว่าจะนำไปศึกษาภายใต้ SEM ที่กำลังขยาย 700 1,500 และ 3,000 เท่า

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่รวบรวมถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยเริ่มที่การทดสอบการแจกแจงข้อมูลขนาดรูพรุนของ โคร่งเลี้ยงเซลล์ด้วยสถิติKolmogorov-Smirnovในขณะที่ข้อมูลเกี่ยวกับค่าร้อยละรูพรุน ความหนาแน่น และสมบัติเชิงกลของ โคร่งเลี้ยงเซลล์ทดสอบการแจกแจงด้วยสถิติ Shapiro-Wilk จากนั้นนำมาทดสอบค่าเฉลี่ยด้วยสถิติone-way ANOVA และนำมาทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ Dunnett's test สำหรับข้อมูลค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนของ โคร่งเลี้ยงเซลล์ และสถิติScheffe สำหรับค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุน ค่าเฉลี่ยความหนาแน่น ค่าเฉลี่ยสมบัติเชิงกล และค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ส่วนปฏิกิริยาของเซลล์ต่อ โคร่งเลี้ยงเซลล์นำเสนอข้อมูลเชิงคุณภาพ



บทที่ 4

ผลการวิจัย

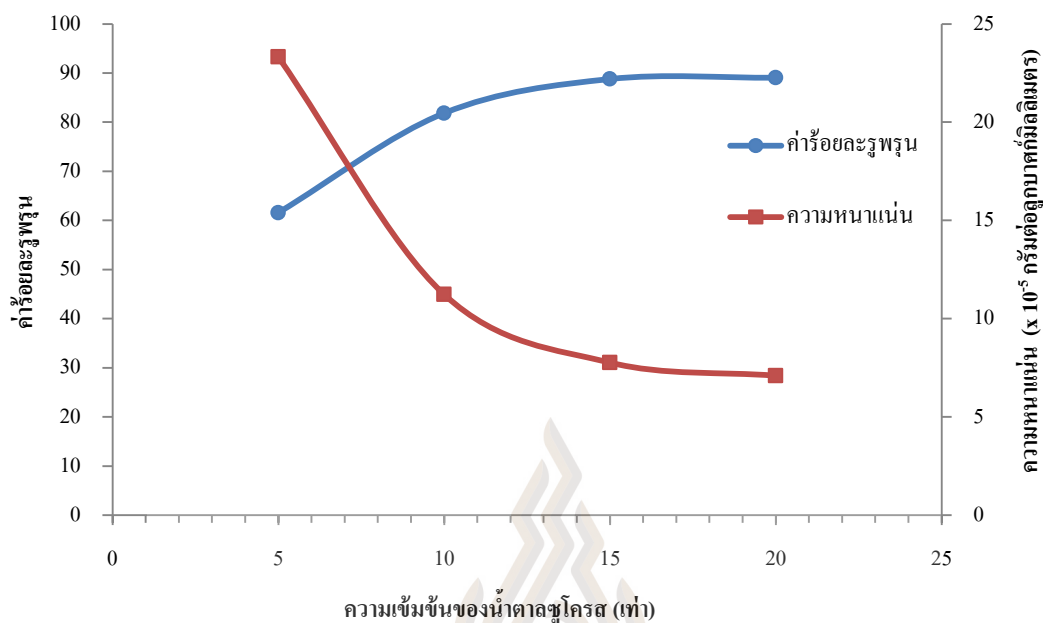
ผลการวิจัยของการทดลองนี้แบ่งออกเป็นดังนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการทดลอง และการวิเคราะห์โครมเลียงเซลล์คอมโพลิตสามมิติที่มีรูพรุน

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการสร้างโครมเลียงเซลล์คอมโพลิตสามมิติที่มีรูพรุน ได้จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครมเลียงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุน ซึ่งพบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของโครมเลียงเซลล์มีค่าเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไป ในขณะที่ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครมเลียงเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มมากขึ้น ดังตารางที่ 3 และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครมเลียงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุน พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมกับการวิจัยนี้คือ 7 เท่าของน้ำหนักโฟโบรินใหม่ ดังแผนภูมิที่ 1

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และ ค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครมเลียงเซลล์

ความเข้มข้นของ น้ำตาลซูโครส(เท่า)	ค่าร้อยละรูพรุน ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความหนาแน่น ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)
5	61.58 ± 3.43	23.32 ± 1.37
10	81.83 ± 5.12	11.23 ± 2.93
15	88.78 ± 2.53	7.76 ± 1.40
20	89.05 ± 0.90	7.10 ± 0.46



แผนภูมิที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และ ค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์

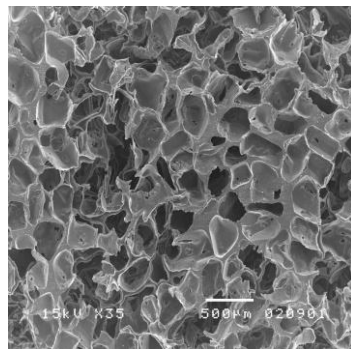
ผลการวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์

สมบัติทางกายภาพ

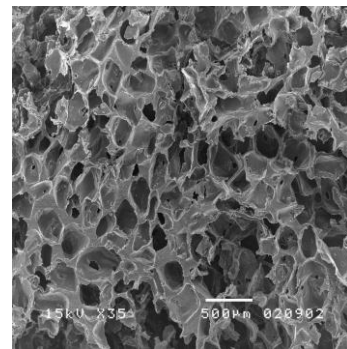
1. ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์

เมื่อศึกษาขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่ กำลังขยาย 35 เท่าพบว่ารูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะค่อนข้างเหลี่ยม มีความต่อเนื่องกันโดยตลอด และไม่มีรูพรุนขนาดเล็กภายในผนังของรูพรุน ดังภาพที่ 5 และเมื่อวัดขนาดรูพรุนด้วยโปรแกรม SemAfore version 5.21 จากการสุ่มวัด 5 screen ในแต่ละกลุ่มพบว่าขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 102.97 – 500.14 ไมโครเมตร โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เดิม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนเล็กที่สุด ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เดิม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดดังตารางที่ 4

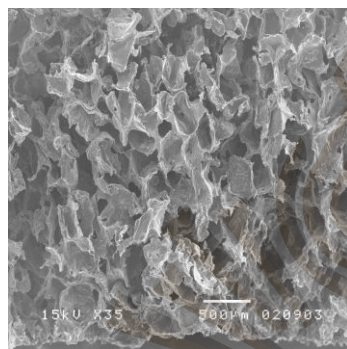
เมื่อทดสอบการแจกแจงข้อมูลด้วยสถิติ Kolmogorov-Smirnov พบว่า ข้อมูลมีการแจกแจงปกติ จากนั้นทดสอบค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างน้อย 1 คู่ที่ p -value < 0.05 และเมื่อทดสอบ Post-hoc ด้วย Dunnett's test พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p -value < 0.05 ดังตารางที่ 4



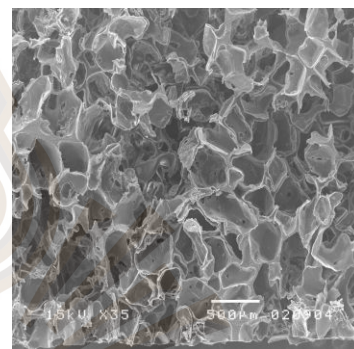
SF



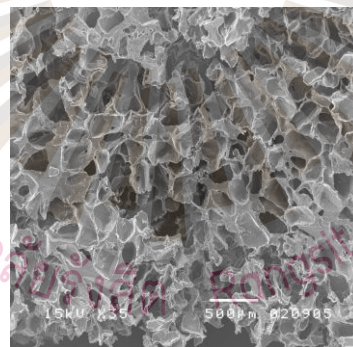
SF/TCP-4



SF/TCP-8



SF/TCP-12



SF/TCP-16

ภาพที่ 5 ลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่ กำลังขยาย 35 เท่า (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดย น้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนของ โครงเลี้ยงเซลล์ (n=5)

กลุ่ม	ขนาดรูพรุน \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ไมโครเมตร)
SF	273.45 \pm 58.77
SF/TCP-4	255.84 \pm 54.88 ^a
SF/TCP-8	240.93 \pm 61.17 ^b
SF/TCP-12	300.71 \pm 85.25 ^{a, b, c}
SF/TCP-16	245.06 \pm 48.69 ^c

(SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

a = ค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนในกลุ่ม SF/TCP-4 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

b = ค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนในกลุ่ม SF/TCP-8 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

c = ค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนในกลุ่ม SF/TCP-12 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

2. ค่าร้อยละรูพรุนของ โครงเลี้ยงเซลล์

ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของ โครงเลี้ยงเซลล์มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 67.74 - 86.88 เมื่อพิจารณาตามกลุ่ม พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนมากที่สุดคือร้อยละ 85.12 \pm 0.87 ในขณะที่ โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนน้อยที่สุดคือ 77.15 \pm 6.54 ดังตารางที่ 5

เมื่อทดสอบการแจกแจงข้อมูลด้วยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่า ข้อมูลมีการแจกแจงปกติ จากนั้นทดสอบค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของ โครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของ โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05 และเมื่อทดสอบ Post-hoc ด้วย Scheffe test พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของ โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ โครงเลี้ยง

เซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 และ 12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักที่ p-value < 0.05 ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (n = 5)

กลุ่ม	ค่าร้อยละรูพรุน \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
SF	78.65 \pm 2.46
SF/TCP-4	85.12 \pm 0.87 ^{a,b}
SF/TCP-8	78.11 \pm 2.61 ^a
SF/TCP-12	77.15 \pm 6.54 ^b
SF/TCP-16	82.72 \pm 2.41

(SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

a = ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนในกลุ่ม SF/TCP-4 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

b = ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนในกลุ่ม SF/TCP-4 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

3. ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์

ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีค่ามากที่สุดคือ $16.53 \pm 4.93 \times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นน้อยที่สุดคือ $8.83 \pm 0.85 \times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรเมื่อทดสอบการแจกแจงข้อมูลด้วยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงปกติ จากนั้นทดสอบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างน้อย 1 คู่ที่ p-value < 0.05 และเมื่อทดสอบ Post-hoc ด้วย Scheffe test พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05 ดังตารางที่ 6

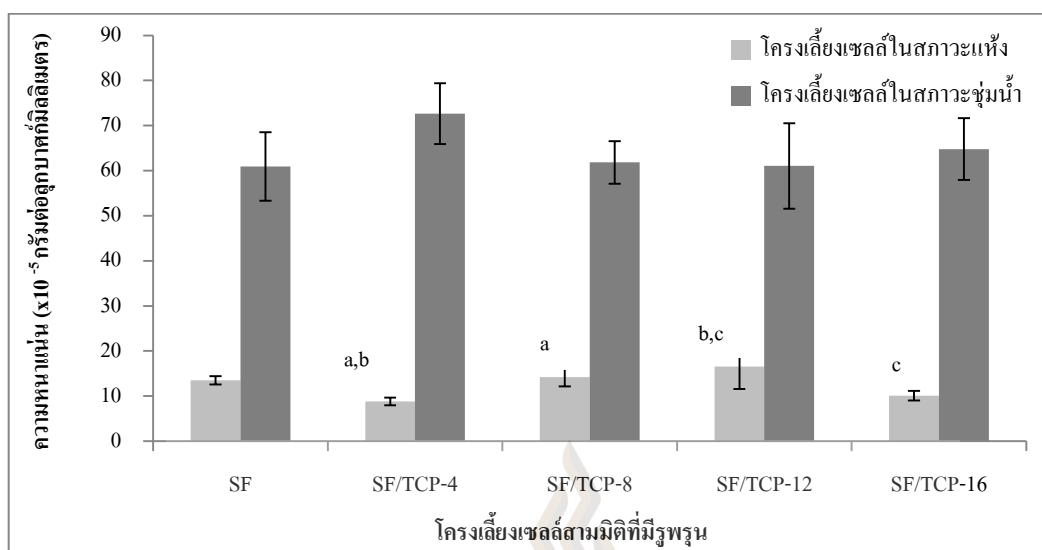
ส่วนค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะชุ่มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะชุ่มน้ำ

มากที่สุดคือ $72.63 \pm 6.77 \times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่ได้เติม α -TCP มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะชุ่มน้ำน้อยที่สุดคือ $60.93 \pm 7.60 \times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรเมื่อทดสอบการแจกแจงข้อมูลด้วยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงปกติ จากนั้นทดสอบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะชุ่มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะชุ่มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} = 0.092$ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งในสภาวะแห้งและสภาวะชุ่มน้ำ ($n = 5$)

กลุ่ม	ความหนาแน่นในสภาวะแห้ง ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ความหนาแน่นในสภาวะชุ่มน้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\times 10^{-5}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)
SF	13.52 ± 0.94	60.93 ± 7.60
SF/TCP-4	$8.83 \pm 0.85^{a,b}$	72.63 ± 6.77
SF/TCP-8	14.22 ± 2.09^a	61.84 ± 4.72
SF/TCP-12	$16.53 \pm 4.93^{b,c}$	61.05 ± 9.48
SF/TCP-16	10.10 ± 1.07^c	64.79 ± 6.86

เมื่อนำค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งและสภาวะชุ่มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์มาเปรียบเทียบกันพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักสามารถอุ้มน้ำได้มากที่สุดถึง 8.22 เท่า รองลงไปคือโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักที่สามารถอุ้มน้ำได้ 6.42 เท่า ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักสามารถอุ้มน้ำได้ 4.51 และ 4.35 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักอุ้มน้ำได้น้อยที่สุดเพียง 3.69 เท่า ดังแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 กราฟแท่งเปรียบเทียบระหว่างความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งในสภาวะแห้งและชุ่มน้ำเพื่อแสดงความสามารถในการอุ้มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

(SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP-8, SF/TCP-12 และ SF/TCP-16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

a = ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งในกลุ่ม SF/TCP-4 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

b = ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งในกลุ่ม SF/TCP-4 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

c = ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสภาวะแห้งในกลุ่ม SF/TCP-12 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

4. ปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการตรวจสอบประเภทของแร่ธาตุที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์เชิงคุณภาพด้วยกล้อง SEM/EDX พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติมและไม่เติม α -TCP ประกอบด้วยแร่ธาตุพื้นฐาน 3 ชนิด ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และออกซิเจน ซึ่งยอด peak ที่แสดงออกมานั้นมีค่าพลังงานเท่ากับ 0.277, 0.392 และ 0.523 keV ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าพลังงานที่ปลดปล่อยออกมาจากอิเล็กตรอนชั้น K_{α_1} ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแสดงยอด peak ของแคลเซียมจำนวน 3 peaks ซึ่งแต่ละ peak มีค่าพลังงานเท่ากับ 0.341, 3.691 และ 4.013 keV ซึ่งเป็นค่าพลังงานที่ปลดปล่อยออกมาจากอิเล็กตรอนชั้น L_{α_1} , K_{α_1} และ K_{β_1} ตามลำดับ

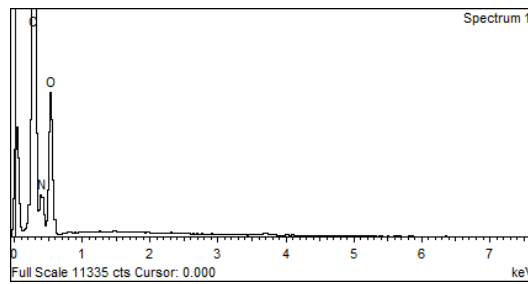
นอกจากนี้ยังแสดงยอด peak ของฟอสฟอรัสจำนวน 1 peak ซึ่งมีค่าพลังงาน 2.013 keV ซึ่งเป็นค่าพลังงานที่ปลดปล่อยออกมาจากอิเล็กตรอนชั้น $K_{\alpha 1}$ ดังภาพที่ 6

ในขณะที่ผลการวัดปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสมากที่สุดคือ 0.87 ± 0.47 weight % และ 0.41 ± 0.29 weight % ตามลำดับ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสน้อยที่สุดคือ 0.47 ± 0.05 weight % และ 0.03 ± 0.06 weight % ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

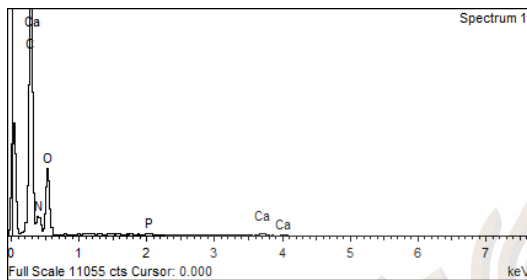
ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสใน โครงเลี้ยงเซลล์ (n = 1)

กลุ่ม	ปริมาณแคลเซียม	ปริมาณฟอสฟอรัส
	\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (weight %)	\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (weight %)
SF	0	0
SF/TCP-4	0.47 ± 0.05	0.03 ± 0.06
SF/TCP-8	0.87 ± 0.47	0.41 ± 0.29
SF/TCP-12	0.66 ± 0.15	0.37 ± 0.15
SF/TCP-16	0.79 ± 0.34	0.38 ± 0.21

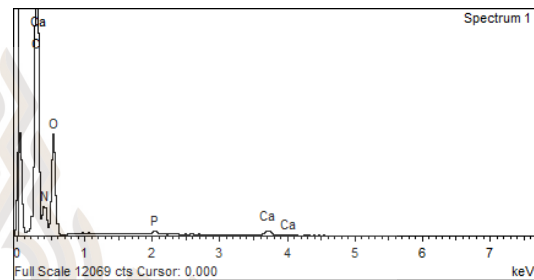
(SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)



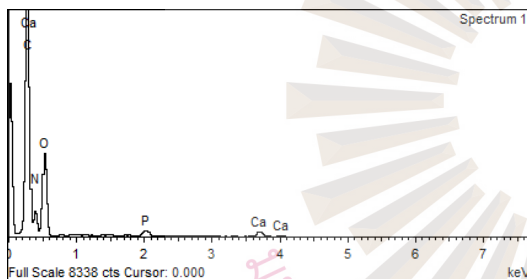
SF



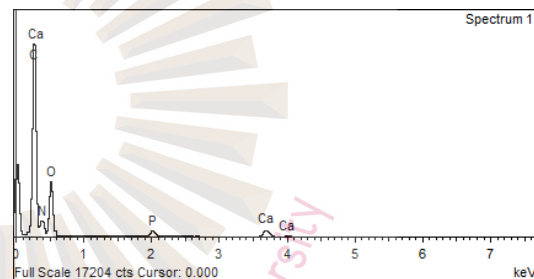
SF/TCP-4



SF/TCP-8



SF/TCP-12



SF/TCP-16

ภาพที่ 6 ประเภทของแร่ธาตุที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์จากกล้อง SEM/EDX ซึ่งแสดงยอด peak ของคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน แคลเซียมและฟอสฟอรัส โดยที่แกน y แสดงถึง intensity (count) และแกน x แสดงถึงค่าพลังงานที่อิเล็กตรอนปลดปล่อยออกมาซึ่งอยู่ในหน่วย keV

(SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์

ค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่ามากที่สุดคือ 64.84 ± 16.65 กิโลปาสกาล ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดน้อยที่สุดคือ 14.13

± 3.61 กิโลปาสกาล ดังตารางที่ 8 เมื่อทดสอบการแจกแจงข้อมูลด้วยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่า ข้อมูลมีการแจกแจงปกติ จากนั้นทดสอบค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างน้อยน้อย 1 คู่ ที่ $p\text{-value} < 0.05$ และเมื่อทดสอบ Post-hoc ด้วย Scheffe test พบว่า ค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีความแตกต่างกับโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ ($n = 5$)

กลุ่ม	ค่าโมดูลัสแรงกด \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (กิโลปาสกาล)
SF	57.00 ± 9.16^a
SF/TCP-4	38.21 ± 11.57
SF/TCP-8	64.84 ± 16.65^b
SF/TCP-12	41.25 ± 13.77
SF/TCP-16	$14.13 \pm 3.61^{a,b}$

(SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

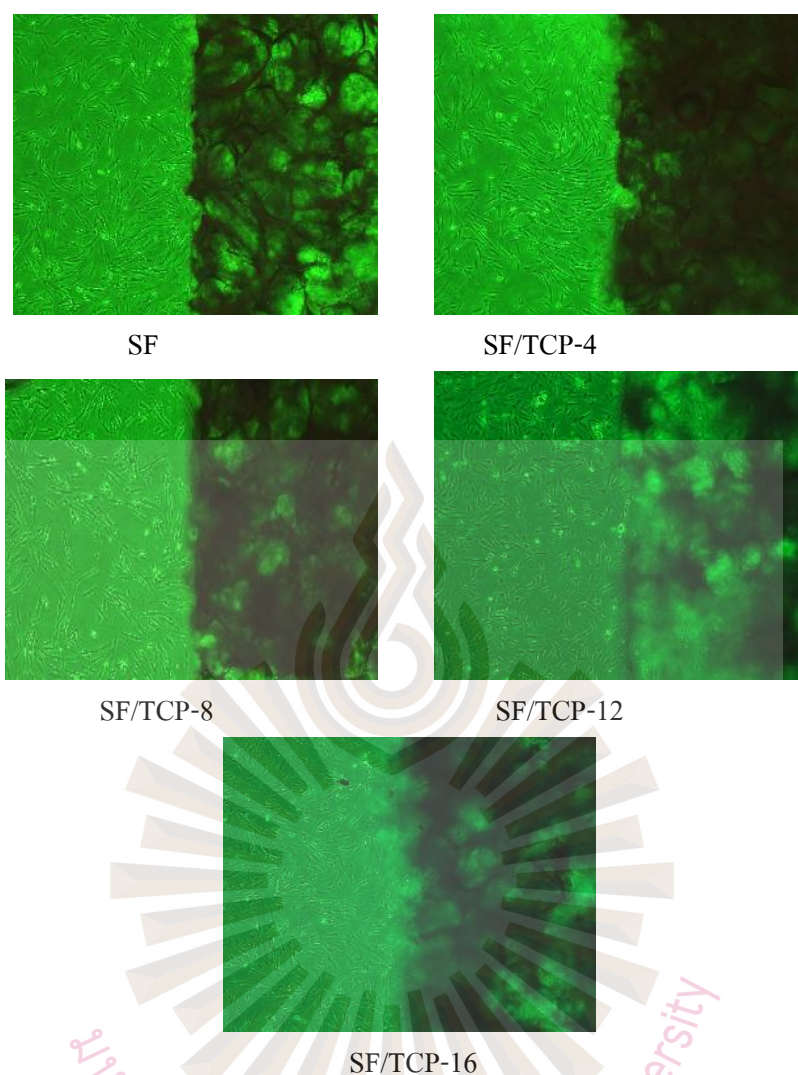
a = ค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดในกลุ่ม SF แตกต่างอย่างจากกลุ่ม SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

b = ค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดในกลุ่ม SF/TCP-8 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

สมบัติเชิงชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์

1. ปฏิกริยาของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์

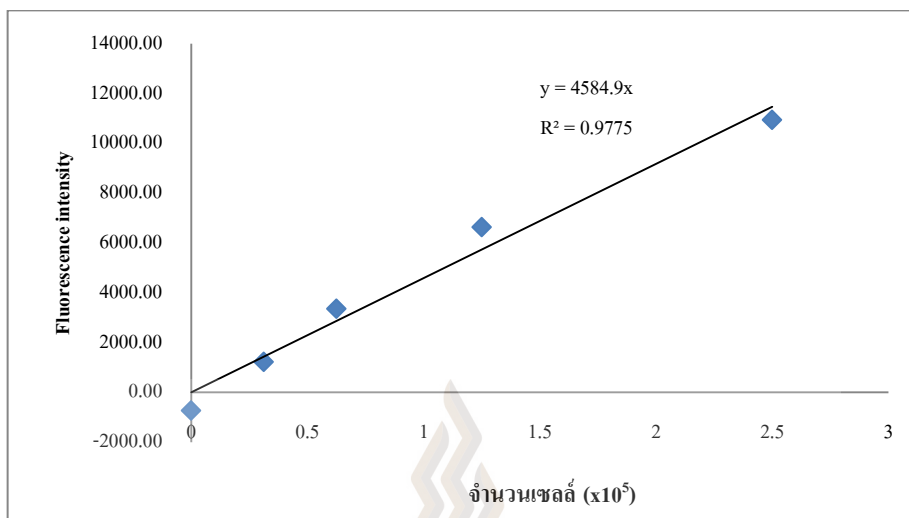
ผลการศึกษาปฏิกริยาของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 10 เท่า พบว่าเซลล์สามารถเติบโตที่พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ โดยทั่วไปที่กำลังขยายต่ำนี้พบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ที่นำมาเลี้ยงมีลักษณะเป็นรูปกระสวย (fusiform) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 เซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับที่ กำลังขยาย 10 เท่า ที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

2. การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์

ผลการวัดจำนวนเซลล์ในสารละลายมาตรฐานแล้วนำมาสร้างกราฟเส้นตรง พบว่ามีค่า $r^2 = 0.9775$ และมีสมการเส้นตรงคือ $y = 4584.9x$ ดังแผนภูมิที่ 3 และเมื่อนำข้อมูลการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่นำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ตามระยะเวลาที่กำหนด มาคำนวณกลับเป็นจำนวนเซลล์โดยใช้สมการข้างต้น พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้นมีจำนวนเซลล์ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 9 และเมื่อนำผลที่ได้สร้างเป็นกราฟเพื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่ม ดังแผนภูมิที่ 4



แผนภูมิที่ 3 กราฟเส้นตรงที่ได้จากการวัดจำนวนเซลล์ในสารละลายมาตรฐาน

เมื่อทดสอบการแจกแจงข้อมูลด้วยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่าทุกกลุ่มข้อมูลมีการแจกแจงปกติ ยกเว้นกลุ่มที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงที่ข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ จากนั้นทำการทดสอบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของกลุ่มที่ระยะเวลาเริ่มต้น และที่ระยะเวลา 24 72 และ 120 ชั่วโมงด้วยสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างน้อย 1 คู่ที่ $p\text{-value} < 0.05$ ยกเว้นกลุ่มที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ ($p\text{-value} = 0.386$) และเมื่อทดสอบ Post-hoc ด้วย Scheffe test พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มตามระยะเวลาเพาะเลี้ยง

	จำนวนเซลล์ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\times 10^4$)				
	0	6 ชม.	24 ชม.	72 ชม.	120 ชม.
SF	1.88 ± 0.57^a	0.00	0.00	0.00	0.07 ± 0.13^c
SF/TCP-4	2.18 ± 0.03	0.00	0.00	0.71 ± 0.55	$1.91 \pm 0.49^{c,d}$
SF/TCP-8	2.95 ± 0.08^a	0.21 ± 0.30	0.72 ± 0.38	0.58 ± 0.41	$3.75 \pm 0.66^{c,d}$
SF/TCP-12	2.90 ± 0.23^a	0.21 ± 0.42	0.51 ± 0.66	1.60 ± 0.78^b	2.78 ± 0.64^c
SF/TCP-16	3.00 ± 0.05^a	0.26 ± 0.45	0.26 ± 0.13	0.35 ± 0.29^b	2.84 ± 1.18^c

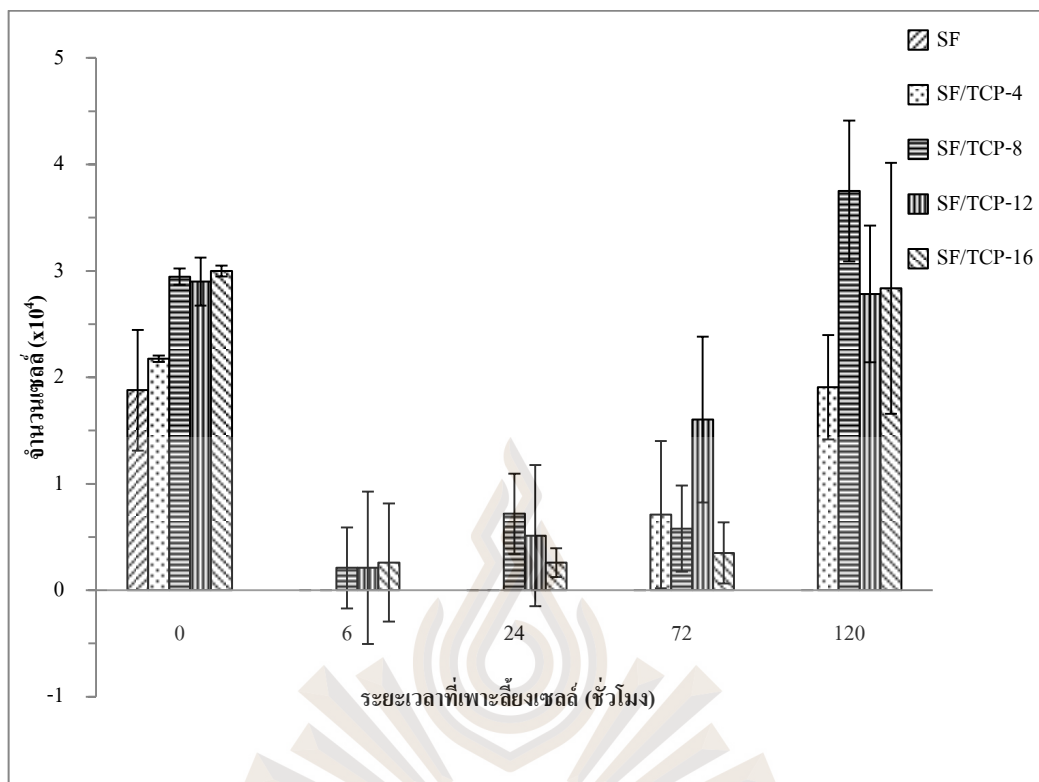
(SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

a = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ระยะเวลาเริ่มต้นในกลุ่ม SF แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-8, SF/TCP-12 และ SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

b = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ 72 ชั่วโมงในกลุ่ม SF/TCP-12 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

c = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ 120 ชั่วโมงในกลุ่ม SF แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-4, SF/TCP-8, SF/TCP-12 และ SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

d = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ 120 ชั่วโมงในกลุ่ม SF/TCP-4 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

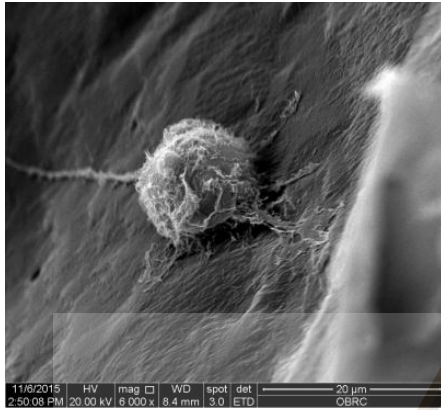


แผนภูมิที่ 4 กราฟแท่งเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

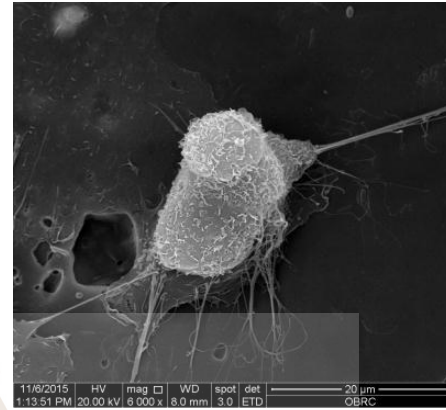
เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 6,000 เท่า ณ บริเวณผิวโครงเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม และมีการยื่นส่วนยื่น (process) ไปเกาะบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ ดังภาพที่ 8 แต่เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง และศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 1,500 เท่า พบว่าเซลล์ทุกกลุ่มเริ่มมีการแผ่ตัวและยื่นส่วนยื่นเพื่อแผ่ขยายไปบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย และพบรูปร่างหลายเหลี่ยม (polyhedral) ได้บ้างซึ่งคล้ายลักษณะที่เซลล์ทำงานในสิ่งมีชีวิต ยกเว้นกลุ่ม SF เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น ที่เซลล์ยังคงมีลักษณะกลมอยู่ ดังภาพที่ 9

เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 700 เท่า เมื่อการเพาะเลี้ยงนานขึ้นเป็น 72 และ 120 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีการแผ่ตัวไปกับพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์มากขึ้นดังภาพที่ 10 และ 12 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่อง

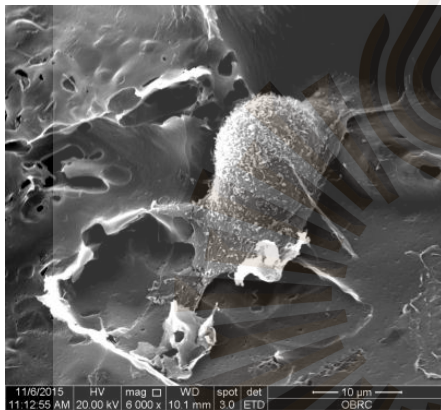
กราฟที่กำลังขยาย 3,000 เท่าพบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น โดยที่เซลล์ใหม่นั้นมีลักษณะกลมและเกาะอยู่บนพื้นผิวของเซลล์เดิม ดังภาพที่ 11 และ 13 ตามลำดับ



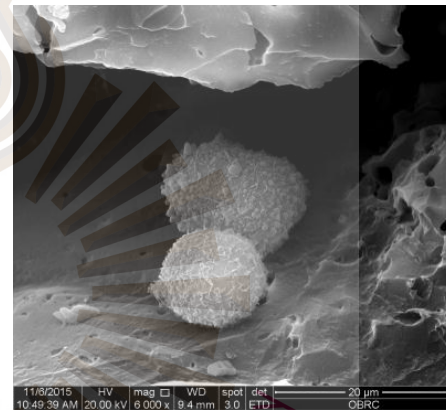
SF



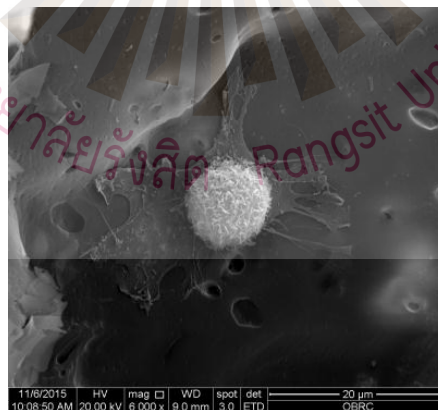
SF/TCP-4



SF/TCP-8

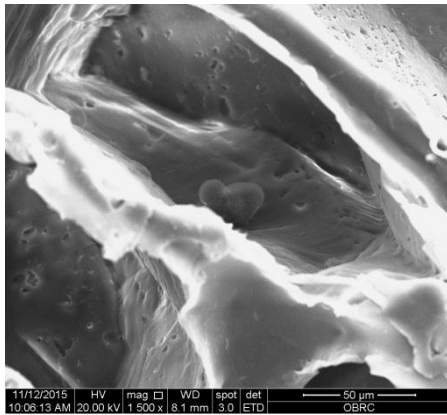


SF/TCP-12

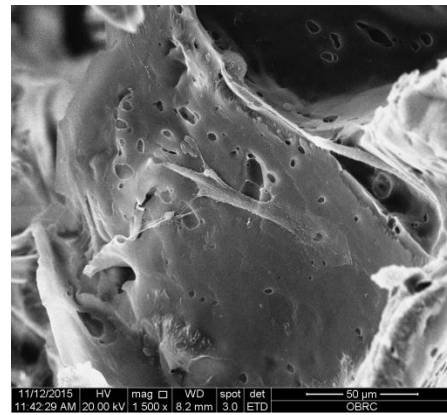


SF/TCP-16

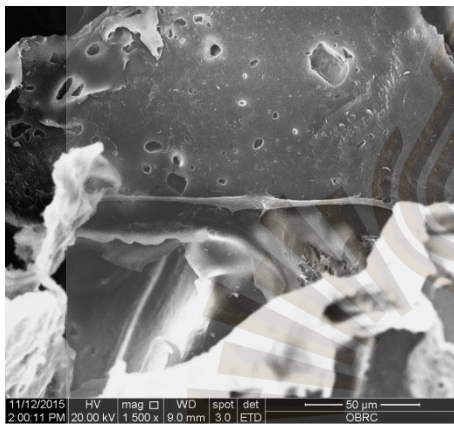
ภาพที่ 8 ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 6,000 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP-8, SF/TCP-12 และ SF/TCP-16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)



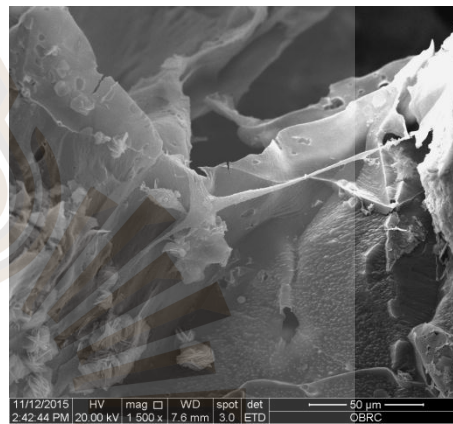
SF



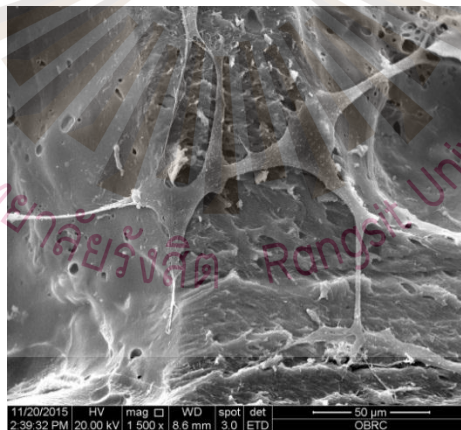
SF/TCP-4



SF/TCP-8

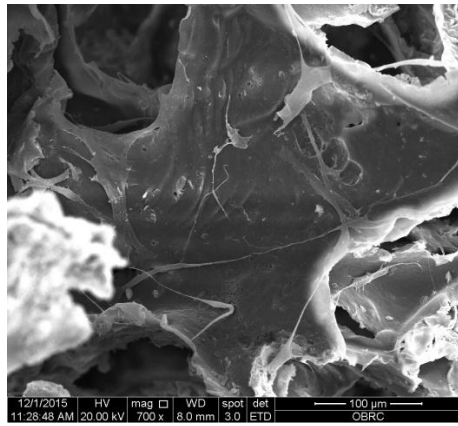


SF/TCP-12

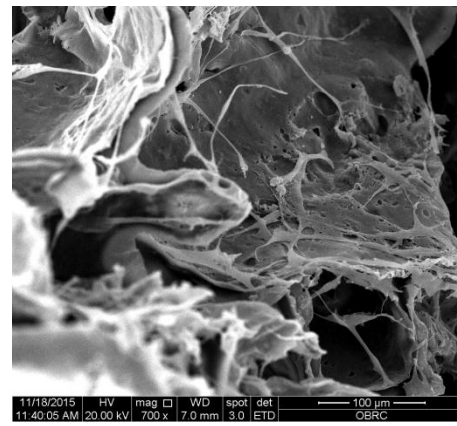


SF/TCP-16

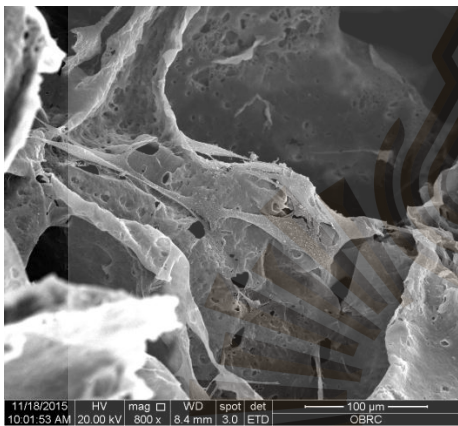
ภาพที่ 9 ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 1,500 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)



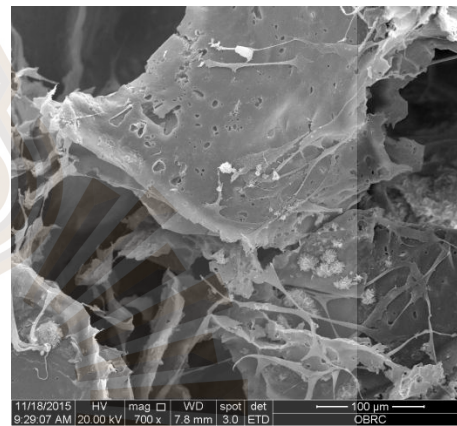
SF



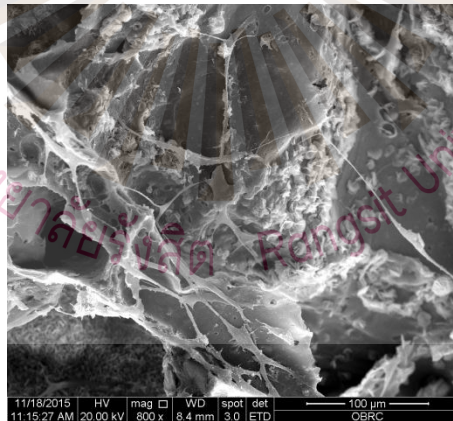
SF/TCP-4



SF/TCP-8

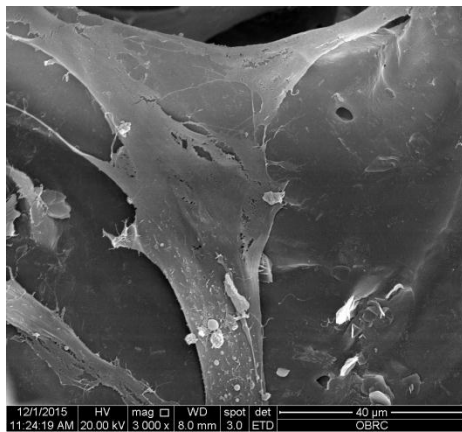


SF/TCP-12

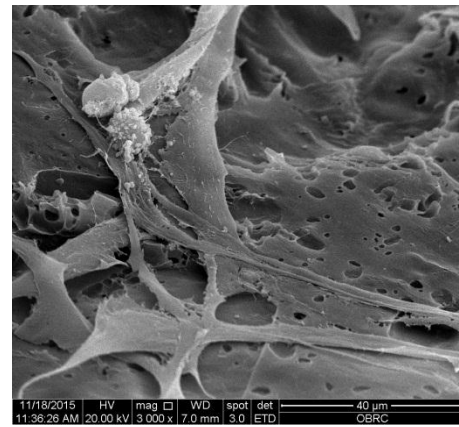


SF/TCP-16

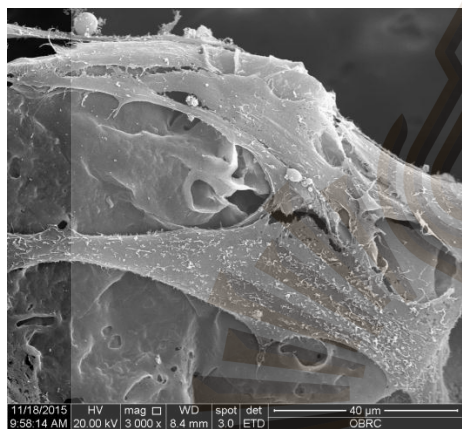
ภาพที่ 10 ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 700 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)



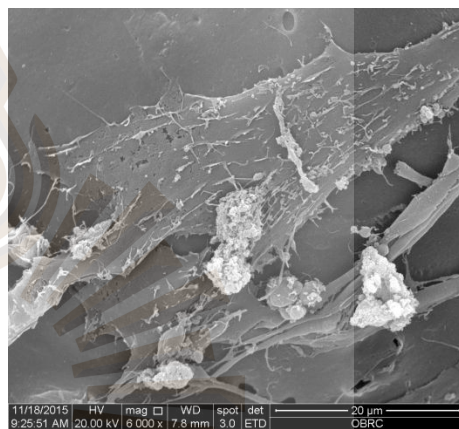
SF



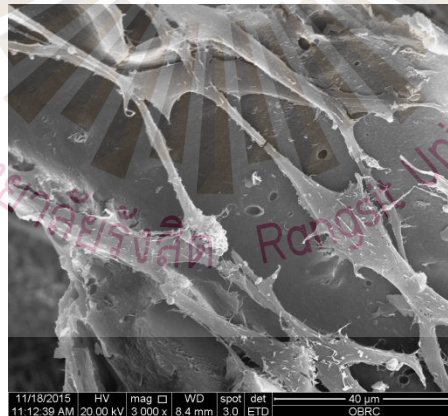
SF/TCP-4



SF/TCP-8

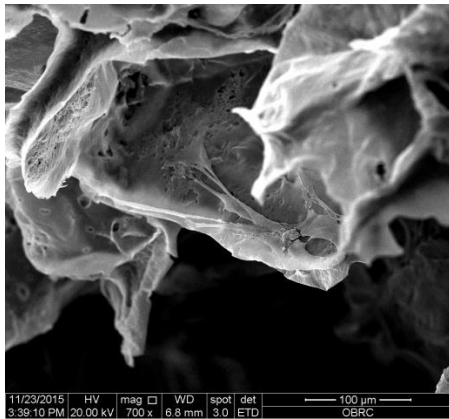


SF/TCP-12

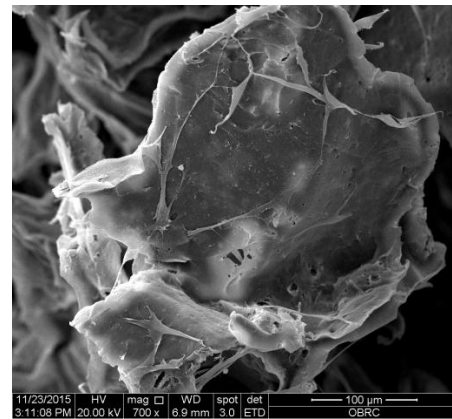


SF/TCP-16

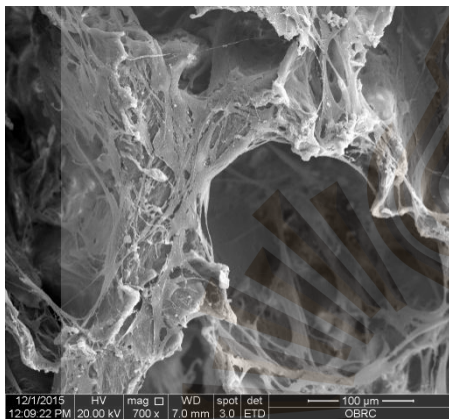
ภาพที่ 11 ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 3,000 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)



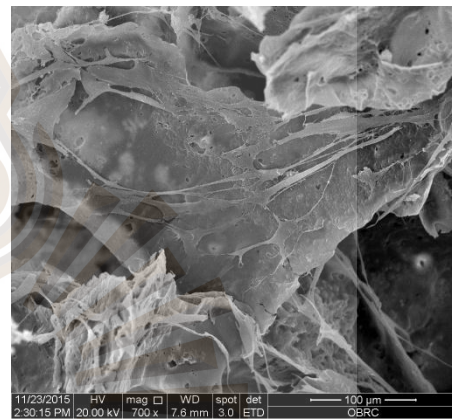
SF



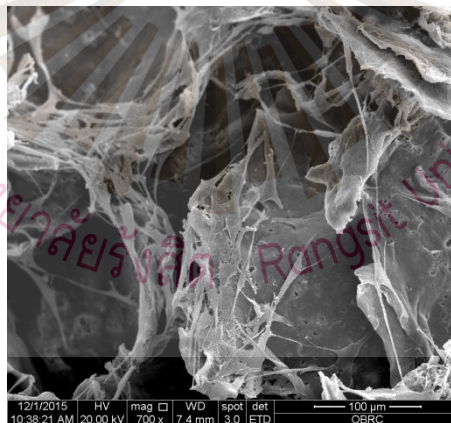
SF/TCP-4



SF/TCP-8

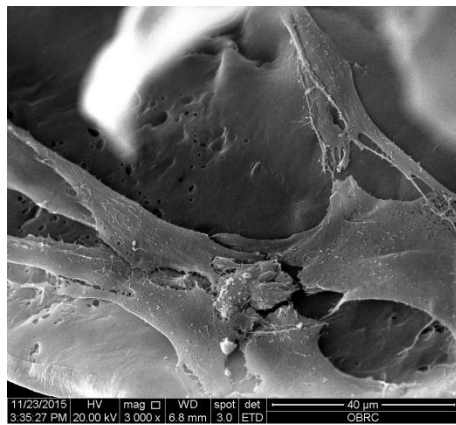


SF/TCP-12

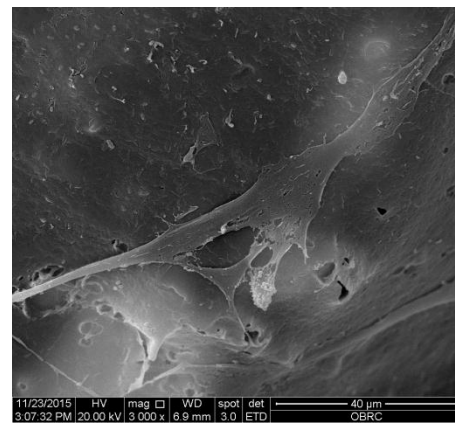


SF/TCP-16

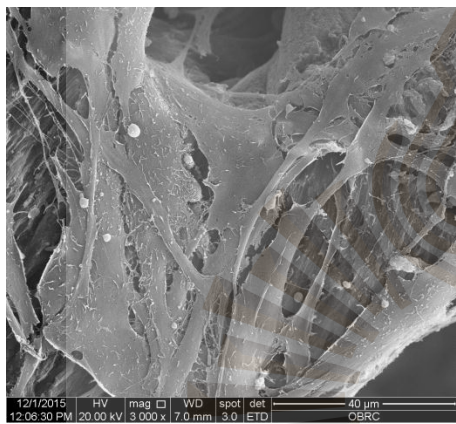
ภาพที่ 12 ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 700 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP-8, SF/TCP-12 และ SF/TCP-16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)



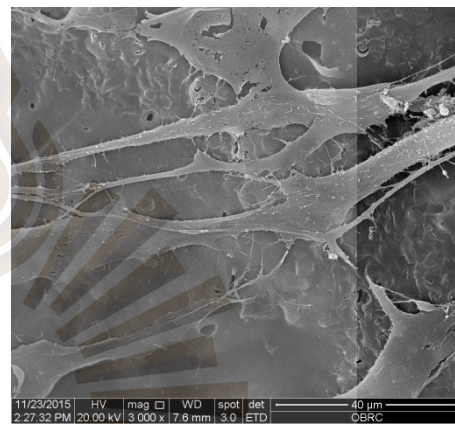
SF



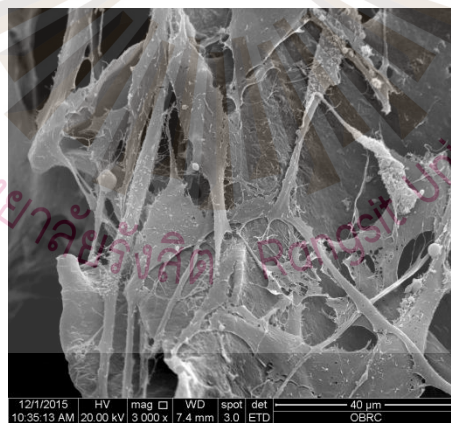
SF/TCP-4



SF/TCP-8



SF/TCP-12



SF/TCP-16

ภาพที่ 13 ลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกของมนุษย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 3,000 เท่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (SF: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ไม่เติม α -TCP และ SF/TCP-4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16: โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การวิจัยนี้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัยซึ่งได้แก่ การสร้างโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนซึ่งทำจากไฟโบรอินที่สกัดจากไหมไทยสายพันธุ์ผสมระหว่าง นางน้อยศรีสะเกษ 1 และ ม. ที่มีการเติม α -TCP และขึ้นรูปด้วยวิธี SC/PL จากนั้นจึงนำมาศึกษาขนาดรูพรุน ค่าร้อยละของรูพรุน ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัส ความหนาแน่น สมบัติเชิงกล และสมบัติเชิงชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติภายใต้สภาวะของการวิจัยครั้งนี้

2. วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเริ่มต้นจากการกำจัดเซอริซินออกจากไฟโบรอินจากนั้นนำไฟโบรอินมาละลายในสารละลายที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต น้ำ และ เอทานอล ที่อัตราส่วนโมลเท่ากับ 1:8:2 หลังจากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินไปทำการแยกสารผ่านเยื่อ ปั้นเหวี่ยง และทำแห้งเยือกแข็ง จากนั้นจึงนำมาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยนำมาละลายในตัวทำละลาย HFIP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้น้ำตาลซูโครสที่มีขนาด 250-450 ไมโครเมตร ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 เท่าของน้ำหนักไฟโบรอิน และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาต่อไป ซึ่งผลที่ได้ออกมามีค่าเท่ากับ 7 เท่าของน้ำหนักไฟโบรอิน

ขั้นตอนต่อไปคือการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตสามมิติที่มีรูพรุนโดยนำไฟโบรอินที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งมาแล้วมาละลายใน HFIP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นเติม α -TCP ลงไปในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และน้ำตาลซูโครสที่มีขนาด 250-450 ไมโครเมตร ที่ความเข้มข้น 7 เท่าของน้ำหนักไฟโบรอิน

กลุ่มตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยที่กลุ่มควบคุมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุน (SF) ที่ไม่ได้เติม α -TCP ในขณะที่กลุ่มทดลองเป็นกลุ่มที่เติม α -TCP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ร้อยละ 4, 8, 12 และ 16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (SF/TCP -4, SF/TCP -8, SF/TCP -12 และ SF/TCP -16 ตามลำดับ) และทำการเลือกโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย เพื่อนำไปวัดขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย SEM ที่กำลังขยาย 35 เท่าจำนวน 1 ชิ้นต่อกลุ่มค่าร้อยละรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการแทนที่ของของเหลวจำนวน 5 ชิ้นต่อกลุ่ม ปริมาณของ

แคลเซียมและฟอสฟอรัสที่อยู่ภายใน โครงเลี้ยงเซลล์ด้วย SEM/EDX ที่กำลังขยาย 100 เท่าจำนวน 1 ชั้น ต่อกลุ่มความหนาแน่นจำนวน 5 ชั้นต่อกลุ่มค่าโมดูลัสแรงกดด้วยเครื่อง Shimadzu 500 N จำนวน 5 ชั้น ต่อกลุ่มปฏิกิริยาของเซลล์ต่อ โครงเลี้ยงเซลล์จำนวน 1 ชั้นต่อกลุ่ม และการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ภายในโครงเลี้ยงเซลล์จำนวน 24 ชั้นต่อกลุ่ม

ข้อมูลที่รวบรวมถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยเริ่มที่การทดสอบการแจกแจงข้อมูลขนาดรูพรุน ของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสถิติ Kolmogorov-Smirnov ในขณะที่ข้อมูลเกี่ยวกับค่าร้อยละรูพรุน ความหนาแน่น และสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ทดสอบการแจกแจงด้วยสถิติ Shapiro-Wilk จากนั้น นำมาทดสอบค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ one-way ANOVA และนำมาทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย สถิติ Dunnett's test สำหรับข้อมูลค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ และสถิติ Scheffe test สำหรับ ข้อมูลค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุน ค่าเฉลี่ยความหนาแน่น และค่าเฉลี่ยสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์และ ค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์

3. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนอยู่ในช่วง 102.97 – 500.14 ไมโครเมตร โดยที่ กลุ่ม SF/TCP-8 มีค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนเล็กที่สุด (240.93 ± 61.17 ไมโครเมตร) ในขณะที่กลุ่ม SF/TCP-12 มีค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุด (300.71 ± 85.25 ไมโครเมตร) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติกับกลุ่ม SF/TCP-4, SF/TCP-8 และ SF/TCP-16 ที่ $p\text{-value} < 0.05$

ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 67.74 - 86.88 โดยที่กลุ่ม SF/TCP-12 มีค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนน้อยที่สุดคือ 77.15 ± 6.54 ในขณะที่กลุ่ม SF/TCP-4 มี ค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนมากที่สุดคือร้อยละ 85.12 ± 0.87 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ กลุ่ม SF/TCP-8 และ SF/TCP-12 ที่ $p\text{-value} < 0.05$

ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนในสถานะแห้งของกลุ่ม SF/TCP-12 มีค่ามากที่สุดคือ $16.53 \pm 4.93 \times 10^{-3}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่กลุ่ม SF/TCP-4 มีค่าน้อยที่สุด คือ $8.83 \pm 0.85 \times 10^{-3}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งกลุ่ม SF/TCP-12 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติกับกลุ่ม SF/TCP-4 และ SF/TCP-16 ที่ $p\text{-value} < 0.05$ และกลุ่ม SF/TCP-4 มีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม SF/TCP-8 ที่ $p\text{-value} < 0.05$

ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนในสถานะชุ่มน้ำของกลุ่ม SF/TCP- 4 มีค่ามากที่สุดคือ $72.63 \pm 6.77 \times 10^{-3}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรในขณะที่กลุ่ม SF มีค่าน้อยที่สุดคือ $60.93 \pm 7.60 \times 10^{-3}$ กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรและไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างกลุ่ม เมื่อนำค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสถานะแห้งและสถานะชุ่มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ มีรูพรุนมาเปรียบเทียบกันพบว่ากลุ่ม SF/TCP-4 สามารถอุ้มน้ำได้มากที่สุดถึง 8.22 เท่า รองลงไปคือ

กลุ่ม SF/TCP-16 ที่สามารถอุ้มน้ำได้ 6.42 เท่า ส่วนกลุ่ม SF และ SF/TCP-8 สามารถอุ้มน้ำได้ 4.51 และ 4.35 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม SF/TCP-12 อุ้มน้ำได้น้อยที่สุดเพียง 3.69 เท่า

ค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของกลุ่ม SF/TCP-8 มีค่ามากที่สุดคือ 64.84 ± 16.65 กิโลปาสกาล ในขณะที่กลุ่ม SF/TCP-16 มีค่าน้อยที่สุดคือ 14.13 ± 3.61 กิโลปาสกาลซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม SF และ SF/TCP-8 ที่ $p\text{-value} < 0.05$

ปริมาณ Ca และ P ในโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนพบว่ากลุ่ม SF/TCP-8 มีค่าเฉลี่ยปริมาณ Ca และ P มากที่สุดคือ 0.87 ± 0.47 weight % และ 0.41 ± 0.29 weight % ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม SF/TCP-4 มีค่าเฉลี่ยปริมาณ Ca และ P น้อยที่สุดคือ 0.47 ± 0.05 weight % และ 0.03 ± 0.06 weight % ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ แต่เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของกลุ่ม SF/TCP-12 มีความแตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 120 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของกลุ่ม SF มีความแตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-4, SF/TCP-8, SF/TCP-12 และ SF/TCP-16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ และนอกจากนี้ยังพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของกลุ่ม SF/TCP-4 แตกต่างจากกลุ่ม SF/TCP-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

อภิปรายผลการวิจัย

การประสบความสำเร็จในการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายๆ อย่าง ซึ่งหนึ่งในปัจจัยที่มีความสำคัญคือ โครงเลี้ยงเซลล์ โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์นั้นควรมีรูปร่างสามมิติที่สามารถควบคุมลักษณะของโครงสร้าง ต้นฐานวิทยา และการเชื่อมต่อ ซึ่งลักษณะดังกล่าวควรสัมพันธ์กับบริเวณที่จะนำไปใช้งาน โดยที่ปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติให้มีลักษณะตามที่ต้องการได้นั้น เช่น ขนาดของรูพรุน ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการขึ้นรูป และควรมีเสถียรภาพทางโครงสร้าง เป็นต้น หนึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำพอลิเมอร์จากธรรมชาติมาผสมกับพอลิเมอร์สังเคราะห์เช่น ไทโรแคลเซียมฟอสเฟตเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์จากธรรมชาติ

การวิจัยนี้สร้างโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนจากไฟโบรอินซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากรังไหมไทยสายพันธุ์ผสมระหว่างนางน้อยศิริษะเกษ 1 และ ม. ด้วยวิธีการขึ้นรูปด้วยตัวทำละลายและชะละลายอนุภาค เนื่องจากเป็นวิธีสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ง่าย และสามารถควบคุมปริมาณ ขนาด และรูปร่างของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนได้ โดยที่ในการวิจัยนี้เลือกใช้ HFIP เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง สร้างพันธะไฮโดรเจนที่มีความแข็งแรง จึงทำให้ HFIP สามารถละลายสารประกอบต่างๆ ในบริเวณตำแหน่งของออกซิเจน พันธะคู่ และ หมู่เอมีน จึงส่งผลให้ HFIP เป็นตัวทำละลาย

อินทรีที่นิยมใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับพอลิเมอร์หลายชนิดแต่เนื่องจาก HFIP มีคุณสมบัติระเหยได้อย่างรวดเร็ว จึงส่งผลให้โครงสร้างเซลล์ที่สร้างได้ในระยะแรกนั้นมีการยุบตัวลงไปประมาณร้อยละ 50-60 แต่การยุบตัวของโครงสร้างเซลล์ลดลงเมื่ออยู่ในระบบปิด ถึงแม้ว่ายังไม่มีการวิจัยที่บ่งบอกถึงความ เป็นพิษของ HFIP ก็ตาม แต่การนำ HFIP มาใช้เป็นตัวทำละลายพอลิเมอร์นั้น ยังคงจำเป็นต้องทำการ ระเหย HFIP ออกจากโครงสร้างเซลล์ออกให้หมด ส่งผลให้ระยะเวลาในการสร้างโครงสร้างเซลล์ ยาวนานขึ้น

การทดลองนี้เลือกใช้น้ำตาลแทนเกลือเนื่องจากการศึกษาของ Makaya et al., (2009) ที่ เปรียบเทียบ โครงสร้างเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่ทำจากไฟโบรอินใหม่ ระหว่างการใช้สารละลาย ไฟโบรอินในน้ำและเกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน และใช้สารละลายไฟโบรอินในตัวทำละลาย HFIP และน้ำตาลซูโครสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน โดยที่โครงสร้างเซลล์ทั้งหมดขึ้นรูปด้วยตัวทำละลายและ ะละลายอนุภาค ซึ่งเมื่อศึกษาลักษณะของโครงสร้างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่อง กราด พบว่าโครงสร้างเซลล์ที่ใช้สารละลายไฟโบรอินในน้ำและใช้เกลือเป็นตัวทำละลายนั้นพบรูพรุน ขนาดเล็กอยู่ที่ผนังของ โครงสร้างเซลล์และมีผนังของรูพรุนที่หนา ในขณะที่โครงสร้างเซลล์ที่ใช้ สารละลายไฟโบรอินในตัวทำละลาย HFIP และใช้น้ำตาลซูโครสนั้น ไม่พบลักษณะรูพรุนขนาดเล็กที่ ผนังของโครงสร้างเซลล์และมีผนังของรูพรุนที่บางกว่า ส่วนเหตุผลที่เลือกใช้น้ำตาลซูโครสนั้นเนื่องจาก เป็นน้ำตาลที่หาได้ง่ายและราคาไม่แพง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลประเภทอื่นๆ

จากผลการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าร้อยละรูพรุนของ โครงสร้างเซลล์เพิ่มขึ้น แต่กลับ ทำให้ความหนาแน่นของ โครงสร้างเซลล์ลดลง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chuenjitkuntaworn et al., (2010) ที่สร้างโครงสร้างเซลล์ที่จากพอลิคาร์โพรแลคโตนและใช้น้ำตาล ซูโครสที่มีขนาดอนุภาค 400-500 ไมโครเมตรเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนพบว่า เมื่อน้ำตาลซูโครสมีความ เข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้โครงสร้างเซลล์มีค่าร้อยละรูพรุนเพิ่มขึ้นและความหนาแน่นลดลง ซึ่งจาก ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละรูพรุนและความหนาแน่นของ โครงสร้างเซลล์ไฟโบรอิน แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง โครงสร้างเซลล์ในขั้นตอนต่อไปนั้นเท่ากับ 7 เท่าของน้ำหนักไฟโบรอิน

ขนาดรูพรุนภายในโครงสร้างเซลล์นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจาก รูพรุนทำหน้าที่เป็นโครงให้เซลล์มายึดติดและฝังตัว จนทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมา ซึ่งจากการวิจัยนี้ ได้โครงสร้างเซลล์มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 102.97 – 500.14 ไมโครเมตร ถึงแม้ว่ายังไม่มีการวิจัยที่ แน่นนอนถึงขนาดรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของเซลล์และการก่อเกิด ของเนื้อเยื่อก็ตาม จาก การศึกษาของ Zhang et al., (2010) พบว่าขนาดรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้น กำเนิดไขกระดูกของมนุษย์ (human bone marrow stem cells) และการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์นั้นอยู่

ในช่วง 100-300 ไมโครเมตร ในขณะที่ Zhang et al., (2012) พบว่าขนาดรูพรุนที่อยู่ในช่วง 100-400 ไมโครเมตรนั้น ส่งผลทำให้เซลล์เกิดการยึดติด การเพิ่มจำนวน และการเติบโตของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ MG-63 (human osteosarcoma cell MG-63) ได้เป็นอย่างดี ส่วน Correia et al., (2012) พบว่าขนาดรูพรุนที่ส่งผลให้เกิดการก่อเกิดเนื้อเยื่อกระดูกได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง 400-600 ไมโครเมตร นอกจากนี้ Boyan et al., (1996) พบว่าขนาดรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการก่อเกิดกระดูกนั้นอยู่ในช่วง 200-400 ไมโครเมตร ในขณะที่ Ishaug et al., (1997) พบว่าขนาดรูพรุนที่อยู่ในช่วง 150-710 ไมโครเมตรนั้นมีความเหมาะสมสำหรับเซลล์สร้างกระดูก ดังนั้นขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นในการศึกษานี้มีขนาดที่เหมาะสมสำหรับการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้

ค่าร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นอีกสิ่งหนึ่งที่มีความสำคัญในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนมาก ส่งผลให้หลอดเลือดเจริญเข้าไปโครงเลี้ยงเซลล์ได้มากขึ้นและส่งผลต่อการขนส่งสารอาหารไปยังเซลล์และการถ่ายเทของเสียออกจากเซลล์ที่ยึดเกาะในโครงเลี้ยงเซลล์ย่อมมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนน้อย ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนที่ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 77.15 ± 6.54 ถึง 85.12 ± 0.87 ซึ่งจากการศึกษาของ Zhang et al., (2010) พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนที่อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0 ± 4.6 ถึง 94.0 ± 4.1 ช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของมนุษย์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าช่วยส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพจากเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของมนุษย์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เนื่องจากพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส คอลลาเจนชนิดที่ 1 และออสติโอแคลซิน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นสมบัติทางกายภาพที่มีความสัมพันธ์กับค่าร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าเมื่อเรียงลำดับค่าเฉลี่ยความหนาแน่นในสถานะแห้งมีลำดับดังนี้ SF/TCP-12 > SF/TCP-8 > SF > SF/TCP-16 > SF/TCP-4 แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนพบว่าเป็นดังนี้ SF/TCP-4 > SF/TCP-16 > SF > SF/TCP-8 > SF/TCP-12 อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์จากการศึกษานี้ไม่ได้สัมพันธ์กับการเติม α -TCP แต่อย่างใด ซึ่งอาจเป็นเพราะวิธีการเติม α -TCP ที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่ได้สามารถทำให้ α -TCP กระจายตัวได้อย่างทั่วถึงในโครงเลี้ยงเซลล์ จึงส่งผลให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Chuenjitkuntaworn et al., (2010) ที่พบว่าความเข้มข้นของอนุภาคไฮดรอกซีอะปาทิตที่เติมลงไปส่งผลโดยตรงต่อความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาร์โพรแลคโตน และจากการศึกษาของ Kothapalli et al., (2005) ที่พบว่าความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิแล็กไทด์มีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอนุภาคไฮดรอกซีอะปาทิตเพิ่มมากขึ้น

ปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสไม่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ α -TCP ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากแคลเซียม

และฟอสฟอรัสไม่ได้มีการกระจายตัวอย่างทั่วถึงแบบสม่ำเสมอในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาของ Yan et al., (2013) ที่ทำการเติมแคลเซียมฟอสเฟตในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยการเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 6 โมลต่อลิตรในสารละลายไฟโบรอินไหมในน้ำ จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียโคเบสฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 3.6 โมลต่อลิตร โดยให้สัดส่วนเชิงอะตอมระหว่างแคลเซียมและฟอสเฟตมีค่าคงที่ที่ 1.67 จากนั้นปรับพีเอชของระบบให้อยู่ที่ 8.5 โดยการเติมแอมโมเนียลงไป จากนั้นทำการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการชะละลายเกลือและการทำแห้งเยือกแข็ง ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าการสร้างอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตขึ้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังพบลักษณะของ cauliflower-like apatite cluster ที่มีขนาดเล็กกว่า 200 นาโนเมตรบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์

สมบัติเชิงกลเป็นสมบัติที่สำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ต้องสามารถคงสภาพของโครงสร้าง เพื่อทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ทั้งหลังการฝัง และระหว่างการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ดังนั้นสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีค่าใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อในบริเวณที่จะทำการฝัง จากการศึกษาพบว่ามีค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของกลุ่ม SF/TCP-8 มีค่ามากที่สุด รองลงไปที่กลุ่ม SF SF/TCP-12 และ SF/TCP-4 ส่วนกลุ่ม SF/TCP-16 มีค่าน้อยที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าโมดูลัสแรงกดไม่มีความสัมพันธ์กับการเติม α -TCP ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yan et al., (2013) ที่พบว่าค่าโมดูลัสแรงกดไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแคลเซียมฟอสเฟตที่เติมลงไป แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาของ Chuenjitkuntaworn et al., (2010) ที่แสดงให้เห็นว่าค่าโมดูลัสแรงกดมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของอนุภาคไฮดรอกซีอะปาทิตที่เติมลงไป

อย่างไรก็ตามค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตที่สร้างได้ในการศึกษานี้มีค่าน้อยกว่าค่าโมดูลัสแรงกดของการศึกษาหลายการศึกษาที่พบว่ามีความตั้งแต่ 80 กิโลปาสกาลไปจนถึง 175 เมกะปาสกาล (Kim, 2008; Liu, 2008 Collins, 2009; Zhang, 2010; Yan, 2013) และยังมีค่าน้อยกว่าค่าโมดูลัสของกระดูกธรรมชาติค่อนข้างมาก ซึ่งจากการศึกษาของ Kokubo, Kim, and Kawashita (2003) ที่พบว่าค่าความแข็งแรงกดของกระดูกที่มีค่าระหว่าง 100-230 เมกะปาสกาล ในขณะที่ค่าความแข็งแรงกดสูงสุด (ultimate compressive strength) ของกระดูกเสี้ยน (trabecular bone) ในกระดูกขากรรไกรล่างมีค่า 0.22-10.44 เมกะปาสกาล และมีค่าเฉลี่ย $3.9 + 2.7$ เมกะปาสกาล (Misch, Qu, and Bidez, 1999) ส่วนเหตุผลที่ไม่วัดความทนต่อแรงดึงของโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากความทนต่อแรงดึงใช้ทดสอบการยึดตัวของตัวอย่างเมื่อได้รับแรงดึงจากภายนอก ซึ่งเหมาะกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยมากกว่า

สมบัติเชิงชีววิทยาเป็นสมบัติที่บ่งบอกถึงความเข้ากันทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์สามารถเติบโตที่พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นพบว่าที่ระยะเวลาเริ่มต้นเซลล์สามารถเข้าไปอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ แต่เมื่อ

ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจนถึงที่ 120 ชั่วโมง จำนวนเซลล์กลับน้อยกว่าที่ระยะเวลาเริ่มต้น ซึ่งอาจเป็นเพราะพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินจากไหมมีโครงสร้างเป็นแผ่นบิด จึงมีความเป็นผลึกสูง และมีสมบัติไม่ชอบน้ำ ส่งผลให้เซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไม่ดีเท่าที่ควร แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการปรับพื้นผิวของไฟโบรอินจากไหม เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะได้ดีขึ้น เช่น การนำอาร์จีดี เปปไทด์ (RGD peptide) มายึดติดกับพื้นผิวด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent) เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าอาร์จีดี เปปไทด์นั้นสามารถจับกับอินทิกริน (integrin) ที่อยู่บนพื้นผิวของเซลล์ได้ และยังช่วยส่งเสริมการยึดติดของเซลล์เข้ากับพื้นผิวที่มีอาร์จีดี เปปไทด์อยู่ ซึ่งจากการศึกษาของ Damrongrungruang (2010) พบว่าเส้นใยนาโนที่มีอาร์จีดี เปปไทด์ มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเส้นใยนาโนที่ไม่มีอาร์จีดี เปปไทด์

เมื่อพิจารณาผลของการเติม α -TCP ในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าเมื่อ α -TCP มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ขนาดรูพรุน ค่าร้อยละรูพรุน ความหนาแน่นทั้งในสภาวะแห้งและชุ่มน้ำ ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสโมลต์สแรงกอด และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ไม่ได้เพิ่มขึ้นไปด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก α -TCP ที่ใส่ลงไปนั้นไม่ได้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและลักษณะสมบัติของไฟโบรอิน และนอกจากนี้ α -TCP ยังไม่สามารถกระจายตัวได้อย่างทั่วถึงภายในโครงเลี้ยงเซลล์

สรุปจากผลวิจัยนี้ โครงเลี้ยงเซลล์กลุ่ม SF/TCP-8 เหมาะสำหรับนำไปพัฒนาต่อสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะจากผลการวิจัยที่พบและการนำผลการวิจัยไปใช้

จากผลวิจัยที่พบควรหาวิธีการเติม α -TCP ที่สามารถทำให้เกิดการกระจายตัวอย่างทั่วถึงในโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้เห็นผลของความแตกต่างของความเข้มข้นอย่างชัดเจน และนอกจากนี้ควรมีการศึกษาในสัตว์ทดลองก่อนเพื่อนำไปใช้ได้จริงๆ

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

1. ปรับสภาพพื้นผิวของไฟโบรอินจากไหม เพื่อเป็นการส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์
2. ทำการเชื่อมขวางกับชีววัสดุชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มค่าโมดูลัสแรงกอด
3. หาวิธีการทำให้ α -TCP กระจายทั่วโครงเลี้ยงเซลล์
4. ควรใช้เซลล์สร้างกระดูกโดยเลี้ยงใน osteogenic medium เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนสภาพของเซลล์และการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมแร่ธาตุ (calcification) ในหลอดทดลอง ตลอดจนนำไปทดสอบในสัตว์ทดลอง

บรรณานุกรม

- Ajisawa, A. Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ ethanol aqueous solution. **J Seric Sci Jpn** 67 (1998) : 91-94.
- Altman, G.H., and others. Silk-based biomaterials. **Biomaterials** 24 (February 2003) : 401-416.
- Arai, T., and others. Biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin fibers and films. **J Appl Polym Sci** 91 (February 2004) : 2383-2390.
- Aramwit, P., Siritientong, T., and Srichana, T. Potential application of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. **Waste Manag Res** 30 (Mar 2012) : 217-224.
- Arca, H.C., and Senel, S. Chitosan based systems for tissue engineering part 1: hard tissues. **FABAD J Pharm Sci** 33 (2008) : 35-49.
- Barralet, J.E., and others. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold” **Biomaterials** 23 (August 2002) : 3063-3072.
- Bessa, P.C., and others. Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant BMPs. Physical characterization and drug release. **J Tissue Eng Regen Med** 4 (July 2010) : 349-355.
- Bhumiratana, S., and others. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. **Biomaterials** 32 (April 2011) : 2812-2820.
- Boyan, B.D., and others. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials** 17 (January 1996) : 137-146.
- Cao, Y., and Wang, B. Biodegradation of silk biomaterials. **Int J Mol Sci** 10 (March 2009) : 1514-1524.
- Carrodeguas, R.G., and de Aza, S. α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical application. **Acta Biomaterialia** 7 (October 2011) : 3536-3546.
- Christel, T., and others. Dual setting α -tricalcium phosphate cements. **J Mater Sci: Mater Med** 24 (March 2013) : 573-581.
- Chuenjitkuntaworn, B., and others. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. **J Biomed Mater Res A** 94 (July 2010) : 241-251.

- Collins, A.M., and others. Bone-like resorbable silk-based scaffolds for load-bearing osteoregenerative applications. **Advan Mater** 21 (January 2009) : 75-78.
- Correia, C., and others. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. **Acta Biomater** 8 (July 2012) : 2483–2492.
- Damien, E., and others. A preliminary study on the enhancement of the osteointegration of a novel synthetic hydroxyapatite scaffold in vivo. **J Biomed Mater Res A** 66 (August 2003) : 241-246.
- Damrongrungruang T. Study of fibroblast adhesion on RGD-modified eletrospun Thai silk fibroin nanofiber for scaffold material in dentistry: A preliminary study. **KDJ** 13 (January-June 2010) : 3-14.
- de Moraes Machado JL, and others. Evaluation of scaffolds based on α -tricalcium phosphate cements for tissue engineering application. **IEEE Trans Biomed Eng** 58 (June 2011) : 1814-1819.
- Dhandayuthapani, B., and others. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science** 2011 (July 2011) : 1-19.
- Diab, T., and others. A silk hydrogel-based delivery system of bone morphogenetic protein for the treatment of large bone defects. **J Mech Behav Biomed Mater** 11 (July 2012) : 123-131.
- Dong, J., and others. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. **J Biomed Mater Res** 57 (November 2001) : 208-216.
- Dyakonov, T., and others. Design and characterization of a silk-fibroin-based drug delivery platform using naproxen as a model drug. **J Drug Deliv** 2012 (February 2012) : 1-10.
- Elia, R., and others. Silk-hyaluronan-based composite hydrogel: a novel, securable vehicle for drug delivery. **J Biomater Appl** 27 (February 2013) : 749-762.
- Flanagan, K.E., and others. Development of a sutureless dural substitute from *Bombyx mori* silk fibroin. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 103 (April 2015) : 1-10.
- Ge, Z., and others. Assessment of silk fibroin for the repair of buccal mucosa in a rat model. **Int J Oral Maxillofac Surg** 41 (May 2014) : 673-680.
- Gholipourmalekabadi, M., and others. In vitro and in vivo evaluations of three-dimensional hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposites scaffolds. **Biotechnol Appl Biochem** 62 (July-August 2015): 441-450.

- He, Y., and others. Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate. **J Craniofac Surg** 18 (July 2007) : 800-805.
- Hofmann S., and others. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structure using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. **Biomaterials** 28 (February 2007) : 1152-1162.
- Hofmann, S., and others. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. **J Control Release**. 111 (March 2006) : 219-227.
- Hu, A., and others. Evaluation of electrospun silk fibroin-based transplants used for facial nerve repair. **Otol Neurotol** 34 (February 2013) : 311-318.
- Hutmacher, D.W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of art and future perspectives. **J Biomater Sci Polym Ed** 12 (2001) : 107-124.
- Inoue, S., and others. Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. **J Biol Chem** 275 (December 2000) : 40517-40528.
- Ishaug, S.L., and others. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. **J Biomed Mater Res** 36 (July 1997) : 17-28.
- Jiang, J., and others. Hydroxyapatite/ regenerated silk fibroin scaffold-enhanced osteoinductivity and osteoconductivity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Biotechnol Lett** 35 (April 2013) : 657-661.
- Kim, H., and others. Mechanically-reinforced electrospun composite silk fibroin nanofibrous containing hydroxyapatite nanoparticles. **Mater Sci Eng C Mater Bio Appl** 40 (July 2014) : 324-335.
- Kim, H.J., and others. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. **Bone** 42 (June 2008) : 1226-1234.
- Kim, H.J., and others. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. **Biomaterials** 26 (July 2005) : 4442-4453.
- Kim, K.H., and others. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membrane for guided bone regeneration. **J Biotechnol** 120 (November 2005) : 327-339.

- Kim, U.J., and others. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. **Biomaterials** 26 (May 2005) : 2775–2785.
- Kino, R., and others. Preparation and characterization of multilayered hydroxyapatite/silk fibroin film. **J Biosci Bioeng** 103 (June 2007) : 514-520.
- Kokubo, T., Kim, H.M., Kawashita, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials** 24 (June 2003) : 2161-2175.
- Kothapalli, C.R., Shaw, M.T., and Wei, M. Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: Effect of nano-sized filler content on scaffold properties. **Acta Biomater** 1 (November 2005) : 653-662.
- Kruyt, M.C., and others. Optimization of bone tissue engineering in goats: a preoperative seeding method using cryopreserved cells and localizes bone formation in calcium phosphate scaffolds. **Transplantation** 77 (February 2004) : 359-365.
- Kuboyama, N., and others. Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration. **J Biomed Mater Res BAppl Biomater** 101 (February 2013): 295-302.
- Langer, R., and Vacanti, J.P. Tissue engineering. **Science** 260 (1993) : 920-926.
- Lee, G.S., and others. Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering. **Acta Biomater** 7 (August 2011) : 3178-3186.
- Lee, J.B., and others. Physical properties and biological/odontogenic effects of an experimentally developed fast-setting α -tricalcium phosphate-based pulp capping material. **BMC Oral Health** 14 (July 2014) : 1-11.
- Lee, O.J., and others. Development of artificial dermis using 3D electrospun silk fibroin nanofiber matrix. **J Biomed Nanotechnol** 10 (July 2014) : 1294-1303.
- Li, M., Ogiso, M., and Minoua, N. Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets. **Biomaterials** 24 (January 2003) : 357-365.
- Liu, L., and others. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatites/silk fibroin porous scaffolds. **J Biomater Sci Polym Ed** 19 (2008) : 325-338.
- Liu, C., Xia, Z., and Czernuszka, J.T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chemical Engineering Research and Design** 85 (2007) : 1051-1064.
- Lu, Q., and others. Stabilization and release of enzymes from silk films. **Macromol Biosci.** 10 (April 2010) : 359-368.

- Lu, Q., and others. Degradation mechanism and control of silk fibroin. **Biomacromolecules**. 12 (February 2011) : 1080-1086.
- Makaya, K., and others. Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/ hexafluoroisopropanol in cartilage formation. **J Biosci Bioeng** 108 (July 2009) : 68-75.
- Mallepally, R.R., Martin, M.A., and McHugh, M.A. CO₂-assisted synthesis of silk fibroin hydrogels and aerogels. **Acta Biomater** 10 (October 2014) : 4419-1124.
- Mandal, B.B., Kapoor, S., and Kundu, S.C. Silk fibroin/polyacrylamide semi-interpenetrating network hydrogels for controlled drug release. **Biomaterials** 30 (May 2009a) : 2826-2836.
- Mandal, B.B., Mann, J.K., and Kundu, S.C. Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. **Eur J Pharm Sci** 37 (May 2009b) : 160-171.
- Min, B.M., and others. Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes. **Int J Biol Macromol** 34 (October 2004) : 281-288.
- Minoura, N., Tsukada, M., and Nagura, M. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. **Biomaterials** 11 (August 1990) : 430-434.
- Miranda, P., and others. Sintering and robocasting of beta-tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications. **Acta Biomater** 2 (July 2006) : 457-466.
- Misch, C.E., Qu, Z., Bidez, M.W. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: implication for dental implant treatment planning and surgical placement. **J Oral Maxillofac Surg** 57 (June 1999) : 706-708.
- Moisenovich, M.M., and others. Composite scaffolds containing silk fibroin, gelatin, and hydroxyapatite for bone tissue regeneration and 3D cell culturing. **Acta Naturae** 6 (January-March 2014) : 96-101.
- Mondal, M., Trivedy, K., and Kumar, S.N. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., -a review. **Caspian J Env Sci** 5 (2007) : 63-76.
- Nazarov, N., Jin, H.J., and Kaplan, D.L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. **Biomacromolecules** 5 (May-June 2004) : 718-726.
- Norman, M.E., and others. An in-vitro evaluation of coralline porous hydroxyapatite as scaffold for osteoblast growth. **Clin Mater** 17 (1994) : 85-91.

- Numata, K., Cebe, P., and Kaplan, D.L. Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystal. **Biomaterials** 31(April 2010) : 2926-2933.
- Nyan, M., and others. Feasibility of alpha tricalcium phosphate for vertical bone augmentation. **J Investig Clin Dent** 5 (May 2014) : 109-116.
- Oh, S.A., and others. Osteoclastic cell behaviors affected by the α -tricalcium phosphate based bone cements. **J Mater Sci Mater Med** 21 (November 2010) : 3019-3027.
- Pe' rez-Rigueiro, J., and others. Mechanical properties of single-brin silkworm silk. **Journal of Applied Polymer Science** 75 (March 2000): 1270–1277.
- Perez, R.A., and Kim, H.W. Core-shell designed scaffold of alginate/alpha-tricalcium phosphate for the loading and delivery of biological proteins. **J Biomed Mater Res A** 101 (April 2013) : 1103-1112.
- Pinto, J.G., and others. Alpha-tricalcium phosphate cement in the reconstruction of bone defects in rats. **Acta Cir Bras.** 26 (2011) : 135-139.
- Qu, J., and others. Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration. **J Biomed Mater Res A** 101 (September 2013) : 2667-2678.
- Rockwood, D.N., and others. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nat Protoc** 6 (September 2011) : 1612-1631.
- Ruan, Y., and others. Preparation of 3D fibroin/chitosan blend porous scaffold for tissue engineering via a simplified method. **Macromol Biosci** 11 (March 2011) : 419-426.
- Sakai, K., and others. Effects on bone regeneration when collagen model polypeptides are combined with various sizes of alpha-tricalcium phosphate particles. **Dent Mater J** 30 (2011) : 913-922.
- Shanmugavel, S., and others. Precipitation of hydroxyapatite on electrospun polycaprolactone/ aloe vera/ silk fibroin nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. **J Biomater Appl** 29 (November 2013) : 46-58.
- Shao, Z., and Vollrath, F. Material: surprising strength of silkworm silk. **Nature** 418 (August 2002) : 741.
- Sugihara, A., and others. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. **Proc Soc Exp Biol Med** 225 (October 2000) : 58-64.

- Tanaka, K., Inoue, S., and Mizuno, S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. **Insect Biochem. Mol Biol** 29 (March 1999a) : 269–276.
- Tanaka, K., and others. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. **Biochim Biophys Acta** 1432 (June 1999b) : 92–103
- Thimm, B.W., and others. Initial cell pre-cultivation can maximize ECM mineralization by human mesenchymal stem cells on silk fibroin scaffolds. **Acta Biomater** 7 (May 2011) : 2218-2228.
- Tsukada, M., and others. Structural changes of silk fibers induced by heat treatment. **J Appl Polym Sci** 46 (December 1992) : 1945-1953.
- Uebersax, L., and others. Effect of scaffold design on bone morphology in vitro. **Tissue Eng** 12 (December 2006) : 3417-3429.
- Vepari, C., and Kaplan, D.L. Silk as a biomaterial. **Prog Polym Sci** 32 (2007) : 991-1007.
- von Doernberg, M.C., and others. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. **Biomaterials** 27 (October 2006) : 5186-5198.
- Wagoner Johnson, A.J., and Herschler, B.A. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. **Acta Biomater** 7 (January 2011) : 16–30.
- Wang, X., and others. Silk microspheres for encapsulation and controlled release. **J Control Release** 117 (February 2007) : 360-370.
- Wang, Y., and others. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. **Biomaterials** 29 (August-September 2008) : 3415-3428.
- Wenk, E., and others. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. **J Control Release** 132 (November 2008) : 26-34.
- Wilson, C.E., and others. Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. **J Biomed Mater Res A** 68 (January 2004) : 123-132.
- Wójtowicz, J., and others. Comparative in vitro study of calcium phosphate ceramics for their potency as scaffolds for tissue engineering. **Biomed Mater Eng** 24 (2014) : 1609-1623.
- Xie, F., and others. Ectopic osteogenesis of allogeneic bone mesenchymal stem cells loading on β -tricalcium phosphate in canines. **Plast Reconstr Surg** 133 (February 2014) : 142-153.

- Xie, Y., and others. Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold. **Tissue Eng** 12 (December 2006) : 3535-3543.
- Yamaguchi, K., and others. Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. **J Mol Biol** 210 (November 1989) : 127-139.
- Yan, L.P., and others. In vitro evaluation of the biological performance of macro/micro-porous silk fibroin and silk-nano calcium phosphate scaffolds. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 103 (May 2015) :888-898.
- Yan, L.P., and others. Bioactive macro/micro porous silk fibroin/nano-sized calcium phosphate scaffolds with potential for bone-tissue-engineering applications. **Nanomedicine (Lond)** 8 (March 2013) : 359-378.
- Yuan, J., and others. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. **Biomaterials**. 28 (February 2007) : 1005-1013.
- Zhang, X., and others. Optimization of macroporous 3-D silk fibroin scaffolds by salt-leaching procedure in organic solvent-free conditions. **J Mater Sci Mater Med** 23 (February 2012) : 315–324
- Zhang, Y., and others. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. **Acta Biomater** 6 (August 2010a) : 3021–3028
- Zhang, Y., and others. The osteogenic properties of CaP/silk composite scaffolds. **Biomaterials** 31 (April 2010b) : 2848-2856.
- Zhou, C.Z., and others. Silk fibroin: structural implication of a remarkable amino acid sequence. **Proteins** 44 (August 2001) : 119-122.
- Zhou, J., and others. In vitro and in vivo degradation behavior of aqueous-derived electrospun silk fibroin scaffolds. **Polymer Degradation and Stability** 95 (September 2010) : 1679-1685.
- Zhou, Y., and others. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. **Int J Biol Macromol** 53 (February 2013) : 88-92.
- Zhu, H., and others. Structural characteristics and properties of silk fibroin/poly(lactic acid) blend films. **J Biomater Sci Polym Ed** 20 (2009) : 1259-1274.

Zhu, H., and others. Preparation and characterization of bioactive mesoporous calcium silicate-silk fibroin composite films. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 98 (August 2011) : 330-341.



ภาคผนวก

ประวัติผู้วิจัย

ไฟล์รูปภาพ
นักวิจัย
ขนาด
150*200

คำนำหน้า นาย นาง นางสาว
 ตำแหน่งทางวิชาการ ศ. รศ. ผศ. อื่นๆ _____
 ชื่อผู้วิจัย: _____ วรเดช _____
 นามสกุลผู้วิจัย _____ พิชัยอุตคฤกษ์ _____
 ชื่อภาษาอังกฤษ _____ Woradej _____
 นามสกุลภาษาอังกฤษ _____ Pichaiakrit _____
 วัน/เดือน/ปีเกิด _____ 7/12/2522 _____
 ที่อยู่(บ้าน) _____ 51 ถ.สวนผัก แขวงจิมพลี เขตดลิ่งชัน _____
 จังหวัด(บ้าน) _____ กรุงเทพมหานคร _____
 รหัสไปรษณีย์(บ้าน) _____ 10170 _____
 โทรศัพท์(บ้าน) _____ 028844521 _____
 แฟกซ์(บ้าน) _____
 ที่อยู่(ที่ทำงาน) _____ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต _____
 จังหวัด(ที่ทำงาน) _____ ปทุมธานี _____
 รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน) _____
 โทรศัพท์(ที่ทำงาน) _____
 แฟกซ์(ที่ทำงาน) _____
 E-Mail Address : _____ woradej059@gmail.com _____
ปริญญาตรี
 สาขา _____ ทันตแพทยศาสตร์บัณฑิต _____
 ปีที่จบ _____ 2545 _____
 สถาบัน _____ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล _____
 ประเทศ _____ ไทย _____

ปริญญาโท

สาขา _____ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ทันตกรรมทั่วไป) _____

ปีที่ยื่น _____ 2552 _____

สถาบัน _____ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น _____

ประเทศ _____ ไทย _____

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

_____ Porous silk fibroin/alpha tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering: A preliminary study. Key Engineering Materials 695 (May 2016) : 164-169. _____

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนา และสถานที่)

_____ การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี ๒๕๕๘ (RSU National Research Conference 2015)ณ มหาวิทยาลัยรังสิต _____

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนา และสถานที่)

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล(โปรดระบุรางวัลที่ได้รับ)

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

ประวัติผู้วิจัย

ไฟล์รูปภาพ
นักวิจัย
ขนาด
150*200

คำนำหน้า นาย นาง นางสาว
 ตำแหน่งทางวิชาการ ศ. รศ. ผศ. อื่นๆ _____
 ชื่อผู้วิจัย: _____ วิริยา _____
 นามสกุลผู้วิจัย _____ จุวัฒน์สำราญ _____
 ชื่อภาษาอังกฤษ _____ Wiriya _____
 นามสกุลภาษาอังกฤษ _____ Juwattanasamran _____
 วัน/เดือน/ปี เกิด _____ 25/09/2514 _____
 ที่อยู่ (บ้าน) _____ 9/54 หมู่บ้านสยามไฮวิลล์ ม.7 ตำบลคลองหนึ่ง อ.คลองหลวง _____
 จังหวัด(บ้าน) _____ ปทุมธานี _____
 รหัสไปรษณีย์(บ้าน) _____ 12120 _____
 โทรศัพท์(บ้าน) _____
 แฟกซ์(บ้าน) _____
 ที่อยู่(ที่ทำงาน) _____ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต _____
 จังหวัด(ที่ทำงาน) _____ ปทุมธานี _____
 รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน) _____
 โทรศัพท์(ที่ทำงาน) _____
 แฟกซ์(ที่ทำงาน) _____
 E-Mail Address : _____ wiriya.j@rsu.ac _____
ปริญญาตรี
 สาขา _____ ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต _____
 ปีที่จบ _____ 2539 _____
 สถาบัน _____ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น _____
 ประเทศ _____ ไทย _____
ประกาศนียบัตรบัณฑิต
 สาขา _____ ทันตกรรมทั่วไป _____

ปีที่ยื่น _____ 2545 _____

สถาบัน _____ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล _____

ประเทศ _____ ไทย _____

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

_____ Porous silk fibroin/alpha tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering: A preliminary study. Key Engineering Materials 695 (May 2016) : 164-169. _____

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ (โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนา และสถานที่)

_____ การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี ๒๕๕๘ (RSU National Research Conference 2015) ณ มหาวิทยาลัยรังสิต _____

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ (โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนา และสถานที่)

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล (โปรดระบุรางวัลที่ได้รับ)

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ