

ระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อพืชที่ทำจากเจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทย  
:การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

นายวิทธิ อนุชิวระ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2554  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

A CONTROLLED RELEASE SYSTEM FOR DENTIN MATRIX EXTRACTS FROM  
GELATIN/THAI SILK FIBROIN: AN IN VITRO STUDY

Mr. Warit Anuchiracheewa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering

(Interdisciplinary Program)

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อพืชที่ทำจาก
โดย	เจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทย:การศึกษาในห้องปฏิบัติการ
สาขาวิชา	นายวิทธิ อนุชิตาชีวะ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์
	ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณะบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศสิทธิ์วงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง)

วริทธิ์ อนุชิตราชีวะ : ระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อฟันที่ทำจากเจลาติน/  
ไฟโบรอินไหมไทย: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ. (A CONTROLLED RELEASE  
SYSTEM FOR DENTIN MATRIX EXTRACTS FROM GELATIN/THAI SILK  
FIBROIN: AN IN VITRO STUDY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. ไศรดา  
กนกพานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์, 106 หน้า.

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการสกัด และศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดจากเนื้อฟันมนุษย์ (DME) ตลอดจนพัฒนาระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดเนื้อฟันโดยใช้ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย (G:SF) ในอัตราส่วน 100:0, 70:30, และ 50:50 ซึ่งสามารถเก็บกัก DME ด้วยกลไกทางประจุไฟฟ้า และปลดปล่อยด้วยกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ การสกัด DME จากเนื้อฟันมนุษย์ในงานวิจัยนี้มีค่าร้อยละผลได้อยู่ที่ 0.388 และโปรตีนที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 55 - 72 กิโลดาลตัน สันนิษฐานว่าเป็นกลุ่มเมทริกซ์โปรตีนที่เป็นกรด ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ในการตอบสนองภาวะทางชีวภาพต่างๆ DME ที่พีเอช 7.5 และ 5.5 มีค่าศักย์เซต้าอยู่ที่  $-10.530 \pm 12$  มิลลิโวลต์ และ  $-13.530 \pm 31$  มิลลิโวลต์ ตามลำดับ และการทดสอบกับต่อเซลล์ MC3T3-E1 แสดงให้เห็นว่า DME มีผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ และ DME ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะส่งเสริมให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็นกระดูกได้ เนื่องจาก ในวันที่ 10 พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และในวันที่ 21 พบการสะสมแคลเซียมโดยการย้อม Alizarin red ตัวนำส่ง G:SF 100:0, 70:30 และ 50:50 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย  $13.28 \pm 0.50$ ,  $12.86 \pm 0.56$  และ  $11.36 \pm 0.63$  มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีการปลดปล่อยสารทันที (burst release) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ในช่วงร้อยละ  $12.93 \pm 7.84$  ถึง  $21.42 \pm 1.18$  จากผลการศึกษาอัตราการปลดปล่อย DME ภายนอกร่างกายในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อัตราส่วนผสมไฟโบรอินไหมไทยที่มากขึ้นในการผลิตตัวนำส่งส่งผลให้อัตราการปลดปล่อย DME ช้าลง สันนิษฐานว่า DME สามารถยึดเกาะกับตัวนำส่งชนิด G:SF 50:50 ได้ดีที่สุด และสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งทั้งสามชนิด ที่ว่า ตัวนำส่งชนิด G:SF 50:50 มีอัตราการย่อยสลายที่ช้าที่สุดด้วย กล่าวได้ว่า ตัวนำส่งเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยสามารถนำมาพัฒนาเพื่อการควบคุมการปลดปล่อย DME ได้ต่อไป

สาขาวิชา.....วิศวกรรมชีวเวช..... ลายมือชื่อนิติ.....  
ปีการศึกษา...2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5187267121 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS : GELATIN / THAI SILK FIBROIN / DENTIN MATRIX EXTRACT /

CONTROLLED RELEASE

WARIT ANUCHIRACHEEWA : A CONTROLLED RELEASE SYSTEM FOR DENTIN  
MATRIX EXTRACTS FROM GELATIN/THAI SILK FIBROIN : AN IN VITRO STUDY.

ADVISOR : ASST. PROF. SORADA KANOKPANONT, Ph.D., CO-ADVISOR :

PROF. PRASIT PAVASANT, Ph.D. DDS., 106 pp.

The aim of this research is to characterize the dentin matrix extracted from human teeth (DME) and develop a controlled release system from gelatin/Thai silk fibroin (G:SF) to be used as carrier for DME. The carriers were produced by weight blending ratio of G:SF 100:0, 70:30, and 50:50. These carriers was designed to interact with DME by the opposite electrostatic charge and provide sustain releasing by biodegradation. The yield of extraction is 0.388% by weight. Molecular weights of extracted crude proteins are in the range of 55-72 kDa which could be assumed as acidic matrix proteins. The zeta-potential of DME are  $-10.53 \pm 0.12$  and  $-13.53 \pm 0.31$  mV in pH 7.5 and 5.5 solutions, respectively. The results of in vitro cell culture using MC3T3-E1 cell line indicated that DME suppressed specific growth rate of the cell. However, 100  $\mu$ g/ml of DME significantly enhanced the osteogenic differentiation as evaluated from ALP activity at day 10 and calcium deposition at day 21. The G:SF carriers, which produced by weight blending ratio of 100:0, 70:30, and 50:50, weighed  $13.28 \pm 0.50$ ,  $12.86 \pm 0.56$  and  $11.36 \pm 0.63$  mg, respectively and showed a burst releasing of DME around  $12.93 \pm 7.84$  to  $21.42 \pm 1.18$  in PBS. In vitro release experiment of DME from these carriers for 48 hours showed controlled-release pattern. The increasing of Thai silk fibroin blending amount resulted in the decreasing of degradation rate of the carriers. The slowest releasing pattern of DME could be observed in a G:SF 50:50 scaffold, therefore, this ratio had been assumed to be the best scaffold interacted with DME. The results indicated that G:SF carriers had a high potential to be applied in DME controlled release applications.

Field of Study : Biomedical Engineering ..... Student's Signature .....

Academic Year : 2011 ..... Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา และศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ซึ่งได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก และ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง กรรมการที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ศูนย์ส่งเสริมการวิจัยในภูมิภาคเอเชียของมูลนิธิเกาหลีก่อการศึกษาชั้นสูง ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนพัฒนาวิชาการวิศวกรรมชีวเวชในแผนพัฒนาฯ ฟ้าฯ 100 ปี ที่มอบทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล ห้องปฏิบัติการวิจัยวัสดุทางการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ห้องปฏิบัติการ i-Tissue คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และเชื้อเพื่อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ พี่น้องนิสิตกลุ่มงานวิจัยวัสดุทางการแพทย์ สำหรับคำแนะนำ ความรู้และทักษะการขึ้นรูปชีววัสดุ และความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ คุณนันทวรรณ เนาวจิณี หน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือด้านความรู้และทักษะการเพาะเลี้ยงเซลล์ ขอขอบคุณพี่น้องนิสิตและเจ้าหน้าที่หลักสูตรสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช พี่น้องนิสิตและเจ้าหน้าที่หลักสูตรสาขาชีววิทยาช่องปาก ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยและการดำเนินธุรกรรมต่างๆ จนสำเร็จ

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย ขอโมทนาขอบพระคุณองค์พระผู้เป็นเจ้าสำหรับการอำนวยการและอุปการะของพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ตลอดจนทุกท่านที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จ

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช

### บทที่

1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	3
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กระดูก (Bones) .....	4
2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของกระดูก.....	4
2.1.2 องค์ประกอบของกระดูก (Organization of bone).....	6
2.1.3 การสร้างกระดูก (Bone formation) .....	8
2.1.4 การปรับแต่งรูปกระดูก (Bone remodeling).....	12
2.1.5 การสมานแผลของกระดูก (Bone healing).....	14
2.2 สารสกัดจากเนื้อฟัน (Dentin matrix extracts; DMEs) .....	15
2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) .....	19

2.4 ระบบควบคุมการปลดปล่อยสาร (Controlled release system) .....	20
2.5 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) .....	20
2.6 ชีววัสดุ (Biomaterial) .....	21
2.6.1 เจลาติน (Gelatin) .....	21
2.6.2 ไฟโบรอินไหมไทย (Thai Silk Fibroin) .....	27
3 วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย .....	32
3.1 วัสดุและสารเคมี .....	32
3.2 อุปกรณ์ .....	33
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย .....	34
3.3.1 สกัดและศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดจากเนื้อฟัน .....	35
3.3.1.1 ผลได้ของการสกัด .....	37
3.3.1.2 น้ำหนักโมเลกุล .....	37
3.3.1.3 ประจุ .....	38
3.3.1.4 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1 .....	38
3.3.1.5 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1 .....	40
3.3.2 ผลิตตัวนำส่งจากเจลาตินและเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย และศึกษาลักษณะ สมบัติของตัวนำส่ง .....	42
3.3.2.1 ลักษณะทางกายภาพ .....	43
3.3.2.2 ความคงตัวของตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ .....	44



3.3.2.3 การย่อยสลายภายนอกร่างกาย .....	44
3.3.3 การทดสอบระบบควบคุมการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย.....	45
3.3.3.1 อัตราการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย .....	45
3.3.3.2 ผลของระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลง ของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1 .....	45
3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	47
4 ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง .....	48
4.1 ลักษณะสมบัติของสารสกัดจากเนื้อฟัน.....	48
4.1.1 ผลได้ของการสกัด .....	49
4.1.2 น้ำหนักโมเลกุล .....	49
4.1.3 ค่าความเป็นประจุ .....	51
4.1.4 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1.....	52
4.1.5 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1 .....	56
4.2 ลักษณะสมบัติของตัวนำส่ง.....	61
4.2.1 ลักษณะทางกายภาพ .....	62
4.2.2 ความคงตัวของตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	64
4.2.3 อัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งนอกร่างกาย .....	66
4.3 การทดสอบระบบควบคุมการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย .....	68
4.3.1 อัตราการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย .....	68

4.3.2 ผลของระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1 .....	73
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	75
รายการอ้างอิง.....	78
ภาคผนวก ก .....	86
ภาคผนวก ข .....	91
ภาคผนวก ค .....	93
ภาคผนวก ง.....	96
ภาคผนวก จ .....	98
ภาคผนวก ฉ .....	101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	106

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของสารเนื้อฟัน.....	18
2.2 กรดอะมิโนในเจลาติน .....	23
2.3 สมบัติของเจลาติน Type A และ B.....	24
3.1 ซีโอีนและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ PCR.....	47
4.1 ค่าศักย์เซต้าของสารสกัดจากเนื้อฟัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส .....	52
4.2 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาในการเพิ่ม จำนวนจากเดิมเป็น 2 เท่า (PDT) ของเซลล์ MC3T3-E1 .....	45
4.3 ลักษณะสมบัติทางกายภาพและการดูดซับสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ของตัวนำส่งที่ ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยในอัตราส่วนต่างๆ .....	64
จ. การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA .....	98
จ.1 ส่วนประกอบในการทำ Polymerase chain reaction โดยชุด Taq DNA Polymerase kit..	103
จ.2 จำนวน Thermal cycle ในการทำ PCR ของยีนต่างๆ .....	10

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 กระดูกต้นขาตัดขวาง แสดงลักษณะของกระดูกเนื้อแน่นและกระดูกเนื้อโปร่ง.....	5
2.2 ภาคตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก .....	6
2.3 ขั้นตอนการเจริญพัฒนาจากเซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal stem cell เปลี่ยนเป็นเซลล์ osteoblast และเซลล์ osteocyte และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในแต่ละขั้นตอน .....	8
2.4 การสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน.....	10
2.5 ความสัมพันธ์ผกผันระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ออสติโอบลาสต์ในการเพาะเลี้ยง .....	10
2.6 การแสดงออกของ ALP ด้วยเทคนิค Histochemical staining และการแสดงออกของยีนต่างๆ ด้วยเทคนิค Northern blot ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เซลล์ออสติโอบลาสต์จากกะโหลกศีรษะของหนูเมาส์ .....	10
2.7 กระบวนการปรับแต่งรูปกระดูก .....	14
2.8 กระบวนการสมานแผลของกระดูก .....	15
2.9 ส่วนต่างๆ ของฟัน .....	16
2.10 หลักการเบื้องต้นของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก .....	20
2.11 โครงสร้างทางเคมีของเจลาติน .....	22
2.12 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิด A และ B .....	22

รูปที่	หน้า
2.13 วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและเชื่อมขวางด้วยวิธีต่างๆ.....	27
2.11 โครงสร้างของเส้นใยไหม .....	28
2.15 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมและวิธีขึ้นรูปสารละลายไฟโบรอินไหมแบบต่างๆ.....	31
3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย .....	34
3.2 ตัวอย่างพื้นมนุษย์ .....	35
3.3 เครื่อง Low speed cutting machine รุ่น ISOMET1000 ยี่ห้อ BUEHLER.....	36
3.4 พื้นที่ถูกบดจนกลายเป็นผงฟุ้ง ถูกนำมาแช่ใน 0.5 M EDTA ที่ 4 องศาเซลเซียส และกวน สารด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลาย ออกไป .....	36
3.5 ผง DME ที่ได้หลังผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง .....	37
3.6 ตำแหน่งในการวัดค่าศักย์ซีต้า.....	37
4.1 ผง DME ที่ได้หลังผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งแล้ว .....	52
4.2 ผล Gel electrophoresis (แบบ SDS-PAGE) ของสารสกัดเนื้อฟืน.....	50
4.3 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ MC3T3-E1 วิเคราะห์ด้วย MTT assay โดยเฉพาะเลี้ยงเริ่มแรก ความหนาแน่น $1.05 \times 10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร สภาวะที่มี CO <sub>2</sub> รั้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ตลอดการเลี้ยง .....	55
4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALP โดยเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุม (OM) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม Dex (OM+Dex) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME (OM+DME) และ	

รูปที่	หน้า
อาหารเลี้ยงเซลล์ผสมทั้ง Dex และ DME (OM+Dex+DME) โดยใช้ DME เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร .....	59
4.5 การย้อมสีด้วย Alizarin red-s ซึ่งแสดงการสังเคราะห์แคลเซียมของเซลล์ MC3T3-E1 ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุม (OM, control) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม Dex (OM+Dex) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME (OM+DME) และอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมทั้ง Dex และ DME (OM+Dex+DME) โดยใช้ DME เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร .....	61
4.6 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟัน (DME) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ALP ของเซลล์ MC3T3-E1 วิเคราะห์ผลในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเซลล์ในส่วนผสมต่างๆ กับค่ากิจกรรมเอนไซม์ ALP.....	61
4.7 รูปถ่ายตัวนำส่งเจลาตินชนิด A (G:SF 100:0) และตัวนำส่งเจลาตินชนิด A ผสมไฟโบรอิน ไหมไทย ในอัตราส่วน 70/30 และ 50/50 (G:SF 70:30 และ G:SF 50:50 ตามลำดับ) .....	62
4.8 รูปถ่ายพื้นผิวแบบตัดขวางแนวตั้งฉาก (vertical cross section) และพื้นผิวแบบตัดขวางแนวระนาบ (horizontal cross section) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย (G:SF) ในอัตราส่วนผสม 100:0, 70:30 และ 50:50 (กำลังขยาย 50 และ 350 เท่า) .....	66
4.9 ร้อยละน้ำหนักของตัวนำส่งแบบต่างๆ ที่สูญเสียไปเนื่องจากถูกละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 และ 5 วัน.....	68
4.10 อัตราการย่อยสลายของตัวนำส่ง เมื่อแช่ตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส .....	70

รูปที่	หน้า
4.11 ผลอัตราการปลดปล่อย DME ของตัวนำส่งแต่ละชนิด วิเคราะห์ที่เวลา 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้การวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA-assay.....	72
4.12 การแสดงออกของยีน collagen-1, alkaline phosphatase, osteocalcin, และ osteopontin ของเซลล์ MC3T3-E1 ที่เวลา 10 วัน ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยแผนภาพแสดงอัตราส่วนค่าความเข้มแสงของการแสดงออกของยีนต่างๆ ต่อค่าความเข้มแสงของการแสดงออกของยีน GAPDH .....	72
ก.1 เครื่อง SDS-PAGE apparatus (Biorad, USA).....	96
ก.2 หลักการทำงานของเครื่อง SDS-PAGE apparatus .....	96
ก.3 หลักการแยกโปรตีนของ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) .....	96
ก.4 ตัวอย่างแถบสีของโปรตีนมาตรฐานในการทำ SDS-PAGE .....	90
ก.5 ตัวอย่างการเทียบแถบสีของโปรตีนที่ต้องการศึกษากับโปรตีนมาตรฐาน.....	90
ข.1 สาร MTT ถูกเปลี่ยนเป็น formazan product ด้วยกระบวนการ mitochondrial reductase...	92
ข.2 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ MC3T3-E1 ด้วยวิธี MTT-assay.....	101
ค.1 ตัวอย่างกราฟแสดงช่วงต่างๆในการเจริญเติบโตของเซลล์ .....	93
ค.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม 10% .....	95
ง. กราฟมาตรฐานของการวัดกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ด้วยวิธี ALP-assay .....	97
จ. กราฟมาตรฐานของ BSA โดยใช้การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA-assay .....	95
ฉ. รูปถ่ายภายใต้แสงยูวีแสดงแถบโปรตีนจากกระบวนการ agarose gel electrophoresis.....	105

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันปัญหาสุขภาพที่เป็นปัญหาใหญ่ระดับชาติ ก็คือ ปัญหาโรคกระดูกและข้อ การแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยศัลยกรรมกระดูกนั้น เมื่ออาศัยความรู้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue engineering) เข้ามาช่วย ทำให้สามารถปลูกถ่ายกระดูกหรืออุดช่องว่างในกระดูกด้วยการใช้วัสดุทดแทนทางชีวภาพ เพื่อทดแทน และซ่อมแซมเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ ความก้าวหน้าทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นนั้น จะต้องพัฒนาองค์ความรู้ที่สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffolds) การใช้สารกระตุ้นการเจริญ หรือ โกรทแฟกเตอร์ (growth factors) และการใช้เซลล์ (cells)

การรักษากระดูกด้วยวิธีทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้น แม้ว่าจะมีการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์จนได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับเซลล์กระดูกแล้วนั้น ยังพบว่า ระยะเวลาในการรักษา (healing) หรือระยะเวลาในการขยายจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) นั้นยังใช้เวลาค่อนข้างนานอยู่ จึงต้องอาศัยการใช้โกรทแฟกเตอร์ (growth factor) เข้ามาช่วย รายงานวิจัยพบว่าสารเนื้อฟัน (dentin matrix) ประกอบด้วย โกรทแฟกเตอร์เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะโกรทแฟกเตอร์กลุ่ม Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) และ Bone morphogenetic proteins (BMPs) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการเกิดกระดูกเมื่อฝังในชั้นกล้ามเนื้อได้ [Mizutani et al., 1996] และจากรายงานการศึกษาสารสกัดจากเนื้อฟันโค พบว่า มีผลในการกระตุ้นการแบ่งตัวและการสังเคราะห์คอลลาเจนของเซลล์ [Yongchaitrakul and Pavasant, 2004] ดังนั้นการผลิตสารสกัดจากเนื้อฟัน (dentin matrix extract, DME) จากฟันมนุษย์ เพื่อนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกจึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมากและเพื่อเป็นการส่งเสริมประสิทธิภาพในการใช้งานสารสกัดจากเนื้อฟันนี้ จึงมีความมุ่งหวังในการพัฒนาระบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled release system) สารสกัดจากเนื้อฟันนี้ จากชีววัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) อีกด้วย

เจลาตินเป็นชีววัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้รับความสนใจในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากคุณสมบัติที่เหมาะสม คือ สามารถเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต (biocompatibility)



สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable) ไม่ก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (non-immunogenic) และง่ายต่อการขึ้นรูปในหลากหลายรูปแบบ จากการศึกษาพบว่า เจลาตินถูกใช้เป็นวัสดุหลักในการผลิตตัวนำส่ง (carrier) สำหรับระบบควบคุมการปลดปล่อยสารโกรทแฟคเตอร์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางประจุ ได้ด้วย [Patel et al., 2008, Okhawilaia et al., 2010] อย่างไรก็ตาม พบว่า เจลาตินมีอัตราการย่อยสลายที่ค่อนข้างเร็ว จึงต้องอาศัยการเชื่อมขวาง (crosslinking) หรือการผสมชีววัสดุอื่นที่ช่วยให้อัตราการย่อยสลายช้าลง

ไฟโบรอินใหม่เป็นวัสดุที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี และมีอัตราการย่อยสลายที่ช้า ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เหมาะสมในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นอย่างยิ่ง อีกทั้งยังพบรายงานว่า ไฟโบรอินใหม่ถูกนำมาใช้ในงานควบคุมการปลดปล่อยสาร เช่น โกรทแฟคเตอร์ของระบบประสาท (nerve growth factors) และเดกซ์แทรน (dextran) เป็นต้น [Hofmann et al., 2006, Uebersax et al., 2007]

จากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่า ชีววัสดุผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยนั้น สามารถขึ้นรูปได้หลากหลายรูปแบบ เช่น อนุภาคขนาดเล็ก พิล์ม เส้นใยจากการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต หรือโครงสร้างสามมิติที่มีรูพรุนเชื่อมต่อกัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี อีกทั้งไฟโบรอินใหม่ไทยยังช่วยให้อัตราการย่อยสลายของวัสดุช้าลง แต่ไม่รบกวนคุณสมบัติของเจลาตินที่ส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก [Chamchongkaset et al., 2008, Jetbumpenkul et al., 2009, Vachiraroj et al., 2009]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการสกัดสารสกัดเนื้อพืชมนุษย์ ศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดเนื้อพืชมนุษย์ และพัฒนาการใช้เจลาตินเป็นวัสดุหลักในการผลิตตัวนำส่ง เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อพืชมนุษย์ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมการปลดปล่อย จึงมีการผสมไฟโบรอินจากใหม่ไทยร่วมกับเจลาติน เพื่อช่วยยืดระยะเวลาการย่อยสลายของตัวนำส่ง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสกัดและศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดเนื้อพืชมนุษย์ อีกทั้งผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของตัวนำส่งสารสกัดเนื้อพืชมนุษย์ดังกล่าว โดยใช้เจลาติน และไฟโบรอินจากใหม่ไทย เป็นวัสดุหลักในการผลิตตัวนำส่ง

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 สกัดสารเนื้อพื้จากพื้มนุษย์ และศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆ ของสารสกัดเนื้อพื้

1.3.2 ทดสอบผลของสารสกัดเนื้อพื้ ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไลน์กระดูก ชนิด MC3T3-E1

1.3.3 ผลิตตัวนำส่งจากเจลาติน และเจลาตินผสมไฟโบรอินใหม่ไทยพื้ฐานางน้อย ศรีสะเกษ1 โดยวิธีทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) ร่วมกับสารเชื่อมขวาง โดยมีตัวแปรที่จะศึกษาคือ อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาติน กับไฟโบรอินใหม่ไทย ได้แก่ 100/0, 70/30 และ 50/50 และวิเคราะห์ลักษณะ สมบัติทางกายภาพ และการย่อยสลายของตัวนำส่ง

1.3.4 ทดสอบระบบควบคุมการปลดปล่อยสารในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาอัตราการปลดปล่อยสาร และผลของระบบควบคุมการปลดปล่อยสารในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และสัญญาณการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ไลน์กระดูก ชนิด MC3T3-E1

### 1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.4.1 วิธีการในการสกัด และลักษณะสมบัติของสารสกัดจากเนื้อพื้มนุษย์ ตลอดจนผลของสารสกัดเนื้อพื้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เพื่อนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

1.4.2 ข้อมูลในการพัฒนาระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดเนื้อพื้ และการพัฒนาตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินใหม่ไทย

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กระดูก (Bones)

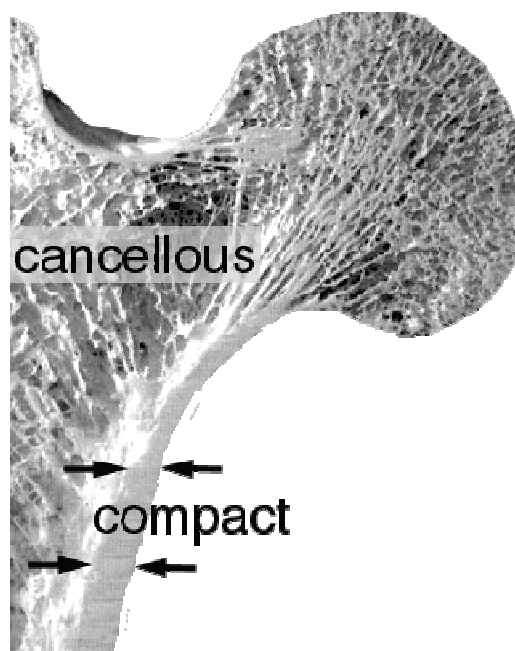
##### 2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของกระดูก

กระดูก (bones) เป็นอวัยวะที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างแข็งภายใน (endoskeleton) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง หน้าที่หลักของกระดูกคือการค้ำจุนโครงสร้างของร่างกาย การเคลื่อนไหว การสะสมแร่ธาตุและการสร้างเซลล์เม็ดเลือด กระดูกประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และน้ำ โดยสัดส่วนทั้งสามนี้จะเปลี่ยนไปตามอายุของกระดูก กระดูกที่เจริญเต็มที่จะมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ประมาณร้อยละ 25 สารอนินทรีย์ร้อยละ 65 และน้ำร้อยละ 10

ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ของกระดูก ประกอบด้วยคอลลาเจนถึงร้อยละ 93 ที่เหลือเป็นสารจำพวกโปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) และโปรตีนอื่นๆ ซึ่งไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagen proteins) โดยการจัดเรียงตัวที่เหมาะสมเป็นระเบียบของคอลลาเจน การผสมผสานกันอย่างพอเหมาะของคอลลาเจนและแร่ธาตุต่างๆ ในเนื้อเยื่อพื้นมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการที่กระดูกมีอัตราส่วนของความแข็งแรงต่อน้ำหนัก (strength to weight ratio) สูงเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างอื่นๆ ในร่างกาย และช่วยให้กระดูกสามารถต้านทานต่อแรงดึงและแรงบิด (tractional and torsional forces) [Duthie and Bentley, 1983] ในขณะที่ส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์คือ เกลือแร่ต่างๆ ที่สำคัญคือแคลเซียมและฟอสเฟต เนื้อเยื่อส่วนนี้จะทำให้กระดูกมีความแข็งแรง (rigidity) และสามารถทนต่อแรงอัด (compressive strength)

กระดูกไม่ได้เป็นโครงสร้างที่แข็งทึบเพียงอย่างเดียว หากแต่มีช่องว่างที่อยู่ระหว่างโครงสร้างแข็ง ถ้าพิจารณาตามลักษณะเนื้อกระดูกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนด้านนอกของกระดูกจะมีเนื้อกระดูกที่แข็งมากๆ และมีช่องว่างของเนื้อกระดูกน้อยมาก เรียกว่า กระดูกเนื้อแน่น (compact bone หรือ cortical bone) คิดเป็นประมาณร้อยละ 80 ของเนื้อกระดูก ส่วนด้านในของกระดูกจะมีลักษณะที่โปร่งคล้ายเส้นใยสานกัน เรียกว่า กระดูกเนื้อโปร่ง (spongy bone หรือ cancellous bone) ซึ่งทำให้กระดูกมีความเบา และเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดและไขกระดูก (bone marrow) ดังรูปที่ 2.1 และจะมีเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) หุ้มด้านนอกสุดของ

กระดูกอยู่โดยรอบ และมีหลอดเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยงเนื้อกระดูก ยกเว้นที่บริเวณข้อต่อ จะไม่มีเยื่อหุ้มกระดูกอยู่

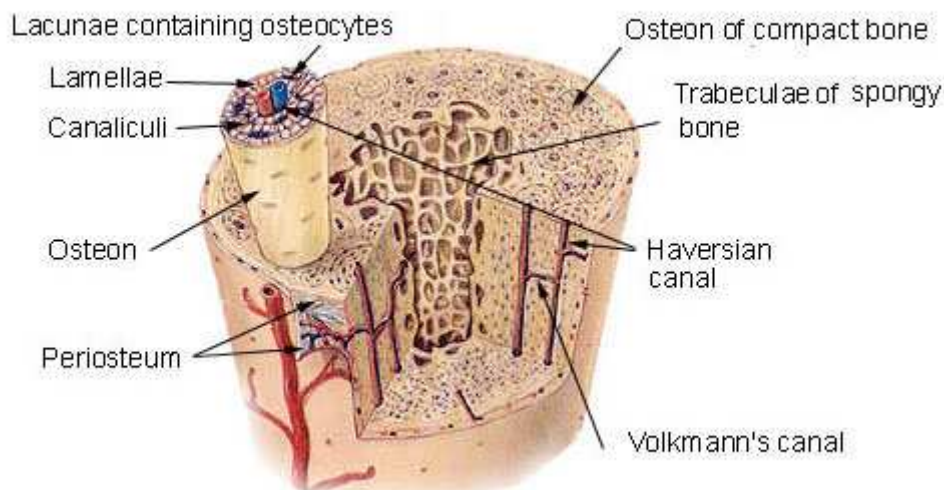


**รูปที่ 2.1** กระดูกต้นขาตัดแบบขวาง แสดงลักษณะของกระดูกเนื้อแน่น (compact bone) และกระดูกเนื้อโปร่ง (cancellous bone) [Baker and Fernandes, 2008 : online]

เนื้อเยื่อพื้นฐานของกระดูกคือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษ เรียกว่าเนื้อเยื่อกระดูก (osseous tissue) ประกอบขึ้นจากวัสดุคอมโพสิตที่มีความแข็งแรงแต่น้ำหนักน้อย ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (calcium hydroxyapatite) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความแข็งเกร็ง (rigidity) สูง และต่อต้านแรงกดได้มาก [Paul et al., 2008] นอกจากนี้ยังมีคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนเส้นใย ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกระดูก

เมื่อดูโครงสร้างของกระดูกเนื้อแน่นได้กล้องจุลทรรศน์ จากรูปที่ 2.2 จะพบว่าเนื้อเยื่อกระดูกมีลักษณะที่เป็นวงซ้อนๆกัน โดยที่มีศูนย์กลางเป็นช่องขนาดใหญ่ที่เรียกว่า ช่องฮาเวอร์เซียน (Haversian canal) ซึ่งเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูก และวงรอบๆจะเป็นที่อยู่ของเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่แล้ว

### Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)



รูปที่ 2.2 ภาคตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก

[Darling, 2012 : online]

#### 2.1.2 องค์ประกอบของกระดูก (Organization of bone)

ในเนื้อเยื่อกระดูกจะประกอบด้วยองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ เซลล์กระดูก (bone cells) และ เนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue) โดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกและการสลายแบ่งออกเป็น 4 ชนิด (รูปที่ 2.3) ได้แก่

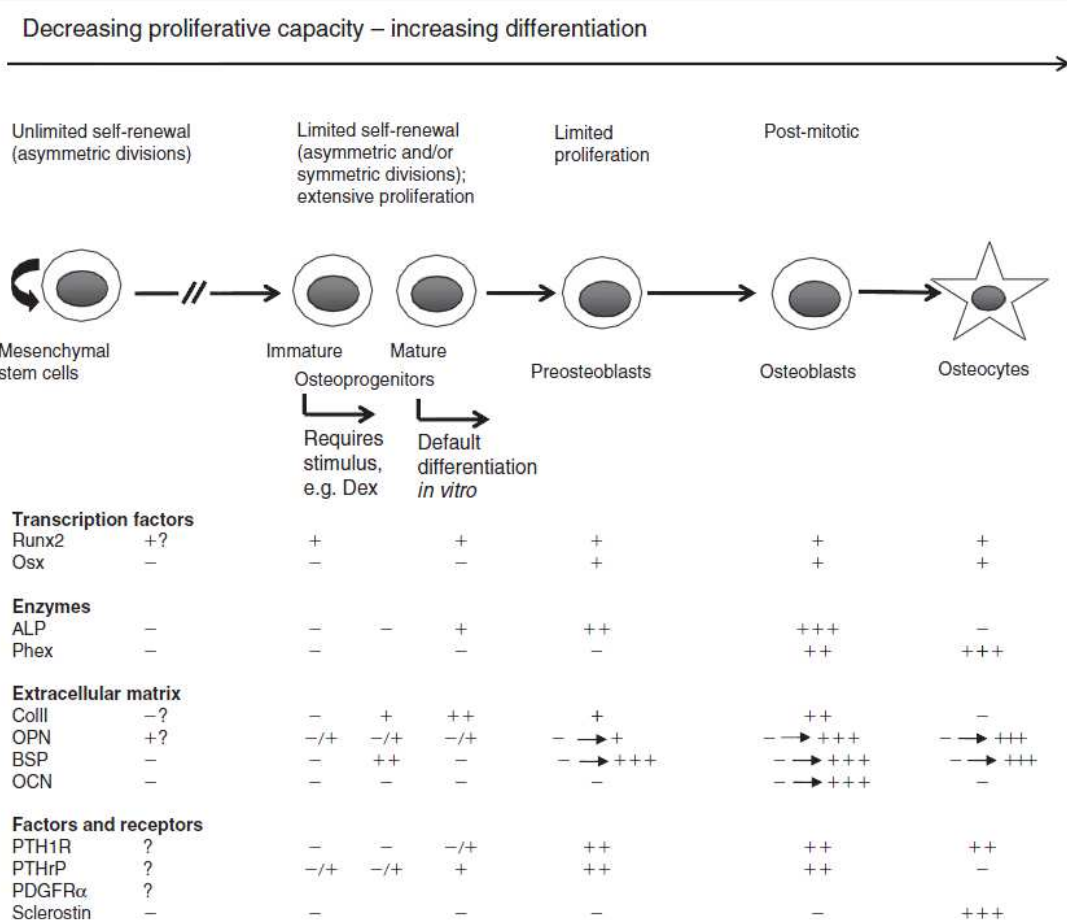
- ออสติโอโปรเจนิเตอร์ (osteoprogenitor) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal stem cells โดยมีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ (confluency) เมื่อเซลล์เจริญเข้ามาสัมผัสกันจะกระตุ้นกลไбыับยั้งวัฏจักรเซลล์ไม่ให้เกิดการแบ่งตัว แต่มีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลง (differentiation) เป็นเซลล์ออสติโอบลาสต์

- ออสติโอบลาสต์ (osteoblast) เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) มีการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase; ALP) ออสติโอแคลซิน (osteocalcin; OC) และ ออสติโอพอนติน (osteopontin; OPN) และสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติออยด์ (osteoid) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้จะมี

สารอนินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก รวมทั้งสร้างสารนอกเซลล์อื่นๆอีกด้วย (รูปที่ 2.3) [สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก และ วินัย พากเพียร, 2550]

- ออสติโอไซต์ (osteocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจากออสติโอ بلاสต์ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว รอบๆเซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลากูนา (lacuna) และแต่ละลากูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็กๆ ที่เรียกว่า คานาlikuไล (canaliculi) ซึ่งทำให้เซลล์แต่ละตัว มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาวเวิร์ชเชียนเข้ามาในแต่ละเซลล์ผ่านทางช่องดังกล่าวนี้ แม้ว่าเซลล์ออสติโอไซต์จะเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่แล้ว แต่ก็ยังคงมีหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียมและสารนอกเซลล์อื่นๆ ด้วย

- ออสติโอคลาสต์ (osteoclast) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโมโนไซต์ (monocyte stem cells) เซลล์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการปรับแต่งรูปกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์แอซิด ฟอสฟาเทส (acid phosphatase) เพื่อย่อยสลายเนื้อกระดูก (bone resorption) ให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้ กระบวนการดังกล่าวยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย [Netter et al., 1987]



**รูปที่ 2.3** ขั้นตอนการเจริญพัฒนาจากเซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal stem cell เปลี่ยนเป็นเซลล์ osteoblast และ เซลล์ osteocyte และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในแต่ละขั้นตอน โดย - หมายถึง ไม่พบการแสดงออกของยีน, -/+ หมายถึง เริ่มพบการแสดงออก, +, ++, +++ หมายถึง พบการแสดงออกของยีนอย่างชัดเจน (มากขึ้นตามจำนวนเครื่องหมาย +) , ? หมายถึง ยังต้องการการตรวจสอบเพิ่มเติม [Aubin, 2008.]

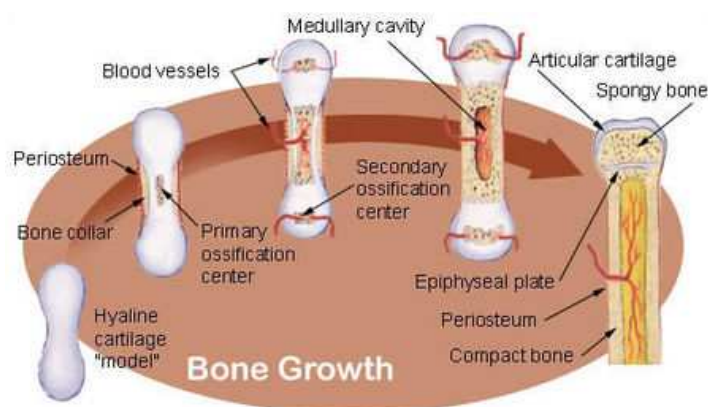
### 2.1.3 การสร้างกระดูก (Bone formation)

การเจริญพัฒนาของกระดูกจะเริ่มตั้งแต่ช่วงที่อยู่ในครรภ์ โดยกระบวนการสร้างเนื้อกระดูก (ossification) สามารถแบ่งออกได้เป็นสองรูปแบบ ได้แก่

1. Intramembranous ossification: เป็นการสร้างเนื้อกระดูกจากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal stem cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดต่างๆ การรวมตัวของเซลล์ดังกล่าวจะทำให้เกิดจุดศูนย์กลางการสร้างกระดูกปฐมภูมิ (primary ossification center) และตามด้วยการสะสมแคลเซียมในบริเวณดังกล่าว กระบวนการนี้จะดำเนินต่อไปจนเสร็จสมบูรณ์ การสร้างเนื้อกระดูกในลักษณะนี้มักพบในกระดูกแบบแบน (flat bone) เช่นกะโหลกศีรษะ
2. Endochondral ossification: เป็นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน (cartilage) ที่มีการเจริญมาก่อนแล้ว โดยที่กลุ่มเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchyme) จะเข้าไปแทนที่เซลล์กระดูกอ่อนผ่านทางหลอดเลือด เริ่มจากส่วนกลางของกระดูกซึ่งเป็นจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ เมื่อเซลล์มีเซนไคม์ มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก จึงมีการสะสมของเนื้อกระดูกมากขึ้น นอกจากนี้ มักพบว่าจะมีจุดศูนย์กลางการสร้างกระดูกทุติยภูมิ (secondary ossification center) ที่บริเวณปลายกระดูก โดยการสร้างกระดูกในจุดนี้จะเริ่มหลังจากคลอด การสร้างกระดูกในทั้งสองจุดจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งมาบรรจบกันที่แนวแผ่นอีพิไฟเซียล (epiphysial plate) ซึ่งเป็นแนวของกระดูกอ่อนที่ยังสามารถทำให้เกิดการยืดของกระดูกได้ จนกระทั่งเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ แนวดังกล่าวนี้จะถูกแทนที่ด้วยกระดูกทั้งหมด ดังรูปที่ 2.3

สำหรับในผู้ใหญ่ แม้กระบวนการเจริญพัฒนาของกระดูกจะหยุดไปแล้ว แต่ยังคงมีกระบวนการปรับแต่งรูปของกระดูกอย่างต่อเนื่อง เพื่อซ่อมแซมความเสียหายเล็กๆน้อยๆ ของกระดูก และเป็นการรักษาระดับแคลเซียมในกระแสเลือดอีกด้วย [Bryan et al., 2005]





รูปที่ 2.4 การสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน (Endochondral ossification)

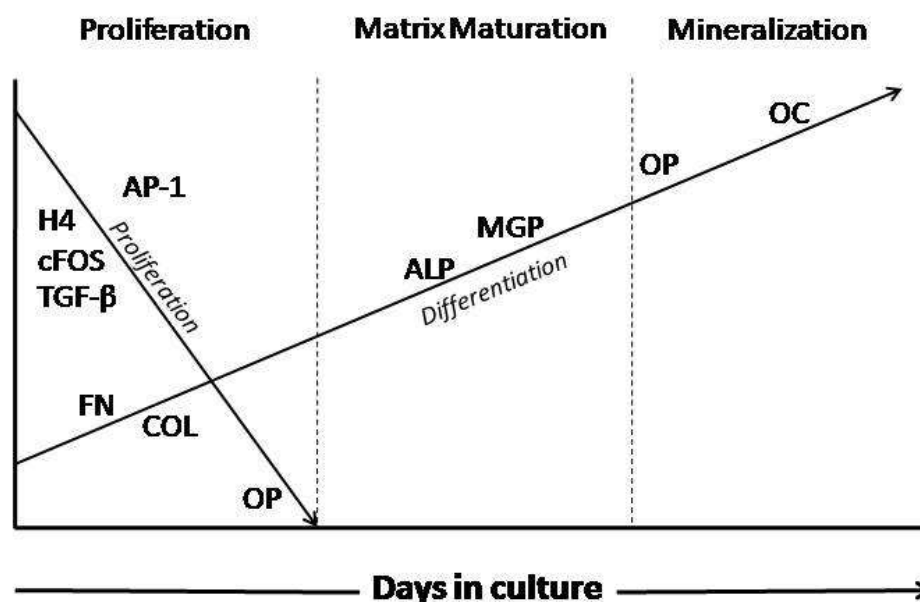
[Darling : online]

การศึกษากการเกิดแร่ธาตุจากเซลล์จำพวกเซลล์สร้างกระดูก (osteoblastic cells) ที่ได้จากการแยกจากเนื้อเยื่อกระดูกของมนุษย์ และหนู นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่แยกออกมาได้จะสังเคราะห์โปรตีน และเอนไซม์ ที่เกิดขึ้นในกระดูก เช่นอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase; ALP) ออสติโอแคลซิน (osteocalcin; OC) และ คอลลาเจน ชนิดที่1 (collagen-1; Col-1) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิที่แยกมาจากกระดูกของมนุษย์ สามารถเลี้ยงไว้ได้นาน 30 วัน และเซลล์จะสร้างปุ่มขนาดเล็กขึ้น ซึ่งปุ่มนี้บรรจุสารเมทริกซ์ (matrix) ที่หนาแน่น โดยมีผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ เมื่อเซลล์ต้องการเริ่มต้นในการเกิดแร่ธาตุของกระดูก จะเกิดกระบวนการปลดปล่อยถุงบรรจุสารเมทริกซ์นี้ออกมาจากเซลล์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น จำเป็นต้องมีการชักนำเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์กระดูกที่ประกอบไปด้วยแร่ธาตุ ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติในการชักนำเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์กระดูกนี้ (osteoconductivity) ได้แก่ เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต ( $\beta$ -glycerophosphate, glucocorticoids) โซเดียมเบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (sodium  $\beta$ -glycerophosphate) แคลเซียมเฮกโซสโมโนฟอสเฟต (calcium hexose monophosphate) และ เดกซาเมทาโซน (dexamethasone) [Kim et al., 2005]

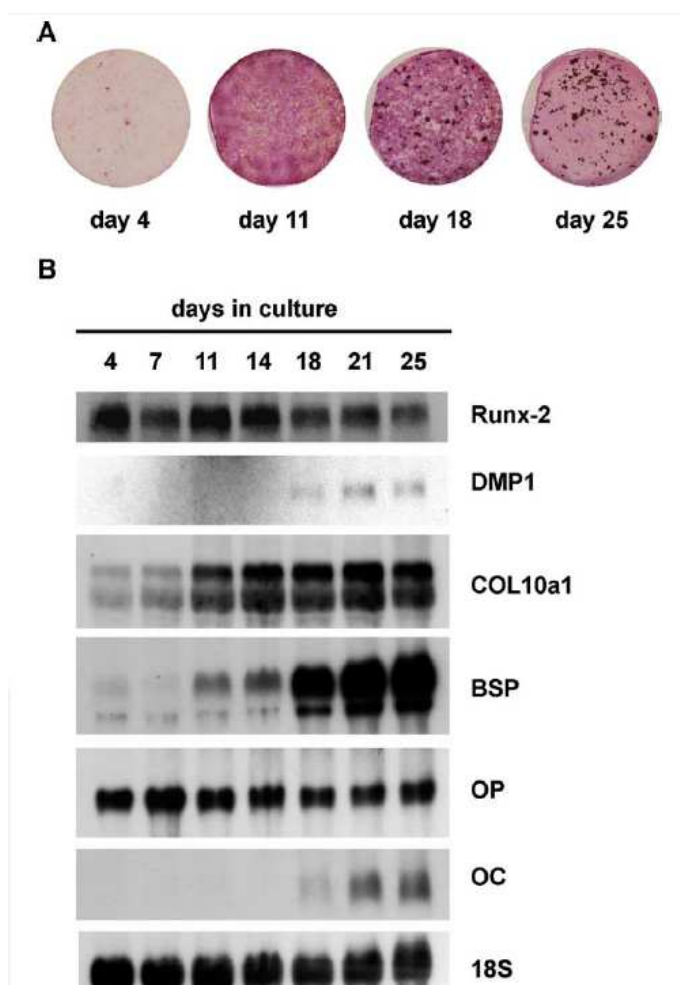
จากการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* cells culture) พบว่า ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ระยะแรก ยีนซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (เช่น histone H4, c-fos, TGF- $\beta$  และ AP-1) แสดงออกลดลง ขณะที่ไฟโบรเนคติน (fibronectin; FN) และ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen-1; Col-1) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างสารเมทริกซ์นอกเซลล์แสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์หยุดการเจริญเพิ่มจำนวนก็จะมีการแสดงออกของ ALP และโปรตีนที่มีกรดกลูตา

มิก (matrix glutamic acid containing protein; MGP) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการสะสมแร่ธาตุแคลเซียม (mineralization) พร้อมกับมีการแสดงออกของ OPN และ OC (รูปที่ 2.5) [ลิตทิกค์ คีร์ ทรรษาเวก และ วินัย พากเพียร, 2550]

ในปี 2004 Kalajzic และคณะได้มีการศึกษาถึงการแสดงออกของ ALP และยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องในเพาะเลี้ยงเซลล์ออสติโอเบลาสต์จากกระดูกศีรษะของหนูเมาส์ (mouse calvarial osteoblast) โดยดูการแสดงออกของ ALP ในวันที่ 4, 11, 18, 25 ของการเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค Histochemical staining พบว่า การแสดงออกของ ALP จะมีมากที่สุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง และแสดงออกน้อยลงในวันที่ 18 และ 25 ตามลำดับ (รูปที่ 2.6 A) และดูการแสดงออกของยีนต่างๆ ในวันที่ 4, 7, 11, 18, 21, 25 ด้วยเทคนิค Northern blot พบว่า Col-1 เริ่มที่การแสดงออกตั้งแต่วันที่ 4 และมากขึ้นเรื่อยๆ จนแสดงออกชัดเจนในวันที่ 11 เป็นต้นไป BSP เริ่มมีการแสดงออกในวันที่ 11 โดยแสดงออกชัดเจนในวันที่ 18 และชัดเจนมากขึ้นในวันที่ 21 และ 25 ในขณะที่ OPN มีพบการแสดงออกตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 25 และมีการแสดงออกมากที่สุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และ OC เริ่มพบการแสดงออกในวันที่ 18 และแสดงออกมากขึ้นในวันที่ 21 และ 25 (รูปที่ 2.6 B) [Kalajzic et al., 2004]



**รูปที่ 2.5** ความสัมพันธ์ผกผันระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ออสติโอเบลาสต์ในการเพาะเลี้ยง [ลิตทิกค์ คีร์ ทรรษาเวก และ วินัย พากเพียร, 2550]



**รูปที่ 2.6** การแสดงออกของ ALP ในวันที่ 4, 11, 18, 25 ของการเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค Histochemical staining และการแสดงออกของยีนต่างๆ ในวันที่ 4, 7, 11, 18, 21, 25 ด้วยเทคนิค Northern blot ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ออสติโอบลาสต์จากกะโหลกศีรษะของหนูเมาส์ [Kalajzic et al., 2004]

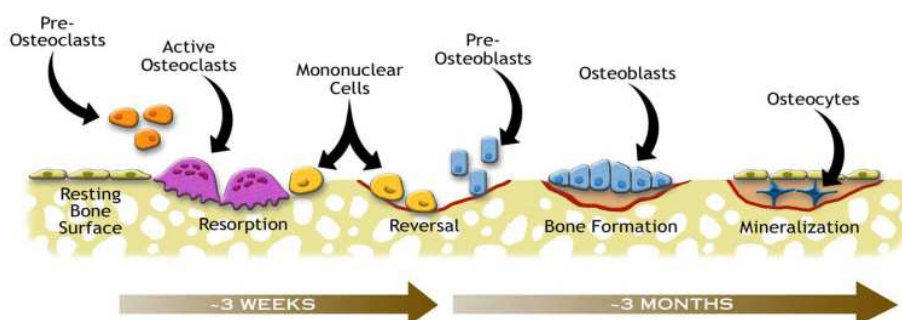
#### 2.1.4 การปรับแต่งรูปกระดูก (Bone remodeling)

การสลายกระดูกเก่าและการสร้างกระดูกใหม่ หรือเรียกว่าการปรับแต่งรูปกระดูก (bone remodeling) นั้นเกิดขึ้นตลอดเวลา มีการผลิตเปลี่ยนเนื้อกระดูกทดแทนกันตลอดเวลา เพื่อให้กระดูกมีสุขภาพดี และดำรงความแข็งแรงของกระดูกไว้ การย่อยสลายเนื้อกระดูกจะเกิดขึ้นก่อน และการสร้างกระดูกใหม่จะเกิดขึ้นในตำแหน่งนั้น ทำให้ได้ผลลัพธ์คือกระดูกใหม่ที่แข็งแรง

ทดแทนกระดูกเก่าที่สุขภาพด้อยลงแล้ว ส่วนการสร้างกระดูกใหม่จะสามารถซ่อมส่วนของกระดูกที่ถูกกร่อนสลายไปได้ทั้งหมดหรือไม่ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมภายในร่างกาย และการเคลื่อนไหวร่างกายของบุคคลนั้นๆ [สุริย์พร บุญจง, 2001]

กระบวนการปรับแต่งรูปกระดูก (รูปที่ 2.7) ประกอบด้วย

1. Resorption: เป็นขั้นตอนที่กระตุ้นให้ออสติโอคลาสต์เกิดการเจริญเติบโต และดำเนินการย่อยสลายกระดูกจนเกิดเป็นหลุมขนาดเล็ก
2. Reversal: เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นเมื่อการย่อยสลายสิ้นสุด กลุ่มเซลล์โมโนนิวเคลียร์ (mononuclear cells) จะเข้ามาเพื่อปรับพื้นผิวกระดูกส่วนนั้น เตรียมพร้อมให้เซลล์ออสติโอเบลาสต์สร้างกระดูกใหม่
3. Formation: เซลล์ออสติโอเบลาสต์สร้างเนื้อกระดูกจนเต็ม เกิดการสะสมแคลเซียมและแร่ธาตุต่างๆ จนได้กระดูกใหม่ที่แข็งแรง
4. Resting: พื้นผิวของกระดูกถูกปกคลุมด้วยเซลล์เยื่อบุผิวเรียบ (flat lining cells) มีกิจกรรมภายในเซลล์กระดูกเกิดขึ้นตามปกติ จนกระทั่งเกิดการปรับแต่งรูปกระดูกรอบใหม่

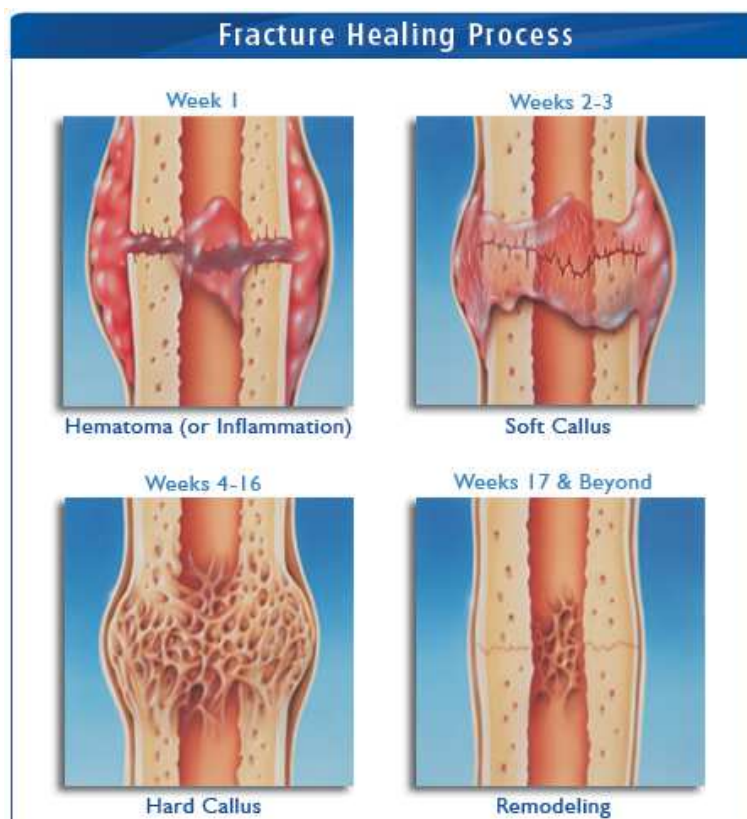


รูปที่ 2.7 กระบวนการปรับแต่งรูปกระดูก [Sardone, 2010 : online]

### 2.1.5 การสมานแผลของกระดูก (Bone healing)

เมื่อเกิดกระดูกหักเส้นเลือดในกระดูกจะฉีกขาด เกิดเลือดออก (hematoma) ภายในและรอบๆ กระดูกที่หัก หลังจากนั้นจะเกิดร่างแหของไฟบริน (fibrin) ภายในบริเวณที่มีเลือดออก ทำให้เกิดก้อนเลือดแข็งหุ้มกระดูกที่หักไว้ พบการสร้างเส้นเลือดฝอยและการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เป็นจำนวนมาก ในขณะเดียวกันลิ่มเลือด (blood clot) และเซลล์อักเสบบริเวณกระดูกที่หัก จะหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) และโกรทแฟกเตอร์ ออกมากระตุ้นเซลล์แหล่งกำเนิดกระดูก (osteoprogenitor cells) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) ช่องไขกระดูก (medullary cavity) และเนื้อเยื่อรอบๆ บริเวณที่หัก เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์จึงเกิดเนื้อเยื่อนิ่มๆ ล้อมรอบบริเวณกระดูกหัก เรียกเนื้อเยื่อนี้ว่า โปรคัลลัส (procallus) ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์มีเซนไคม์ เซลล์แหล่งกำเนิดกระดูก หลอดเลือดฝอย และเซลล์อักเสบ

หลังจากนั้นเซลล์ออสติโอบลาสต์ที่อยู่บริเวณใต้เยื่อหุ้มกระดูก (subperiosteal osteoblasts) จะสร้างกระดูกใหม่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (woven bone) เรียงตัวตามแนวยาวของกระดูกและตามรอยหักของกระดูก ส่วนเซลล์มีเซนไคม์ภายในโปรคัลลัส จะเปลี่ยนแปลงเป็นคอนไดรไรต์ (chondrocytes) แล้วสร้างกระดูกอ่อน (cartilage) จนเต็มบริเวณกระดูกที่หัก ระยะนี้กินเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ กระดูกจะเชื่อมต่อกัน แต่ยังไม่สามารถรับน้ำหนักได้ บริเวณปลายกระดูกที่หักทั้ง 2 ข้างที่มีกระดูกอ่อน มาสัมผัสกับกระดูกใหม่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ จะเกิดการสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน (enchondral ossification) ขึ้น จนมีเนื้อกระดูกอยู่แทนที่กระดูกอ่อน เนื้อกระดูกนี้เรียกว่า โบนนีคัลลัส (bony callus) หลังจากนั้นจะเกิดการสะสมเกลือแร่และการปรับแต่งรูปของกระดูก ภายในโบนนีคัลลัส ในที่สุดบริเวณที่หักจะมีความแข็งแรง และรับน้ำหนักได้ ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กระบวนการสมานแผลของกระดูก

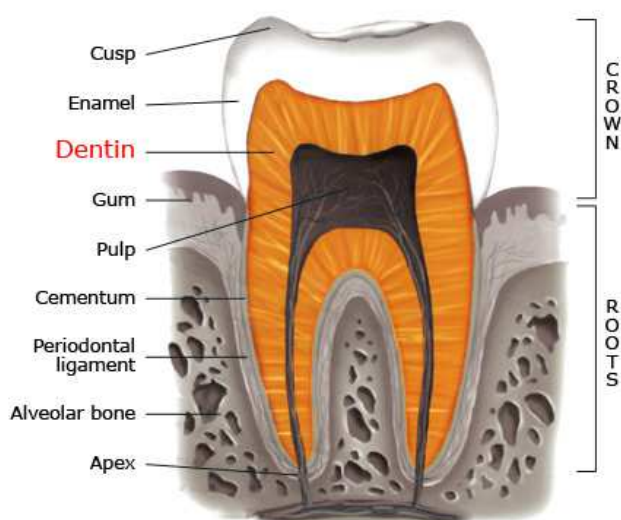
[Orthofix Holdings Inc., 2010 : online]

## 2.2 สารสกัดจากเนื้อฟัน (Dentin matrix extracts; DMEs)

ฟัน (teeth) เป็นอวัยวะที่อยู่ภายในช่องปากของคนและสัตว์ มีส่วนราก (root) ติดอยู่กับขากรรไกรและมีตัวฟัน (crown) โผล่ฟันเหงือกออกมา ฟันเป็นอวัยวะที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) หน้าที่หลักของฟันคือ ฉีก บด อาหารให้คอลลูกเคี้ยวกับน้ำลาย ฟันประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 2.9)

- เคลือบฟัน (enamel) : เป็นส่วนที่แข็งที่สุดของฟันมีส่วนประกอบของแคลเซียมและฟอสเฟต
- เนื้อฟัน (dentin) : เป็นส่วนที่แข็งน้อยกว่าเคลือบฟัน มีความแข็งพอๆกับกระดูก ชั้นนี้มีการสร้างและสลายอยู่ตลอดเวลา

- เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน (pulp) : เป็นที่อยู่ของเส้นเลือดที่นำอาหารมาหล่อเลี้ยงฟัน และนำของเสียออกจากฟัน และมีเส้นประสาทรับความรู้สึกของฟัน
- เคลือบรากฟัน (cementum) : เป็นส่วนของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่อยู่ภายในรากฟัน ซึ่งมีเส้นประสาทไหลเวียนมาก
- ชั้นร่องเหงือก (gingival crevice) : ร่องระหว่างเหงือกตัวฟันกับขอบเหงือก มีความลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร
- เหงือก (gingiva) : เนื้อเยื่อที่หุ้มตัวฟันและกระดูกขากรรไกรไว้
- กระดูกเบ้ารากฟัน (alveolar bone) : ส่วนกระดูกที่รองรับรากฟัน



รูปที่ 2.9 ส่วนต่างๆ ของฟัน

[Studio Dentaire, 2011 : online]

สารเนื้อฟัน (dentin matrix, DM) ประกอบด้วยโปรตีน 2 กลุ่มหลัก คือ คอลลาเจน ประมาณร้อยละ 90 และ โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous proteins) ร้อยละ 10 ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ที่สำคัญคือ โปรตีนเมทริกซ์ที่เป็นกรด (acidic matrix proteins) ได้แก่

- dentin sialophosphoprotein (DSPP) ซึ่งแยกออกได้เป็น
  - dentin phosphoprotein (DPP) (95 kDa)
  - dentin sialoprotein (DSP) (95 kDa)
- dentin matrix protein-1 (Dmp1) (57 kDa)
- bone sialoprotein (BSP) (72-80 kDa)

- osteopontin (OPN) (60-65 kDa)
- osteonectin (ON) (40 kDa)
- osteocalcin (OC) หรือ bone Gla protein (BGP) (5-6 kDa)

โปรตีนเหล่านี้มีศักยภาพในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และโมเลกุลเมทริกซ์นอกเซลล์อีกมากมาย ที่มีบทบาทหน้าที่ในการตอบสนองภาวะทางชีวภาพต่างๆ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell differentiation)

ปี ค.ศ.1967 Urist M.R. และคณะ ได้พบว่า สารเนื้อฟันจากฟันของกระต่ายที่สกัดเอาแร่ธาตุออกแล้ว (Demineralized dentin matrices, DDM) นั้น ช่วยชักนำ (induce) การสร้างกระดูกในช่องระหว่างชั้นง่ามเนื้อของกระต่าย [Urist et al., 1967] หลังจากนั้นก็มีการทำวิจัยในสัตว์ทดลองเกี่ยวกับคุณสมบัติการชักนำให้เซลล์เจริญไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoinductive) ของ DDM พบว่า DDM ช่วยชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกผิดที่ในบริเวณใต้ผิวหนังและในช่องระหว่างชั้นง่ามเนื้อของสัตว์ฟันแทะต่างๆ [Huggins et al., 1970, Butler et al., 1977]

ปี ค.ศ. 1991 Bessho K. และคณะสามารถสกัดโปรตีนที่มีกิจกรรมคล้ายกับกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติชักนำให้เซลล์เจริญไปเป็นเซลล์กระดูก (bone morphogenetic proteins, BMPs) ออกมาจากเนื้อฟันของมนุษย์ได้ แต่พบว่า กรดอะมิโนปลายสาย ( $\text{NH}_2$ -terminal amino acid) ไม่ตรงกับ BMPs ต่อมาในปี ค.ศ. 1999 Nebgan D. และคณะ ก็สามารถสกัดสายโพลีเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติชักนำให้เซลล์เจริญไปเป็นเซลล์กระดูก ได้จากฟันของโค เช่นกัน [Bessho et al., 1991, Nebgan et al., 1999]

จากผลการวิจัยเรื่อง DDM ในแง่ของการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์คอลลาเจนของเซลล์ สามารถบอกได้ว่าใน DDM อุดมไปด้วย growth factors หลากหลายชนิด โดยเฉพาะ transforming growth factor beta ( $\text{TGF-}\beta$ ) และ BMP [Yongchaitrakul and Pavasant, 2004] ทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่า สารสกัดจากเนื้อฟันจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกด้วยเช่นเดียวกัน



ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของสารเนื้อฟัน [Goldberg et al., 2004]

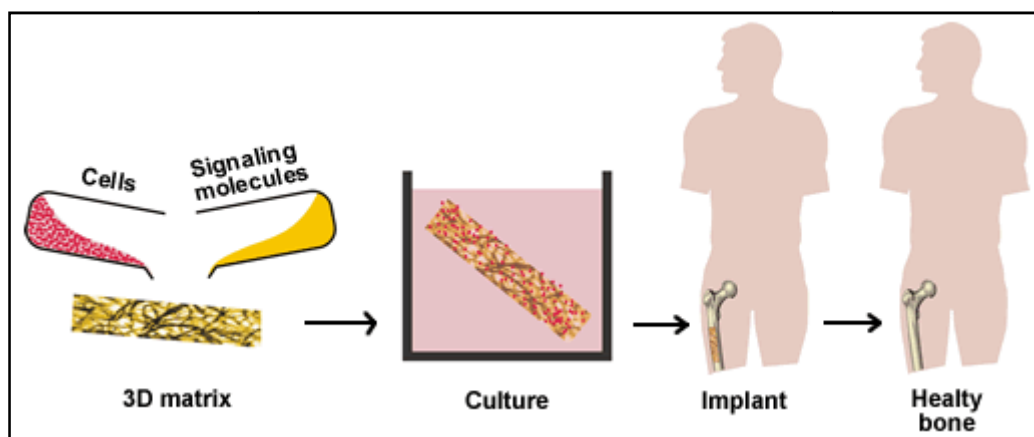
Dentin matrix composition Composition de la matrice de la dentine			
Group	Molecule	Structure	Potential role
Collagens (90%)	Type-I collagen	2( $\alpha$ I)1, 1( $\alpha$ I)2	>Scaffold
	Type-I trimer	3( $\alpha$ I)1 (11%)	>Elasticity of the tissue
	Types III, IV, V, VI	Minor collagens 1–3%	>Increase in culture and pathologic dentins
<b>Non-collagenic proteins (10%)</b>			
Phosphorylated proteins: the SIBLINGs family (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein)	<ul style="list-style-type: none"> <li>☞ DSPP, cleaved into</li> <li>★ DPP</li> <li>and ★ DSP</li> <li>☞ DMP-1 (or BAG-75?)</li> <li>☞ BSP</li> <li>☞ OPN</li> <li>+ one related molecule:</li> <li>☞ MEPE/OF45</li> </ul>	Properties: *Casein-kinase phosphorylation sites *RGD sequence *Polyacid stretches	*Mineralisation: initial nucleation dependent on the concentration, and crystal growth *Signalling molecules *Inhibition of the complement-mediated attack
Non phosphorylated matrix proteins	<ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Matrix GLA- protein</li> <li>☞ Osteocalcin</li> <li>☞ Osteonectin</li> </ul>		Inhibitor or promoter of mineralisation?
Proteoglycans and glycosamino-glycans	<ul style="list-style-type: none"> <li>☞ CS/DS containing SLPRs:</li> <li>Decorin-biglycan</li> <li>☞ KS containing SLRPs:</li> <li>Lumican–fibromodulin–osteoaderhin</li> </ul>		>Inhibitors? Or promoter of mineralisation? >Collagen fibrillogenesis
Proteins also expressed in ameloblasts	Amelogenin 5–7 kDa	Spliced forms A+4 & A-4	Chondrogenic inducing agent-Signalling effects
Growth factors	<ul style="list-style-type: none"> <li>☞ TGF-<math>\beta</math></li> <li>☞ ILGF-I and II</li> <li>☞ FGF-2</li> <li>☞ VEGF, PDGF</li> </ul>		Active or latent form? May be activated? Angiogenic ?
Metallo-proteinases	MMP-1	Collagenase	☞ Native collagen cut into 1/4–3/4
	MMP-2 and -9	Gelatinase A & B	☞ Degradation of collagen peptides
	MMP-3	Stromelysin 1	☞ Proteoglycans
	MMP-20	Enamelysin	☞ Amelogenin expressed by odontoblasts
	MT1-MMP TIMP -1 to -3	Activation of proforms Forming complexes with MMPs	☞ Inhibition of MMPs
Other enzymes	* Alkaline phosphatase		*Phosphate release
Serine-proteinases	* Cathepsins		*Degradation
Serum-derived proteins	$\alpha_2$ HS-glycoprotein		Detected mostly in mineralised tissues
	* Albumin		☞ Lipid carrier
	* Immunoglobulins		☞ involved in dentin mineralisation?
Lipids	Lipoproteins: HDL & LDL		
		Phospholipids	<ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Membrane phospholipids and</li> <li>☞ Extracellular matrix components</li> </ul>

### 2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นศาสตร์ที่นำหลักการของวิศวกรรมและชีววิทยา มาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูรักษา และพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อ (tissue function) ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจ จากการประมาณการของกระทรวงสาธารณสุขของประเทศสหรัฐอเมริกา นั้น ค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคกระดูกและข้อประมาณ 400,000 ล้านดอลลาร์ต่อปี หรือประมาณ 17.5 ล้านดอลลาร์บาท [Langer et al., 2000] ซึ่งนับว่าเป็นจำนวนเงินที่มากที่ไม่อาจมองข้ามได้ ในประเทศไทยนั้นงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์ในแขนงที่ยังใหม่ เป็นส่วนหนึ่งของงานทางด้านวิศวกรรมชีวการแพทย์ (biomedical engineering) โดยต้องนำความรู้ทางด้านวิศวกรรมศาสตร์มาผสมผสานกับความรู้ทางด้านแพทยศาสตร์ เพื่อแก้ปัญหาและส่งเสริมสุขภาพ รวมทั้งพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยโรค และการฟื้นฟูสภาพ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue engineering) มีบทบาทมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากในปัจจุบันปัญหาสุขภาพที่เป็นปัญหาใหญ่ระดับชาติ ก็คือ ปัญหาโรคกระดูกและข้อ โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ ประมาณกันว่าครึ่งหนึ่งของโรคเจ็บป่วยเรื้อรังในผู้สูงอายุคือโรคกระดูกและข้อ การแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยศัลยกรรมกระดูกนั้น สามารถปรับเปลี่ยนทดแทนได้โดยการปลูกถ่ายกระดูกหรือการอุดช่องว่างในกระดูกด้วยการใช้วัสดุทดแทนทางชีวภาพ ซึ่งบางครั้งจำเป็นต้องใช้วัสดุทดแทนกระดูกเสริมให้ในภาวะหรือโรคที่เกิดความผิดปกติและจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัด เช่น กระดูกหัก กระดูกไม่ติดกัน กระดูกแห้ว เนื้องอกในกระดูก และกระดูกติดเขี้ยว อันจะก่อให้เกิดความพิการและทุพพลภาพต่อผู้ป่วย อีกทั้งยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเนื้องอกในกระดูก และผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นโรคกระดูกติดเขี้ยวซึ่งจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดนำเอาส่วนของกระดูกบริเวณที่มีพยาธิสภาพออก จำเป็นต้องได้รับการทดแทน และซ่อมแซมเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ

ในต่างประเทศ วัสดุทดแทนกระดูกได้ถูกจัดว่าเป็นวัสดุปลูกถ่ายที่สำคัญรองจากการให้เลือดและผลิตภัณฑ์จากเลือด การรักษาโดยใช้วัสดุทดแทนกระดูกประกอบด้วยวัสดุปลูกถ่ายจากตัวผู้ป่วยเอง (autograft) วัสดุปลูกถ่ายจากผู้อื่น (allograft) และวัสดุอื่นที่ประดิษฐ์ขึ้น (biomimetic materials) ความรู้ความก้าวหน้าทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ จึงมีส่วนเข้ามาพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยจะต้องศึกษาพัฒนาองค์ความรู้ที่สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ โครงสร้างสามมิติ สารโปรตีนกระตุ้นการเจริญ หรือโกรทแฟกเตอร์ และเซลล์ ดังรูปที่



รูปที่ 2.10 หลักการเบื้องต้นของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

[Khadidja, 2011 : online]

#### 2.4 ระบบควบคุมการปลดปล่อยสาร (Controlled release system)

เนื่องจากการสลายตัวของเนื้อฟันทันจะถูกกำจัดอย่างรวดเร็วโดยกระบวนการของร่างกาย ระบบควบคุมการปลดปล่อยสารจึงถูกนำเข้ามาใช้ เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสาร (Controlled release) โดยมีเป้าหมายคือ เพื่อทำให้เกิดการปลดปล่อยสารอย่างต่อเนื่อง (sustained release) ในร่างกายด้วยกลไกการย่อยสลายของวัสดุตัวนำส่ง (carrier) ซึ่งในการวิจัยนี้คือ เจลาติน (gelatin) และเจลาตินผสมไฟโบรอินไหม (silk fibroin) กล่าวคือ สารสกัดจากเนื้อฟันทันจะเกาะอยู่กับวัสดุตัวนำส่ง หลังจากนั้นวัสดุตัวนำส่งจะค่อยๆย่อยสลายโดยกระบวนการของร่างกาย ทำให้สารสกัดจากเนื้อฟันทันจะค่อยๆหลุด หรือถูกปลดปล่อยออกมา ในปริมาณน้อยๆอย่างต่อเนื่อง

#### 2.5 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold)

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ วัสดุและการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์เป็นสิ่งสำคัญ โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) หรือ เมทริกซ์เทียมนอกเซลล์ (artificial extracellular matrix) คือ วัสดุที่สร้างขึ้นชั่วคราวทรงสามมิติเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ได้ โดยอาจทำการฉีดเซลล์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์และเซลล์จะเจริญเติบโตอยู่ภายในซึ่งต้องมีอาหารและการควบคุมโมเลกุลที่ต้องแพร่ผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ (โปรตีนและโกรทแฟคเตอร์ เป็นต้น) สิ่งกระตุ้นทางกายภาพและเชิงกล อุณหภูมิ ความดันและการขนส่งมวลสารต้องเหมาะสมกับการงอก การแบ่ง

เซลล์ และการเกิดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่ ในขณะที่เดียวกันที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะเกิดขึ้นมาใหม่นั้น วัสดุที่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ต้องสามารถย่อยสลายและไม่ทิ้งสิ่งแปลกปลอมไว้ในร่างกาย [Peter et al., 2004] โดยทั่วไปเรานำโครงเลี้ยงเซลล์ใช้กับผิวหนัง กระดูก ประสาทและตับ เป็นต้น

## 2.6 ชีววัสดุ (Biomaterial)

### 2.6.1 เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากการนำคอลลาเจนทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสบางส่วน (Partial hydrolysis) จากนั้นผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และทำให้แห้งได้เจลาตินที่มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเส้นเอ็น ผิวหนัง กระดูกและเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัวและหมู เป็นต้น เจลาตินประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 84-90, แร่ธาตุร้อยละ 1-2 และน้ำร้อยละ 8-15 ซึ่งองค์ประกอบของเจลาตินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของคอลลาเจนที่ใช้และกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เจลาตินมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 100 กิโลดาลตัน (kDa) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด โดยมีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีน, โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยรายละเอียดปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในเจลาตินสรุปดังตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนของเจลาตินโดยทั่วไปคือ  $-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-$  โครงสร้างของเจลาตินแสดงดังในรูปที่ 2.11

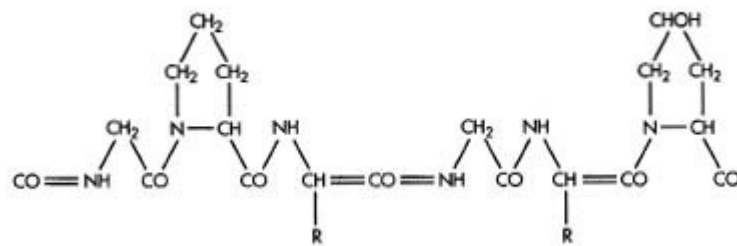
เจลาตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้รับความสนใจในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติที่เหมาะสม คือ สามารถเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต (biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) ไม่ก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (non-immunogenic) และราคาถูก โดยทั่วไปเจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Gelatin ชนิด A หรือเรียก Basic gelatin เจลาตินชนิดนี้ได้จากการผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟูริก เป็นต้น โดยใช้คอลลาเจนที่ได้จากหนังหมูเป็นส่วนใหญ่สมบัติของเจลาตินชนิดนี้ คือ มีประจุเป็นบวก มีค่า pI (isoelectric point) ประมาณ 9 จึงเหมาะสำหรับการใช้งานควบคุมการปลดปล่อยสารหรือโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรดหรือมีประจุเป็นลบ

2. Gelatin ชนิด B หรือเรียก Acidic gelatin ได้มาจากการผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเบสนิยมใช้คอลลาเจนจากหนังวัวและกระดูก ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเบสนี้เกิดปฏิกิริยาที่กลุ่มเอไมด์ของคอลลาเจนซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิล แสดงถึง เจลาตินชนิด B มีค่า pI

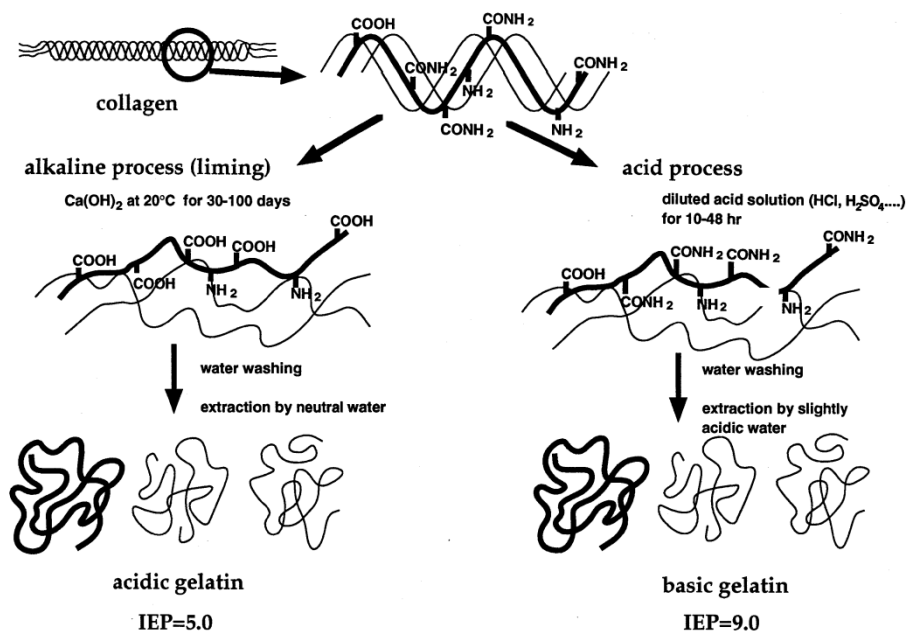
ประมาณ 5 จึงเหมาะสำหรับการใช้งานควบคุมการปลดปล่อยสารหรือโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส หรือมีประจุเป็นบวก [Tabata and Ikada, 1998]

กระบวนการผลิตเจลาตินและการเปรียบเทียบสมบัติของเจลาตินชนิด A และ B แสดงดัง 2.11 และตารางที่ 2.2 ตามลำดับ



รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีแสดงหน่วยซ้ำของเจลาติน


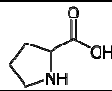
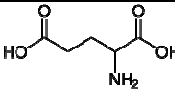
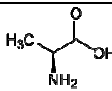
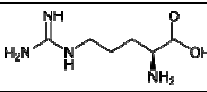
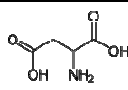
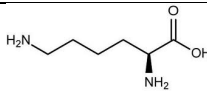
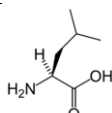
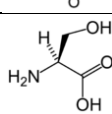
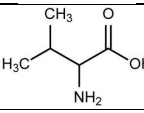
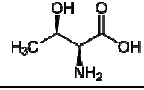
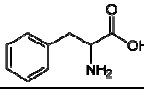
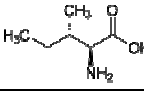
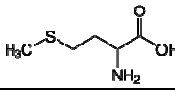
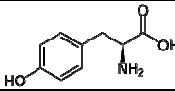
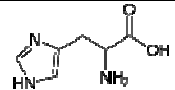
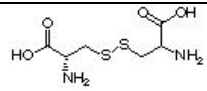
[Advameg Inc., 2012 : online]



รูปที่ 2.12 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิด A และ B

[Tabata and Ikada, 1998]

ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนในเจลาติน [Neuman, 1949] [Parrill, 1997]

Amino acid	Amount in gelatin (%)	Chemical structure	Isoelectric point	Acidity
Glycine (Gly; G)	30.50		6.06	2.34 (carboxyl) 9.6 (amino)
Proline (Pro; P)	16.30		6.30	2.00 (carboxyl) 10.60 (amino)
Glutamic acid (Glu; E)	11.70		5.79	2.10 (carboxyl) 9.47 (amino)
Alanine (Ala; A)	9.20		6.02	2.35 (carboxyl) 9.69 (amino)
Arginine (Arg; R)	8.80		5.53	2.01 (carboxyl) 9.04 (amino)
Aspartic acid (Asp; D)	6.30		5.96	2.10 (carboxyl) 9.82 (amino)
Lysine (Lys; K)	5.10		5.57	2.18 (carboxyl) 8.95 (amino)
Leucine (Leu; L)	3.20		5.98	2.36 (carboxyl) 9.60 (amino)
Serine (Ser; S)	2.90		5.68	2.21 (carboxyl) 9.15 (amino)
Valine (Val; V)	2.70		6.01	2.29 (carboxyl) 9.72 (amino)
Threonine (Thr; T)	2.20		5.60	2.09 (carboxyl) 9.10 (amino)
Phenylalanine (Phe; F)	2.10		5.91	2.58 (carboxyl) 9.24 (amino)
Isoleucine (Ile; I)	1.50		6.02	2.35 (carboxyl) 9.68 (amino)
Methionine (Met; M)	0.80		5.75	2.28 (carboxyl) 9.21 (amino)
Tyrosine (Tyr; Y)	0.69		5.66	2.20 (carboxyl) 9.11 (amino)
Histidine (His; H)	0.67		5.48	1.77 (carboxyl) 9.18 (amino)
Cystine (Cys; C)	0.09		6.15	2.05 (carboxyl) 10.25 (amino)

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบสมบัติของเจลาตินชนิด A และ B [Yasuhiko et al., 2004]

Property	Type A	Type B
pH	3.8 - 5.5	5.0 - 7.5
Isoelectric point (pI)	7.0 - 9.0	4.7 - 5.4
Gel strength (bloom)	50 - 300	50 - 300
Viscosity (mps)	15 - 75	20 - 75
Ash (%)	0.3 - 2.0	0.5 - 2.0

ปี ค.ศ. 1999 Kang และคณะ ได้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) โดยอาศัยน้ำที่ซึมซับอยู่ในไฮโดรเจลที่เป็ยกเป็นตัวทำให้เกิดรูพรุน (porogen) ภายในโครงสร้าง การผลิตไฮโดรเจลเริ่มจากการผสมกอลลูตารอลดีไฮด์ลงในสารละลายเจลาติน เพื่อใช้เป็นสารเชื่อมขวาง เมื่อเจลาตินคงรูปกลายเป็นไฮโดรเจลและผ่านการล้างกอลลูตารอลดีไฮด์ส่วนเกินออกแล้ว นำไฮโดรเจลไปแช่แข็งและทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dryer) พบว่า ลักษณะรูพรุนจะแตกต่างกันออกไปตามอุณหภูมิที่แช่แข็ง ไฮโดรเจลที่แช่ในไนโตรเจนเหลวเกิดโครงสร้างรูพรุนในลักษณะเรียงสองมิติ ในขณะที่ไฮโดรเจลที่อุณหภูมิประมาณ 203 องศาเซลเซียส เกิดโครงสร้างรูพรุนในลักษณะสามมิติและเชื่อมต่อกัน จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าลักษณะและขนาดของรูพรุนของไฮโดรเจลแห้งสามารถควบคุมได้ด้วยอุณหภูมิในการแช่แข็ง [Kang et al., 1999]

ปี ค.ศ. 2003 Lee และคณะ ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคน ( $\beta$ -glucan) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้วิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนเชื่อมต่อกัน โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 90-150 ไมโครเมตร เมื่อนำมาทดสอบเลี้ยงเซลล์ L929 ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเส้นใยหนู (mouse fibroblast) พบว่า การยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนใกล้เคียงกับการยึดเกาะของเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ (polystyrene petri dish) เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วบนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคน ที่อัตราส่วน 90:10 โดยน้ำหนัก การยึดเกาะและการ

เจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนของเจลาตินต่อเบตา-กลูแคนเพิ่มมากขึ้น ที่เวลา 48 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนอัตราส่วน 90:10 โดยน้ำหนัก มีจำนวนเซลล์ประมาณ 330,000 เซลล์ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนอัตราส่วน 50:50 โดยน้ำหนัก มีจำนวนเซลล์ประมาณ 200,000 เซลล์ [Lee et al., 2003]

ปี ค.ศ. 2004 Okamoto และคณะ ได้ทำการศึกษาการใช้ฟองน้ำเจลาติน (gelatin sponge) เป็นวัสดุควบคุมการปลดปล่อยสาร bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) เพื่อใช้ประกอบการรักษาภาวะท่อลมอ่อน (tracheomalacia) ในสุนัข พบว่า 6 เดือนหลังการผ่าตัดฝังฟองน้ำเจลาตินในบริเวณพยาธิสภาพ กลุ่มตัวอย่างที่รักษาด้วยการใช้ฟองน้ำเจลาตินควบคุมการปลดปล่อยสาร BMP-2 มีการสร้างกระดูกอ่อนใหม่ขึ้นอย่างชัดเจน และท่อลมมีความแข็งแรงมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวได้ว่า ฟองน้ำเจลาตินสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุควบคุมให้ค่อยๆ เกิดการปลดปล่อยสาร BMP-2 เพื่อช่วยรักษาภาวะท่อลมอ่อนได้ [Okamoto et al., 2004]

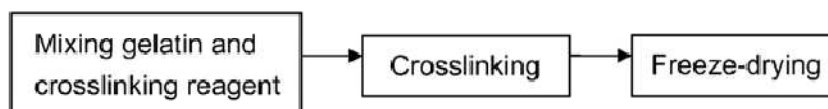
ปี ค.ศ. 2005 Sang Bong Lee และคณะ สร้างโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินโดยใช้วิธี salt-leaching โดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างขึ้นด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง วิธี salt-leaching สามารถสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีรูพรุนได้ตามที่ต้องการ งานวิจัยนี้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 350 ไมโครเมตร ความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์และอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินทดสอบการเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์สร้างเส้นใยมนุษย์ (human fibroblast) เมื่อเวลา 1 สัปดาห์ผ่านไป พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยเทคนิค salt-leaching เซลล์เกาะที่บริเวณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างด้วยเทคนิคทำให้แห้งเยือกแข็งเซลล์ส่วนใหญ่รวมตัวกันอยู่ที่บริเวณด้านบนและด้านล่างโครงเลี้ยงเซลล์ ที่เวลา 2 สัปดาห์ เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดีและมีเซลล์แผ่ซึ่งแสดงถึงความเข้ากันได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ยังไม่มีอาการย่อยสลายการทดลองภายในร่างกาย (in vivo) พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ [Sang et al., 2005]

ปี ค.ศ. 2007 Lien S.M. และคณะ ศึกษาวิธีการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde; GA) และเจนิปิน (genipin; GP) ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.13 ได้แก่ วิธีที่ 1 (mixing-crosslinking) ผสมสารเชื่อมขวางกับสารละลายเจลาตินและทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง วิธีที่ 2 (scaffold-crosslinking) นำสารละลายเจลาตินแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้สารละลายเจลาตินเป็นเจล และทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นทำการ

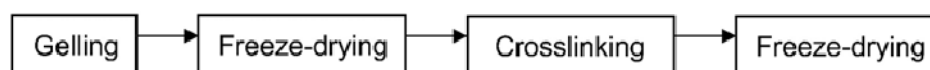


เชื่อมขวางโดยการจุ่มในสารละลายตัวเชื่อมขวางและทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง และวิธีที่ 3 (gel-crosslinking) คล้ายคลึงกับวิธีที่ 2 หลังจากที่นำสารละลายเจลาตินแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเปลี่ยนสภาพเป็นเจล จากนั้นนำเจลจุ่มในสารละลายตัวเชื่อมขวางและทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ต่อมา Huang T.G. และคณะศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีต่างๆ พบว่าโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยวิธีที่ 1 มีรูพรุนสม่ำเสมอและเชื่อมโยงกันแต่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าวิธีที่ 2 และ 3 เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ทดสอบเลี้ยงเซลล์คอนไดรไซต์ที่ได้มาจากข้อต่อของ Wistar rat และวิเคราะห์ด้วยการย้อมสี H&E พบว่าเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน หลังจากการเพาะเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย GP มีการสร้างคอลลาเจนและไกลโคซามิโนไกลแคน เมื่อผ่านไป 30 วันหลังจากเพาะเซลล์ พบว่าเซลล์มีการกระจายทั่วเนื้อเยื่อลักษณะเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อกระดูก แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยวิธีที่ 3 (gel-crosslinking) สามารถประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก [Lien et al., 2008]

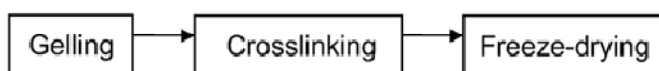
#### Method I : mixing-crosslinking



#### Method II : scaffold-crosslinking



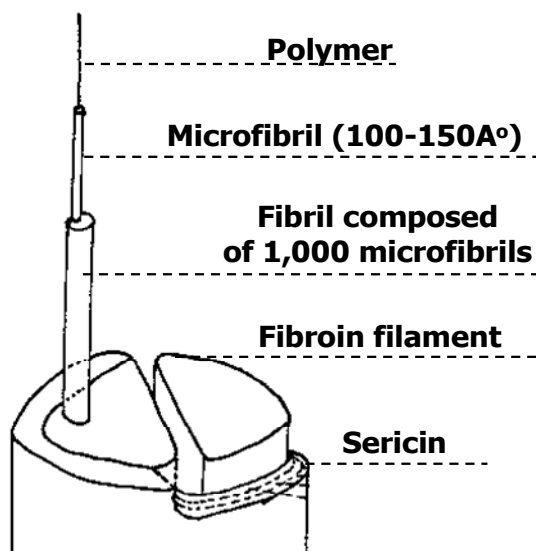
#### Method III : gel-crosslinking



รูปที่ 2.13 วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและเชื่อมขวางด้วยวิธีต่างๆ [Lien et al., 2008]

## 2.6.2 ไฟโบรอินไหมไทย (Thai Silk Fibroin)

ไหมไทย จัดอยู่ในไหมเลี้ยงสายพันธุ์ *Bombyx mori* แต่ไหมไทยแตกต่างจากไหม *Bombyx mori* อื่นๆ คือ รังไหมไทยจะมีสีเหลือง และมีกาวไหม (sericin) มากกว่าไหมชนิดอื่น เส้นใยของไหมมีลักษณะเป็นเส้นใยพอลิเมอร์ของโปรตีน ประกอบไปด้วยโปรตีนสองประเภทคือ ไฟโบรอิน (fibroin) และเซรีซินหรือกาวไหม (sericin) โดยไฟโบรอินจะเป็นแกนของเส้นใยไหม และเซรีซินจะอยู่โดยรอบหุ้มไฟโบรอินไว้ เส้นใยไหมตามโดยธรรมชาตินั้น มีคุณสมบัติในด้านแรงดึงได้สูง (high tensile strength) มีความเหนียวและยืดหยุ่นสูง (อาจสูงได้ถึง 35%) และสามารถคงรูปได้ในอุณหภูมิสูงถึง 250 องศาเซลเซียส โครงสร้างของเส้นใยไหมแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของเส้นใยไหม

[FAO, 2012 : online]

ไฟโบรอินจากไหมนั้นถูกนำมาใช้เป็นชีววัสดุในการทำโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในหลากหลายรูปแบบ ทั้งในรูปแบบแผ่นเจล เส้นใยนาโน และโครงสร้างพรุนคล้ายฟองน้ำ เนื่องด้วยคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นสูง ในขณะที่ก็ยังคงมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกายเป็นอย่างดี นอกจากนี้ความเปราะบางที่ควบคุมได้ของไฟโบรอิน ตลอดจนสามารถปรับเปลี่ยนอัตราและความยาวนานในการปลดปล่อย

สารชีวโมเลกุล ส่งผลให้ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ที่จะนำมาใช้ใน งานควบคุมการปลดปล่อยสาร (controlled release) และประยุกต์ใช้กับการนำส่งยา (drug delivery) ในหลากหลายรูปแบบโครงสร้าง ทั้งเป็นแผ่นฟิล์ม เป็นทรงกลมขนาดไมโคร (microsphere) เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) และเป็นโครงสร้างหลายชั้นทับซ้อน (multilayers) [Biman et al., 2009]

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ (รูปที่ 2.15 A) เริ่มด้วยการนำรังไหมมาต้มใน สารละลายต่าง เช่น สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) เพื่อให้เซรีซินหลุดออก หลังจากนั้นล้างด้วยความปราศไออน เส้นใยไฟโบรอินที่ได้เมื่อตากให้แห้งแล้ว นำมาละลายใน สารละลายลิเทียมโบรไมด์ (9M LiBr solution) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลส์ (dialyze) ในน้ำปราศจากไออน (MWCO 3500, Pierce, France) เป็นเวลา 3 วัน สุดท้ายจะได้สารละลายไฟโบรอินใหม่ [Kim et al., 2005] สารละลายไฟโบรอินใหม่ที่ได้นั้น สามารถนำมาขึ้นรูปได้หลากหลายแบบ (รูปที่ 2.15 B) เช่น ฟิล์ม (film) เจล (gel) แผ่นเส้นใยที่ไม่สานกัน (non woven mats) หรือทำเป็นโครงสร้างที่มีรูพรุนคล้าย ฟองน้ำ (sponge) ด้วย porogens หรือ การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) [Vepari and Kaplan, 2007]

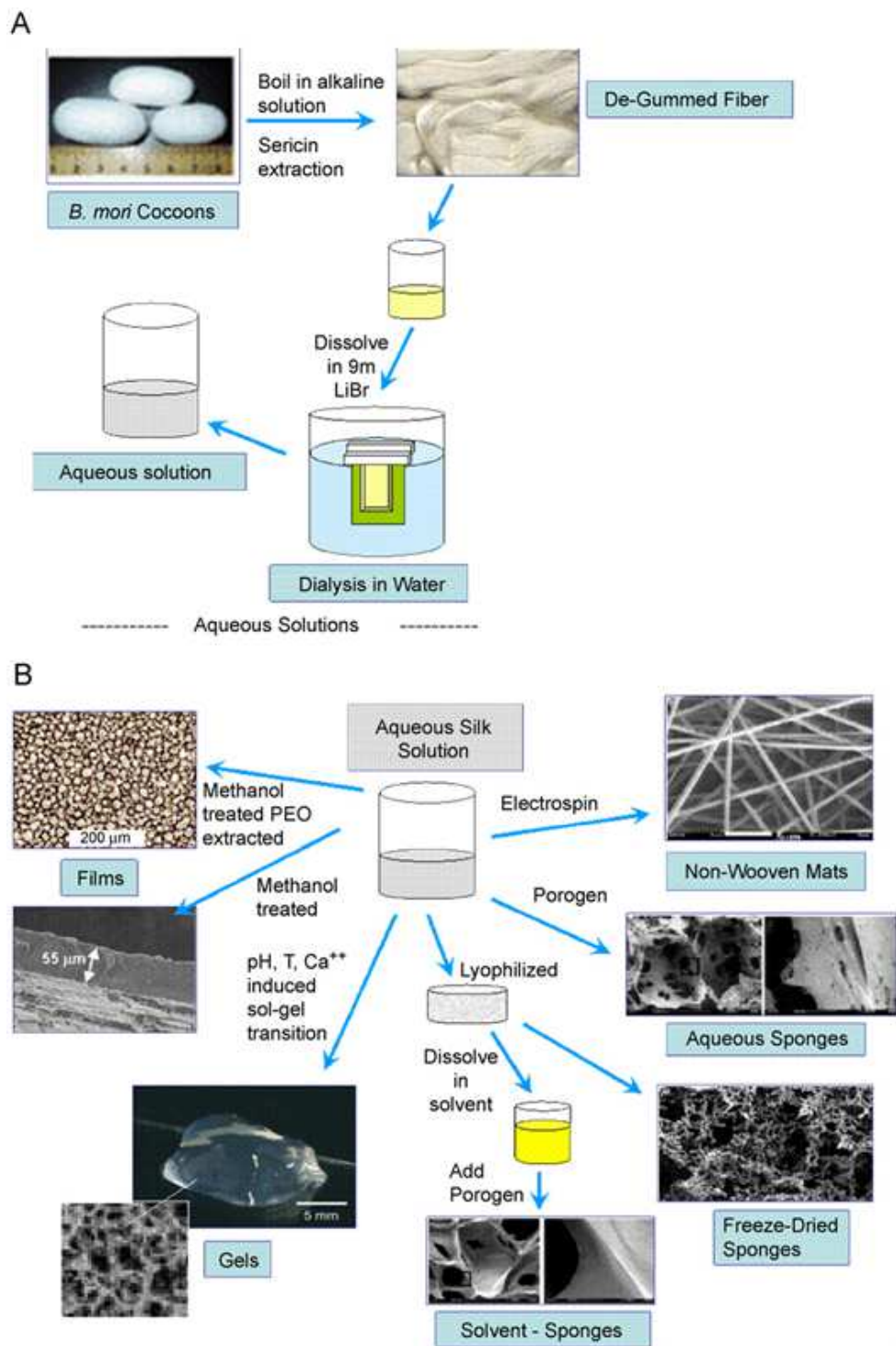
ปี ค.ศ. 2007 Eun และคณะ ได้ทำการศึกษาผลจากการผลิตแผ่นเยื่อโปรตีน (protein membranes) โดยใช้สารละลายที่ผสมไฟโบรอินใหม่และเจลาตินเข้าด้วยกัน แล้วใช้เมทานอล เหนียวน้ำให้ไฟโบรอินใหม่เกิดปฏิกิริยาเป็นผลึก (crystallization) เมื่อศึกษาด้วย Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy แล้วนั้น พบว่าปฏิกิริยาการเป็นผลึกของสารละลายไฟโบรอินใหม่ที่ผสมกับเจลาตินแล้วนั้น ไม่แตกต่างกับปฏิกิริยาการเป็นผลึกของสารละลายไฟโบรอินใหม่ที่ไม่ได้ผสม ทำให้ทราบว่าคุณสมบัติของไฟโบรอินใหม่นั้น ไม่เปลี่ยนแปลงไปแม้ว่าจะผสมกับเจลาตินแล้วก็ตาม [Eun et al., 2007]

ปี ค.ศ. 2009 Biman และคณะ ได้ทำการทดลองผลิตแผ่นฟิล์มหลายชั้น (multilayer films) สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยยา (controlled drug release) โดยใช้วัสดุหลักคือ สารละลายไฟโบรอินใหม่ และสารละลายเจลาติน คณะผู้วิจัยค่อยๆ ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มชั้นต่อชั้น และทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคที่ศึกษาเกี่ยวกับอันตรกิริยาของแสง (spectroscopy) และส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) เพื่อคุณลักษณะทางกายภาพที่บ่งบอกลักษณะการเรียงของเนื้อฟิล์มเป็นชั้นๆ หลังจากนั้นฟิล์มจะถูกทำให้แห้งด้วยเมทานอล และทำการทดสอบการปลดปล่อยสารในห้องปฏิบัติการโดยใช้สารที่มี

น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน คือ Trypan blue (961 Da), FITC-inulin (3.9 kDa) และ FITC-BSA (66 kDa) จากการทดสอบนี้พบว่าแผ่นฟิล์มนี้มีคุณสมบัติช่วยในการควบคุมปลดปล่อยสารให้หลังสารต่อเนื่องได้เป็นระยะเวลานานขึ้น (sustained release) การใช้ไฟโบรอินไหมและเจลาตินร่วมกันจึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาใช้เป็นวัสดุสำหรับงานที่ต้องการควบคุมอัตราการปลดปล่อยสาร [Biman et al., 2009]

ปี ค.ศ. 2009 Vachiraroj และคณะ ได้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมจากไฟโบรอินไหมเจลาติน ไคโตซาน และไฮดรอกซีอะพาไทต์ เพื่อทดสอบการเข้ากันได้ทางชีวภาพภายนอกร่างกาย และการเหนี่ยวนำเซลล์ไลน์กระดูกหนู (MC3T3-E1) และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนู (mouse MSCs) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมให้ผลอย่างเด่นชัดในการส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ [Vachiraroj et al., 2009]

ปี ค.ศ. 2010 Okhawilai และคณะ ได้ศึกษาการใช้แผ่นเส้นใยจากการปั่นไฟฟ้าสถิตเพื่องานควบคุมการปลดปล่อยสาร เส้นใยผลิตจากสารละลายไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินชนิด B ในอัตราส่วน 10/90, 20/80, 30/70, 40/60 และ 50/50 พบว่าแผ่นเส้นใยที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินในอัตราส่วน 10/90 นั้น ย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสารละลายคอลลาจีเนสเนื่องจากคอลลาจีเนสทำการย่อยสลายเจลาตินโดยตรง ผลการทดสอบระบบควบคุมการปลดปล่อยสารภายนอกร่างกาย ซึ่งทดสอบกับสาร 2 ชนิด คือ  $\alpha$ Zo-casein และ methylene blue พบว่า methylene ถูกดูดซับไว้กับแผ่นเส้นใยเป็นอย่างดี เนื่องจากความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่าง methylene ที่มีประจุเป็นบวก และแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินชนิด B ที่มีประจุเป็นลบ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้กล่าวได้ว่าคุณสมบัติทางประจุไฟฟ้าของแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินสามารถนำมาใช้ในการสร้างระบบควบคุมการปลดปล่อยสารได้ [Okhawilai et al., 2010]



รูปที่ 2.15 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหม (A) และวิธีขึ้นรูปสารละลายไฟโบรอินไหมแบบต่างๆ (B) [Vepari and Kaplan, 2007]

## บทที่ 3

### วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุและสารเคมี

1. L-Ascorbic (Sigma Co., St. Louis, USA)
2. Bombyx mori cocoon (พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ, จังหวัดนครราชสีมา)
3. Collagenase from clostridium histolyticum (2.69 units/ml, Fluka, USA)
4. Dexamethasone (Sigma Co., St. Louis, USA)
5. Diethylether (K36335621 631, AnalaR, VWR International Ltd., England)
6. Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Germany)
7. Ethanol, absolute (VWR international, UK)
8. Ethanol, 70% (RCM, Thailand)
9. Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone MA, USA)
10. Gelatin type A (pl 9, Niita gelatin, Japan)
11. Glutaraldehyde solution (Fluka, Buchs, Germany)
12.  $\beta$ -glycerophosphate (Fluka, Germany) L-glutamine (Hyclone, USA)
13. Litiumbromide (LiBr) (Sigma-Ildrich Laborchemikeliien, Germany)
14. Modified eagle medium (MEM) (Hyclone, MA, USA)
15. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (USB corporation, Cleveland, OH, USA)
16. p-Nitrophenol standard solution (Sigma Co., St. Louis, USA)
17. p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (Sigma Co., St. Louis, USA)
18. Penicillin-Streptomycin solution (10,000 units/ml, Hyclone)
19. Phosphate buffer saline without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (1X PBS(-)) (Hyclone, MA, USA)
20. SDS lysis buffer (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
21. Sodium hydrogen carbonate (Fluka, Buchs, Germany)

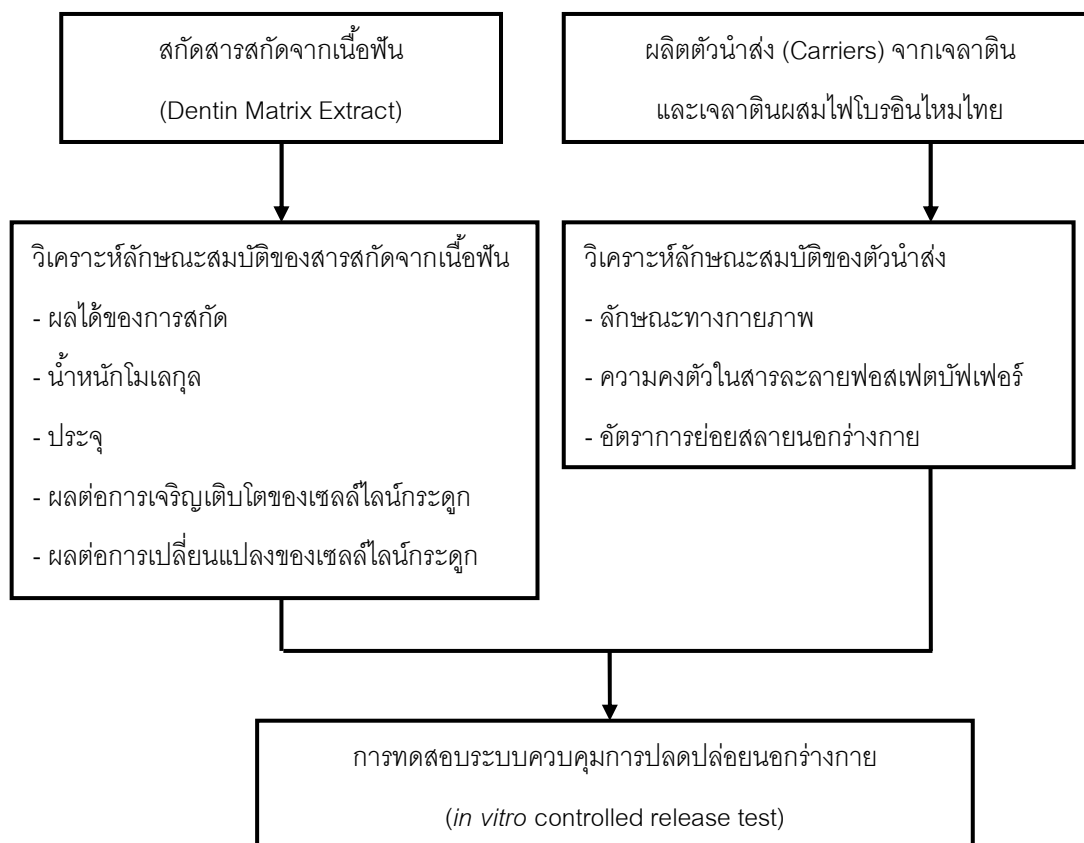
22. Sodium hydroxide (Fluka, Buchs, Germany)
23. Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Ajax Finechem, Pty'Ltd, Australia)
24. Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin in sodium-EDTA) (Hyclone, MA, USA)

### 3.2 อุปกรณ์

1. Absorbance microplate reader (ELx800, BioTek, USA)
2. Autopipettes (10-100  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$  and 1000-5000  $\mu\text{l}$  with tips) (Eppendorf)
3. Centrifugal tubes, sterilized (15 ml, 50 ml) (Corning, USA)
4. Centrifuge (Kubota corporation 6500, Japan)
5.  $\text{CO}_2$  incubator (Series II 3110 Water Jacketed Incubator, Thermo Forma, USA)
6. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) (JSM-5800LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
7. Ethylene oxide (Steri-vac<sup>TM</sup> gas sterilizer, 3M, USA)
8. Filter system, sterilized (0.2  $\mu\text{m}$ ) (Corning, USA)
9. Fine coat (JFC-1100E, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
10. Fluorescent microplate reader (F-2000, HITACHI, Japan)
11. Freezer,  $-80^\circ\text{C}$  (Heto, powerdry LL3000, USA)
12. Hemacytometer (Counting chamber, Boeco, Germany)
13. Homogenizer (EW-04739-01, IKA, USA)
14. Laminar Flow Hood (HWS Series 254473, Australia)
15. Low speed cutting machine (ISOMET1000, BUEHLER, Germany)
16. Lyophilizer (Heto, powerdry LL3000, USA)
17. Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
18. Orbital shaker (Innova 2000, New Brunswick, USA)
19. Paraffin film (Bemis, USA)
20. Phase-contrast microscope (IX70, Olympus Optical Co., Japan)
21. Polystyrene tissue culture discs (6 cm, 10 cm) (Corning, USA)
22. Polystyrene tissue culture plates (24-well, 48-well) (Corning, USA)
23. Scanning Electron Microscopy (JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)

24. Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV scanning)
25. Tissue culture flask, sterilized (T75) (Cellstar 658-175)
26. Universal Testing Machine (No. 5567, Instron, USA)
27. UV-Vis spectrophotometer (UV-2540, Shimadzu, Japan)
28. Vacuum drying oven and pump (VD23, Binder, Germany)
29. Vials, sterilized (1.5 ml) (Corning, USA)
30. Zetasizer (Nano ZS, Malvern, United Kingdom)

### 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

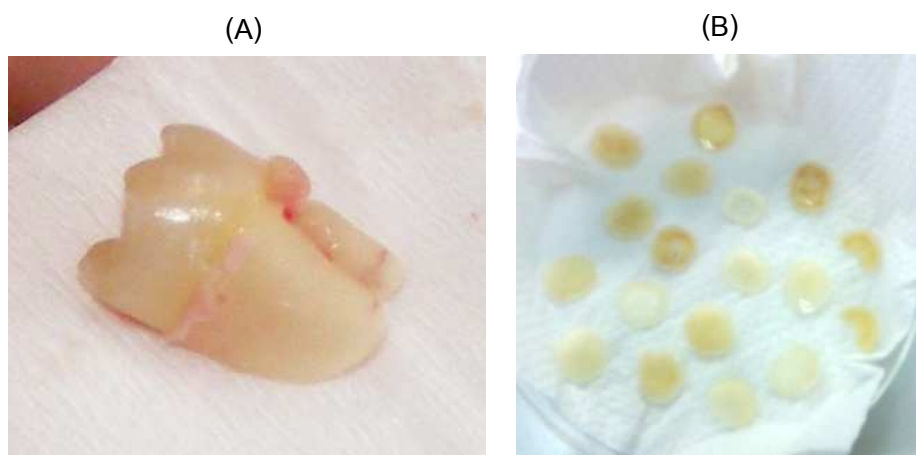


รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย



### 3.3.1 สกัดและศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดจากเนื้อฟัน (Dentin Matrix Extract)

สารสกัดจากเนื้อฟัน (Dentin Matrix Extract; DME) สกัดจากฟันของมนุษย์ ที่ถูกถอนมาจากผู้ป่วยนอกของคลินิกคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื่องจากปัญหาความสวยงามของฟัน โดยได้รับการยินยอมจากผู้บริจาคแล้ว ฟันที่ถอนแล้วถูกนำไปล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline; PBS) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นตัดตามขวางเป็นแผ่นๆ (ความหนาของแต่ละแผ่นประมาณ 800 ไมโครเมตร) (รูปที่ 3.2) ด้วยเครื่อง Low speed cutting machine (รูปที่ 3.3) และทำให้แห้งและแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นบดให้เป็นผงแล้วนำไปแช่ใน 0.5 M EDTA ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยกวนสารด้วย แท่งแม่เหล็ก ตลอดเป็นเวลาสามสัปดาห์ (รูปที่ 3.4) นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนบนไปไดอะไลส์ (dialyze) โดยใช้แผ่นเยื่อ Spectra/Por<sup>®</sup> (MWCO 12-14,000) ด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำไปทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) ได้ DME ในลักษณะเป็นผง สีขาวขุ่น (รูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างฟันมนุษย์ โดย (A) คือฟันที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วย PBS แล้ว (B) คือฟันที่ผ่านการตัดตามขวางเป็นแผ่นด้วยเครื่อง Low speed cutting machine



รูปที่ 3.3 เครื่อง Low speed cutting machine รุ่น ISOMET1000 ยี่ห้อ BUEHLER (Germany)

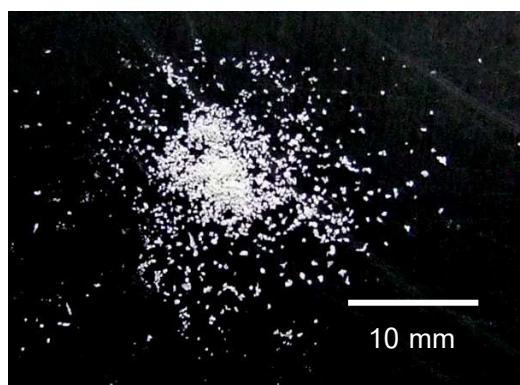


รูปที่ 3.4 ฟันที่ถูกบดจนกลายเป็นผงฟัน ถูกนำมาแช่ใน 0.5 M EDTA ที่ 4 องศาเซลเซียส และ กวนสารด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออกไป

ศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดจากเนื้อฟัน ได้แก่

### 3.3.1.1 ผลได้ของการสกัด (Yield)

ค่าผลได้ของการสกัดได้มาจากการเปรียบเทียบร้อยละอัตราส่วนระหว่าง น้ำหนักแห้งของ ผงฟันที่ได้จากการตัดเป็นชิ้นแล้วนำไปตำให้เป็นผง ต่อ น้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งแล้ว



รูปที่ 3.5 ผง DME ที่ได้หลังผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

### 3.3.1.2 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight)

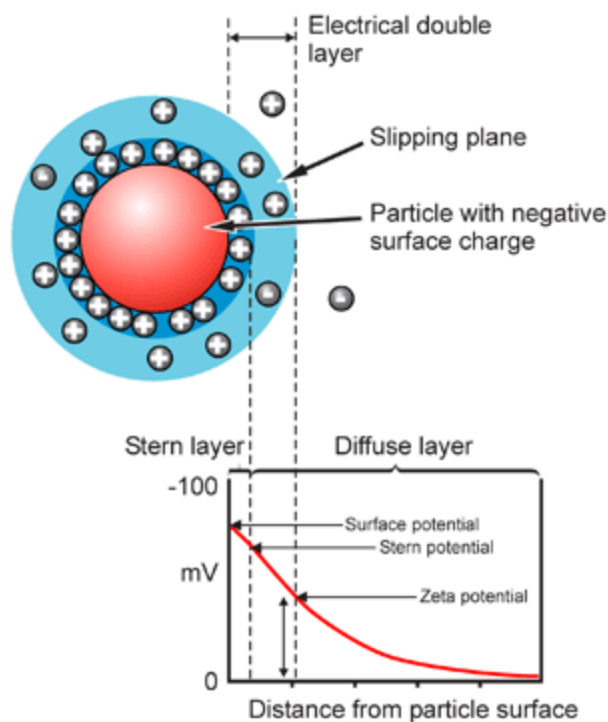
การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) คือ เทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุล โดยอาศัยการใช้สนามไฟฟ้าเหนี่ยวนำให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเจลโพลีอะคริลาไมด์ โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางน้อยกว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่เนื่องจากค่าความเป็นประจุของโปรตีนแต่ละชนิดไม่เท่ากัน จึงต้องอาศัยการใช้สารลดแรงตึงผิว ที่มีประจุลบ (anionic detergent) คือ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) เข้าจับกับสายโซ่พอลิเปปไทด์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น SDS-polypeptide complex ประจุของ SDS จะบดบังประจุของโปรตีน ทำให้ค่าประจุของ SDS-polypeptide complex นี้จะเป็นลบไม่ว่าจะเป็นโปรตีนชนิดใดก็ตาม ก็จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือเข้าหาขั้วประจุบวก และมีอัตราส่วนของประจุต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุที่เท่ากันด้วย จึงสามารถนำไปเข้าสู่กระบวนการ Polyacrylamide Gel Electrophoresis ได้ เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของพอลิเปปไทด์ ตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของพอลิเปปไทด์ ตัวอย่างได้

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว สามารถใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนที่น้อยระดับไมโครกรัมได้ สารผสมโปรตีนที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลนั้น ต้องถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติก่อน โดยการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้สารไธออล (thiol reagent) สลายพันธะไดซัลไฟด์ สารไธออลที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ไดไธไธอริทอล (dithiothreitol; DTT) ผลของการแยกโปรตีน สามารถมองเห็นแถบพอลิเปปไทด์เมื่อนำเจลไปย้อมสีด้วย Coomassie blue (วิธีการโดยละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

### 3.3.1.3 ประจุ (Electric charge)

การวัดประจุโดยตรงได้นั้นทำได้ไม่ถนัดนัก จึงใช้การวัดศักย์ซีต้า (Zeta potential) แทน ศักย์ซีต้าหมายถึงแรงดันไฟฟ้าที่แตกต่างกันระหว่างผิวหน้าของอนุภาคกับของเหลวที่อนุภาคนั้นแขวนลอยอยู่ ถ้าอนุภาคมีค่าศักย์ซีต้าที่สูง (ไม่ว่าจะเป็นบวกหรือลบ) เมื่ออนุภาคเคลื่อนที่เข้าใกล้กัน อนุภาคเหล่านั้นจะผลักกัน ทำให้เกิดความเสถียรทางด้านการกระจายลอยตัว ในทางตรงข้ามถ้าอนุภาคนั้นมีค่าศักย์ซีต้าที่ต่ำ อนุภาคจะเข้ามาเกาะรวมตัวกันได้ง่าย ทำให้เกิดความไม่เสถียรของระบบขึ้น อนุภาคส่วนใหญ่เมื่อกระจายตัวอยู่ในของเหลวที่มีขั้ว เช่น น้ำ จะเกิดการแตกตัวให้ประจุที่พื้นผิวของอนุภาค ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับประจุตรงข้าม (counter ion) ในตัวกลางหรือของเหลวที่อนุภาคกระจายอยู่ ปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิดการดูดซับประจุตรงข้ามที่พื้นผิวของอนุภาคเพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้เกิดสภาพที่เรียกว่า electrical double layer โดยชั้นในที่มีประจุอยู่อย่างหนาแน่นจะเรียกว่า slipping plane จะประพุดิตัวเสมือนเป็นหนึ่งในอนุภาค สมบัติตรงตำแหน่งนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากสามารถอธิบายพฤติกรรมของอนุภาคได้ดีกว่าประจุที่ผิวของอนุภาค ซึ่งค่าที่วัดได้ ณ ตำแหน่งนี้ก็คือ ค่าศักย์ซีต้า [รุสนีกุลวิจิตร, 2551 : ออนไลน์] ดังแสดงในรูปที่ 3.6

การวัดค่าศักย์ซีต้า ทำได้โดยการนำสารสกัดจากเนื้อพืชมามาผสมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์หรือ PBS (พีเอช 7.5) ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผสมในน้ำปราศจากไอออน (พีเอช 5.5) ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน หลังจากนั้นตัวอย่างนำสารละลายทั้งสองตัวอย่าง ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง จัดส่งไปตรวจวัดด้วยเครื่อง Zetasizer รุ่น Nano ZS ยี่ห้อ Malvern (United Kingdom) ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (Nanotec) อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี



รูปที่ 3.6 ตำแหน่งในการวัดค่าศักย์ซีต้า [Malvern Instruments Ltd., 2012 : online]

#### 3.3.1.4 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1

โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

- ก. การศึกษาผลของ DME ต่อการเจริญเติบโตของ MC3T3-E1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรัมน้อยกว่าปกติ (2%)

โดยปกติแล้วอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 คืออาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Modified eagle medium หรือ MEM (Hyclone, MA, USA) ผสมซีรัม Fetal Bovine Serum (FBS) ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อดูผลของ DME ว่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของ MC3T3-E1 ในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 2 ซึ่งน้อยกว่าปกติ โดย DME สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตทดแทนการขาดหายไปของซีรัมได้หรือไม่ โดยประเมินอัตราการ

เจริญเติบโตของ MC3T3-E1 ในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 2 ในสภาวะมีและไม่มี DME ผสมอยู่

สารสกัดจากเนื้อฟันถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ชนิดผสมซีรัม 2% โดยปริมาตร (MEM with 2% FBS) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อฟัน เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) เพราะเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 95 และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

ข. การศึกษาผลของ DME ต่อการเจริญเติบโตของ MC3T3-E1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรัมอัตราปกติ (10%)

สารสกัดจากเนื้อฟันถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ชนิดผสมซีรัม 10% โดยปริมาตร (MEM with 10% FBS) ในอัตราส่วน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อฟัน เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) เพราะเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 95 และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ วัดจำนวนเซลล์โดยวิธี MTT assay และคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate;  $\mu$ ) ของเซลล์ และเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนจากเดิมเป็น 2 เท่า (population doubling time; PDT) ด้วยสมการดังต่อไปนี้ [Roth, 2006]

$$\mu = \frac{1}{x_0} \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (1)$$

[hr<sup>-1</sup>]

$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots\dots (2)$$

[hr]

เมื่อ  $x_0$  คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้นในช่วง *log phase*

$\frac{dx}{dt}$  คือ จำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลา ในช่วง *log phase*

ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค

### 3.3.1.5 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1

โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

#### ก. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ DME กับ Dexamethasone ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกนั้น ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารที่ช่วยชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูก สารเหล่านั้นได้แก่  $\beta$ -glycerophosphate, L-Ascorbic acid และ Dexamethasone (Dex) โดยเรียกอาหารเลี้ยงเซลล์ประเภทนี้ว่า Osteogenic medium แต่จากการศึกษารายงานวิจัยบางฉบับ พบว่า Dex ไม่มีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงให้เซลล์ MC3T3-E1 เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก แค่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม  $\beta$ -glycerophosphate และ L-Ascorbic acid ก็เพียงพอแล้ว [Lian et al., 1997] การทดลองนี้จึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสม Dex (MEM ผสม 10%FBS + 10mM  $\beta$ -glycerophosphate + 50 $\mu$ g/ml L-ascorbic acid ; ใช้ตัวย่อว่า OM) เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุม โดยสารสกัดจากเนื้อฟัน (DME) ถูกเติมลงไป ใน OM ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเปรียบเทียบกับผลของการผสม  $10^{-7}$  M Dex ใน OM โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อฟัน เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) แบ่งกลุ่มการทดลองได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่ม 1 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM (กลุ่มควบคุม)

กลุ่ม 2 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + Dex

กลุ่ม 3 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่ม 4 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + Dex+ DME 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เพาะเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน  $8 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม คิดเป็นความหนาแน่นประมาณ  $4.21 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งเหมาะสมต่อการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 ไปเป็นเซลล์กระดูก [Wang et al., 2008] ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในสภาวะที่มี  $\text{CO}_2$  ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 95 และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลที่ระยะเวลา 5 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์ผลของกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase; ALP) ที่เกิดขึ้นหลังจากนั้นที่ระยะเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลการสังเคราะห์แคลเซียมด้วยการย้อมสี Alizarin Red-s [Carson, 1990]

ข. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ DME ในอัตราส่วนต่างๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

สารสกัดจากเนื้อฟัน (DME) ถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ผสมพิเศษ (MEM ผสม 10% FBS + 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate + 50 $\mu$ g/ml L-ascorbic acid; ใช้ตัวย่อว่า OM) ในอัตราส่วน 25, 50, 100, และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ OM ที่ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อฟัน และเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (10% FBS-MEM; ใช้ตัวย่อว่า Growth M) เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) ดังจะแบ่งได้แบ่ง 6 กลุ่มตัวอย่างดังนี้

กลุ่ม 1 : เซลล์เลี้ยงด้วย Growth M อย่างเดียว

กลุ่ม 2 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM อย่างเดียว

กลุ่ม 3 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 25  $\mu$ g/ml

กลุ่ม 4 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 50  $\mu$ g/ml

กลุ่ม 5 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 100  $\mu$ g/ml

กลุ่ม 6 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 500  $\mu$ g/ml



เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยความหนาแน่นและสภาวะเดียวกับการทดลองที่ 3.3.1.5.ก โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลที่ระยะเวลา 10 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 3 วัน วิเคราะห์ผลของกิจกรรมเอนไซม์ ALP

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ALP ในเซลล์กระดูก ทำโดยการให้ทำให้เซลล์แตกในสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกของเหลวที่อยู่ภายในจึงถูกปล่อยออกมา ได้เป็น cell lysate ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ ALP ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสาร p-Nitrophenyl phosphate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากการทดลองสามารถได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร [Bomers and McComb, 1975] ดังรายละเอียดในภาคผนวก ง

การสังเคราะห์แคลเซียมประเมินได้โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย Alizarin Red-s ปริมาณ 0.5 -1.0 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 2 นาที แล้วเขย่าเพื่อให้สารละลายที่มากเกินไปหลุดออก หลังจากนั้นทำให้แห้งด้วยการล้างด้วยในอะซิโตน (acetone) 20 ครั้ง และล้างด้วยสารละลายอะซิโตนผสมไซลีน (xylene) เป็นจำนวน 20 ครั้ง โดยแคลเซียมจะย้อมติดสีส้ม-แดง [Carson, 1990] [IHC World Team, 2003 : Online]

### 3.3.2 ผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติตัวนำส่งเจลาตินและเจลาตินผสมไฟโบรอิน ใหม่ไทย

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทย อ้างอิงจากวิธีการของ Kim และคณะ (2005) โดยการนำรังใหม่ไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่แยกเอาปุ๋ยใหม่ออกมาต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เซรีซินหลุดออก หลังจากนั้นล้างด้วยความปราศไออนจนเซรีซินหลุดออกหมดจึงนำไปตากให้แห้ง เส้นใยไฟโบรอินที่ได้เมื่อตากให้แห้งแล้ว นำมาละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซิส (dialyze) ผ่านเยื่อ

กรอง (MWCO 3500, Pierce, France) ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้สารละลายไฟโบรอินใหม่ไทย ความเข้มข้นร้อยละ 5.5 – 6.5 โดยน้ำหนัก

การเตรียมสารละลายเจลาตินชนิด A ทำโดยการนำเจลาตินชนิด A (pl 9, Nitta, Japan) แช่ในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้เจลาตินบวมตัวอย่างเต็มที่ก่อนการผสม ที่อุณหภูมิห้อง ในอัตราส่วนความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก แล้วจึงปั่นกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นผสมสารละลายเจลาตินชนิด A ผสมกับสารละลายไฟโบรอินใหม่ ในอัตราส่วนเจลาตินต่อไฟโบรอินใหม่ เป็น 100:0, 70:30, 50:50 ตามลำดับ ได้สารละลายความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เติมสารเชื่อมขวาง คือ กลูตาโรลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เติมสารละลายที่ได้ลงในภาชนะสำหรับขึ้นรูป แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเชื่อมขวางของเจลาติน หลังจากนั้นนำไปล้างกลูตาโรลดีไฮด์ส่วนเกินด้วยการแช่ในสารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส อีกอย่างน้อย 12 ชั่วโมง จึงนำมาเข้าสู่การทำแห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อแห้งแล้วจึงตัดตัวนำส่งให้มีลักษณะเป็นทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 11 มิลลิเมตร สูง 1 มิลลิเมตร ตัวนำส่งถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วยกระบวนการพลาสมา (กำลังไฟฟ้า 1000 วัตต์ ความดัน 10 ปาสคาล ใช้ก๊าซ Ar, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, และ O<sub>2</sub>) ที่หน่วยจ่ายกลาง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และเก็บให้ปราศจากความชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาลักษณะสมบัติต่อไป

### 3.3.2.1 ลักษณะทางกายภาพ

การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของตัวนำส่งทำภายใต้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM-JSM-5420LV JEOL Ltd., Japan) โดยนำตัวนำส่งมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำชิ้นส่วนตัวนำส่งที่ตัดแล้วไปเคลือบด้วยทองคำก่อนทำการถ่ายภาพที่กำลังขยายต่างๆ

การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ น้ำหนัก (weight) ความหนาแน่น (density) และการดูดซับน้ำ (water swelling) ของตัวนำส่งแบบต่างๆ หาค่าอัตราการดูดซับน้ำโดยวิธีชั่งน้ำหนักของตัวนำส่ง ก่อนและหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) จนอิ่มตัว เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ คำนวณการดูดซับน้ำดังสมการที่ (3)

$$\text{การดูดซับน้ำ (\%โดยน้ำหนัก)} = (W_w - W_d) / W_w \times 100 \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$\text{เมื่อ } W_w = \text{น้ำหนักเปียก} \quad W_d = \text{น้ำหนักแห้ง}$$

### 3.3.2.2 ความคงตัวของตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เจลาตินเป็นชีววัสดุที่มีความสามารถละลายในน้ำได้ดี จึงจำเป็นต้องมีการเชื่อมขวาง ด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ เพื่อให้ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินย่อยสลายและละลายได้ยากขึ้น จึงทำการทดสอบว่า ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางแล้วนั้น มีความคงตัวเมื่อถูกแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อย่างไร โดยวิธีชั่งน้ำหนักของตัวนำส่งก่อนและหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 5 วัน และประเมินความคงตัวจากน้ำหนักที่หายไป ตามสมการ (4)

$$\text{ร้อยละน้ำหนักที่หายไป (\%โดยน้ำหนัก)} = (W_t - W_d) / W_t \times 100 \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$\text{เมื่อ } W_t = \text{น้ำหนักของตัวนำส่งหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ณ เวลานั้นๆ}$$

$$W_d = \text{น้ำหนักของตัวนำส่งแห้งก่อนแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์}$$

### 3.3.2.3 การย่อยสลายของตัวนำส่งภายนอกร่างกาย (*in vitro* degradation)

ตัวนำส่งทุกชนิดน้ำหนักเฉลี่ย  $6.25 \pm 0.69$  มิลลิกรัม ถูกแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ 1 (Collagenase type I) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร (8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 วัน

ตัวอย่างชิ้นงานถูกนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง แล้วชั่งน้ำหนักของตัวนำส่งที่คงเหลือที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

### 3.3.3 การทดสอบระบบควบคุมการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย (*in vitro* controlled release)

DME (ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4) ถูกนำมาดูดซับลงบนตัวนำส่ง โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Hori K. และคณะ (2007) และ Pastel Z. และคณะ (2008) กล่าวคือ ใช้อัตราส่วนสารละลาย DME ปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตร ต่อน้ำหนักแห้งของตัวนำส่ง 2 มิลลิกรัม [Hori et al., 2007] [Pastel et al., 2008] หลังจากนั้นนำตัวนำส่งที่ดูดซับ DME แล้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 20 ชั่วโมง เพื่อให้ DME ถูกดูดซับเต็มที่และตัวนำส่งแห้งสนิท

#### 3.3.3.1 อัตราการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย

ตัวนำส่งที่ดูดซับ DME ไว้ ถูกนำมาแช่ลงสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อตัวนำส่ง 1 ชิ้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดูดเก็บสารละลาย 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใหม่ในปริมาณที่เท่ากัน ที่เวลา 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายด้วยวิธี bicinchoninic acid (BCA) assay ดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก จ โดยสารละลายที่ผ่านการแช่ตัวนำส่งเปล่าแต่ละชนิดเป็นกลุ่มควบคุม

#### 3.3.3.2 ผลของระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E

โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

- ก. ผลของระยะเวลาในการใช้ DME ต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MC3T3-E1

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการใช้ DME ต่อเซลล์ MC3T3-E1 โดยการเปรียบเทียบปฏิกิริยาของเซลล์ MC3T3-E1 ต่อการคงสถานะความเข้มข้นของ DME ตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน และการใช้ DME เพียง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ว่าการใช้ DME แบบใดจะส่งผลส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 ไปเป็นกระดูกได้ดีกว่ากัน DME โดยเพาะเลี้ยงในสภาพเลี้ยงเซลล์โดยไม่ใช้ตัวนำส่ง ด้วยความหนาแน่นและสถานะเดียวกับการทดลองที่ 3.3.1.5 ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบ OM (MEM + 10% FBS + 10mM  $\beta$ -glycerophosphate + 50 $\mu$ g/ml L-ascorbic acid) 1 มิลลิลิตรต่อหลุม มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 3 วัน โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่ม 1 : ไม่เติม DME ใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control)
- กลุ่ม 2 : เติม DME 50 ไมโครกรัม ทุก 3 วัน (DME 50)
- กลุ่ม 3 : เติม DME 100 ไมโครกรัม ทุก 3 วัน (DME 100)
- กลุ่ม 4 : เติม DME 100 ไมโครกรัมครั้งเดียว (DME 100x1)

ข. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ DME ในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนตัวนำส่งต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MC3T3-E1

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ DME ต่อเซลล์ MC3T3-E1 ที่เพาะเลี้ยงบนตัวนำส่ง ในสภาวะดังที่กล่าวมาแล้ว โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่ม 1 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 100:0 ที่ไม่มี DME (G:SF 100:0)
- กลุ่ม 2 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 100:0 ที่มี DME 100 ไมโครกรัม (G:SF 100:0 + DME)
- กลุ่ม 3 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 70:30 ที่ไม่มี DME (G:SF 70:30)
- กลุ่ม 4 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 70:30 ที่มี DME 100 ไมโครกรัม (G:SF 70:30 + DME)
- กลุ่ม 5 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 50:50 ที่ไม่มี DME (G:SF 50:50 + DME)
- กลุ่ม 6 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 50:50 ที่มี DME 100 ไมโครกรัม (G:SF 50:50 + DME)

การทดลองทั้งสอง มีการเก็บตัวอย่างเซลล์ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (gene expression) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription

Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) แสดงรายละเอียดใน ภาคผนวก จ โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เจาะจงกับ Alkaline Phosphatase (ALP), Collagen-1 (Col-1), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OC) และ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ดังในตารางที่ 3.1 หลังจากนั้น DNA ที่ได้จากการกระบวนการ RT-PCR คัดแยกด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งใน Agarose gel มีส่วนผสม ของ Ethidium bromide dye ที่มีความสามารถในการจับกับ DNA และทำให้สามารถมองเห็นภายใต้แสง UV ได้ [White, 1997] เมื่อถ่ายภาพแถบของ DNA ภายใต้แสง UV แล้วนำภาพดังกล่าวมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ALP, Col-1, OPN และ OC ด้วยการเทียบความเข้มแสงกับการแสดงออกของยีน GAPDH

**ตารางที่ 3.1** ชื่อยีนและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ PCR (Quantitative PCR Genes and Primer Sequences)

Gene Name	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
mouse GAPDH	ACTTTGTCAAGCTCATTTC	TGCAGCGAAGCTTTATTGATG
mouse ALP	GTTGCCAAGCTGGGAAGAACAC	CCCACCCCGCTATTCCAAAC
mouse Col-I	GGTGCCCCCGGTCTTCAG	AGGGCCAGGGGTCCAGCATTTTC
mouse OPN	CCAACGGCCGAGGTGATAG	CAGGCTGGCTTTGGAAGTTG
mouse OC	GAACAGACTCCGGCGCTA	AGGGAGGATCAAGTCCCG

### 3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้ แต่ละการทดลองใช้กลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 3 ซ้ำ (ยกเว้นการทดลองที่ 3.3.3.2 เนื่องจากจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอจึงรวมตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกันแล้ววิเคราะห์ผล PCR เพียงครั้งเดียว) เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p-value < 0.05)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

#### 4.1 การสกัดและศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดจากเนื้อฟัน (Dentin matrix extract, DME)

งานวิจัยนี้ ใช้เนื้อฟันจากฟันของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยถอนเนื่องจากเป็นฟันคุด หรือถอนเพื่อการจัดฟัน โดยฟันที่ถอนนั้น จะไม่มีรอยโรคของฟัน และได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย (informed consent) สารสกัดจากเนื้อฟัน หรือที่ต่อไปจะเรียกว่า DME นั้น มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น (รูปที่ 4.1) และมีปัญหาในการละลายในน้ำ และใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยจะมีอนุภาคสีขาวขุ่นแขวนลอยอยู่ และเมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานานจะเกิดการตกตะกอน



รูปที่ 4.1 ผง DME ที่ได้หลังผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งแล้ว

#### 4.1.1 ผลได้ของการสกัด (Yield)

ค่าผลได้ของการสกัดได้จากการคำนวณโดยการเทียบร้อยละของอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งของผงฟันที่ได้จากการตัดเป็นชิ้นแล้วนำไปคั่วให้เป็นผงต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งและผลของการสกัดครั้งแรก ได้ผลดังนี้

น้ำหนักแห้งของผงฟันเริ่มต้น = 13,310.94 มิลลิกรัม

น้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง = 51.65 มิลลิกรัม

คิดเป็นอัตราส่วน 51.65/13310.94

หรือร้อยละผลได้ = 0.388 % (น้ำหนักแห้ง)

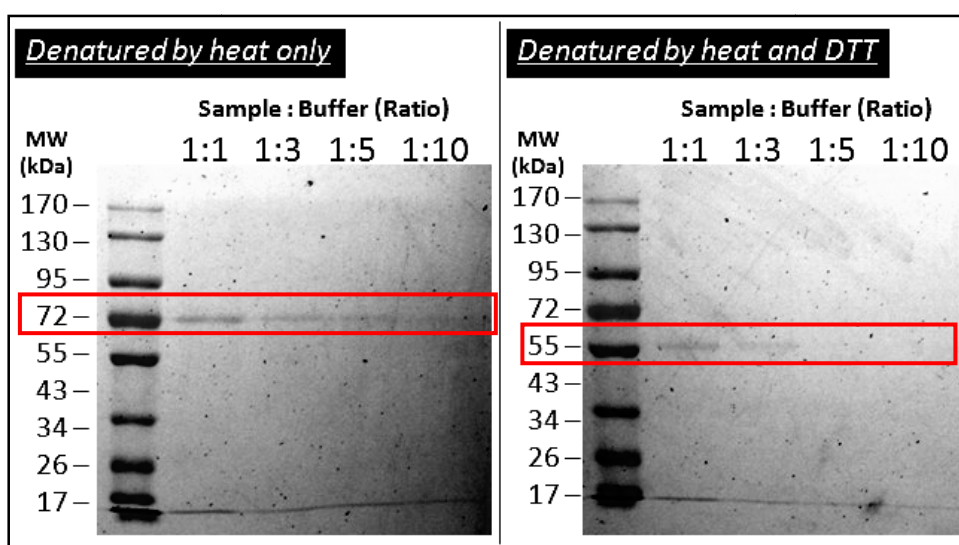
ผลการศึกษาร้อยละผลได้ดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Mizutani และคณะ (1996) ซึ่งสกัด DME จากฟันของโค (bovine teeth) ด้วย กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน พบว่าผลได้ของสารสกัดจากเนื้อฟันโค คิดเป็นร้อยละ 12 ของน้ำหนักแห้งเริ่มต้นของฟันโค [Muzutani et al., 1996] แหล่งที่มาของฟันและวิธีการสกัด มีผลต่อค่าผลได้ของสารสกัดเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการค้นคว้าและศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเปรียบเทียบการสกัด DME จากฟันมนุษย์คนไทยด้วยวิธีการต่างๆ ต่อไป เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมที่สุด

#### 4.1.2 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight)

Gel electrophoresis แบบ SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว ในการศึกษาโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย โดยใช้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการศึกษาน้อยเพียงระดับ มิลลิกรัม โดยสารผสมโปรตีนที่ต้องการแยกและหาน้ำหนักโมเลกุลต้องถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติโดยให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้สารไดไธอริทอล (dithiothreitol; DTT) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์สลายพันธะไดซัลไฟด์ จากรูปที่ 4.2 แถบสีของโปรตีนที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดที่ 55 และ 72 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นว่า โปรตีนใน DME ไม่ได้ถูกทำให้สลายไปทั้งหมดระหว่างกระบวนการสกัด และโปรตีนเหล่านี้เมื่อถูกทำให้สูญเสียสภาพด้วยความร้อนจะเห็นแถบสีในช่วงน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 72 กิโลดาลตัน แต่เมื่อถูกทำให้



สูญเสียสภาพและตัดขนาดของสายโปรตีนให้เล็กลงด้วยการรีดิวซ์สลายพันธะไดซัลไฟด์แล้วนั้น จะเห็นแถบสีอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 55 กิโลดาลตัน จึงสามารถกล่าวได้ว่า DME ที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 55-72 กิโลดาลตัน สันนิษฐานว่า DME ที่สกัดได้ ประกอบไปด้วยโปรตีนในสารเนื้อฟัน ได้แก่ dentin matrix protein-1 (57 กิโลดาลตัน) bone sialoprotein (72-80 กิโลดาลตัน) osteopontin (60-65 กิโลดาลตัน) และ osteonectin (40 กิโลดาลตัน) [Goldberg et al., 2004]



รูปที่ 4.2 ผล Gel electrophoresis (แบบ SDS-PAGE) ของสารสกัดเนื้อฟัน

ผลการทดลองนี้ไม่พบแถบของ DSPP ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 95 กิโลดาลตัน แม้ว่าในเนื้อฟันจะมี DSPP อยู่ปริมาณมาก [Butler, 1995] แต่เนื่องจาก DSPP มักย่อยสลายกลายเป็นโปรตีนสายย่อยอย่างรวดเร็วโดยธรรมชาติ ทำให้โดยทั่วไปแล้วจะไม่สามารถเห็นแถบของ DSPP ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ได้ [Yamakoshi, 2010] อย่างไรก็ตาม โปรตีนต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นก็มีบทบาทหน้าที่ในการตอบสนองของภาวะทางชีวภาพต่างๆ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนกรด (acidic matrix protein) และมีค่าประจุเป็นลบ จึงคาดว่าจะสามารถนำมาใช้ควบคุมการปลดปล่อยด้วยตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด A ผสมไฟโบรอินไหมไทย ซึ่งมีค่าประจุเป็นบวกได้ [Okhawilai et al., 2010] อย่างไรก็ตามการที่จะวิเคราะห์ถึงส่วนประกอบในสารสกัด DME นี้โดยเฉพาะเจาะจง จำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นเข้า

ช่วย เช่น การย้อมสีแบบ Silver staining เพื่อตรวจหาโปรตีนที่มีปริมาณน้อยระดับนาโนกรัม และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) เพื่อตรวจดูหมู่ฟังก์ชันและระบุว่าเป็นสารชนิดใดด้วยสเปกตรัม (spectrum) เป็นต้น แต่เทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดค่อนข้างมาก เนื่องจากการย้อมสีแบบ Silver staining นั้นมีค่าใช้จ่ายสูง และเทคนิค FTIR ต้องอาศัยสารต้นแบบ (reference) ที่ทราบสเปกตรัมอยู่แล้ว เพื่อเทียบในการวิเคราะห์ ซึ่งสารต้นแบบที่ต้องการใช้นี้ยังไม่มีการผลิตในเชิงธุรกิจ ต้องอาศัยการสกัดสารต้นแบบขึ้นเอง

#### 4.1.3 ค่าความเป็นประจุ

เนื่องจาก DME ที่สกัดได้ เป็นโปรตีนรวมกันหลายชนิด จึงต้องทำการหาค่าความเป็นประจรรวม โดยประเมินค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) คือ ค่าความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ ว่ามีค่าศักย์เป็นลบหรือบวก เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบตัวนำส่งให้มีสมบัติทางประจุตรงข้ามกับ DME เพื่อให้สมบัติความต่างทางประจุทำให้เกิดปฏิกิริยาดึงดูดกันระหว่างตัวนำส่งและ DME วิธีการหาค่าศักย์เซต้าของ DME เริ่มจากการนำ DME มาผสมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.5) ในอัตราความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผสมในน้ำปราศจากไอออน (พีเอช 5.5) ในอัตราความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน หลังจากนั้นตัวอย่างนำสารละลายทั้งสองตัวอย่าง ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง ส่งไปวัดค่าศักย์เซต้าด้วยเครื่อง Zeta sizer ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (Nanotec) อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

DME ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ DME ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน (พีเอช 5.5) มีค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) เฉลี่ยอยู่ที่  $-10.53 \pm 0.12$  และ  $-13.53 \pm 0.31$  มิลลิโวลต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่อสนามไฟฟ้า (Electrophoretic mobility) เฉลี่ยอยู่ที่  $-0.83 \pm 0.01$  และ  $-1.06 \pm 0.02$  เซนติเมตรต่อโวลต์ต่อไมโครเมตร ตามลำดับ และมีค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) เฉลี่ยอยู่ที่  $18.90 \pm 1.30$  และ  $3.04 \pm 0.12$  มิลลิวินาทีต่อเซนติเมตร ตามลำดับ

DME ที่สกัดได้ในการทดลองนี้ มีความเป็นประจุลบค่อนข้างสูง ที่พีเอช 7.5 (เลือด) และพีเอช 5.5 (สภาวะความเป็นกรดในช่องปาก) และยืนยันข้อสันนิษฐานที่ว่า DME ที่สกัดได้ ประกอบไปด้วยโปรตีนกลุ่มเมทริกซ์โปรตีนที่เป็นกรด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนกรดและมีค่าประจุเป็นลบ ด้วยสมบัติทางประจุนี้ DME จึงสามารถยึดเกาะบนตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินชนิด A

และเจลาตินชนิด A ผสมไฟโบรอินใหม่ไทย ซึ่งมีค่าประจุรวมเป็นบวก ได้ และจากค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) พบว่า DME ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า DME ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน แสดงว่า โมเลกุลของ DME สามารถแตกตัวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ได้ดีกว่าในน้ำปราศจากไอออน หรืออาจกล่าวได้ว่า DME มีแนวโน้มที่จะสามารถละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.5) ได้ดีกว่าในน้ำปราศจากไอออน (พีเอช 5.5)

**ตารางที่ 4.1** ค่าศักย์เซต้าของสารสกัดจากเนื้อฟัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Sample	Zeta Potential (mV)	*Mob. (cm/Vs/ $\mu$ m)	**Cond. (mS/cm)
DME in DI water (pH 5.5)	$-13.53 \pm 0.31$	$-1.06 \pm 0.02$	$3.04 \pm 0.12$
DME in PBS (pH 7.5)	$-10.53 \pm 0.12$	$-0.83 \pm 0.01$	$18.90 \pm 1.30$

\*Mob. = Electrophoretic mobility หรือ อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่อสนามไฟฟ้า

\*\*Cond. = Conductivity หรือ ค่าการนำไฟฟ้า

#### 4.1.4 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์กระดูก

##### MC3T3-E1

โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

ก. การศึกษาผลของ DME ต่อการเจริญเติบโตของ MC3T3-E1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรัมน้อยกว่าปกติ (2%)

สารสกัดจากเนื้อฟันถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ชนิดผสมซีรัมร้อยละ 2 โดยปริมาตร (MEM with 2% FBS) ในอัตราส่วน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อฟัน เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) เพราะเลี้ยงเซลล์จำนวนเริ่มแรก  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม (ประมาณ  $1.05 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ในภาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 95 และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

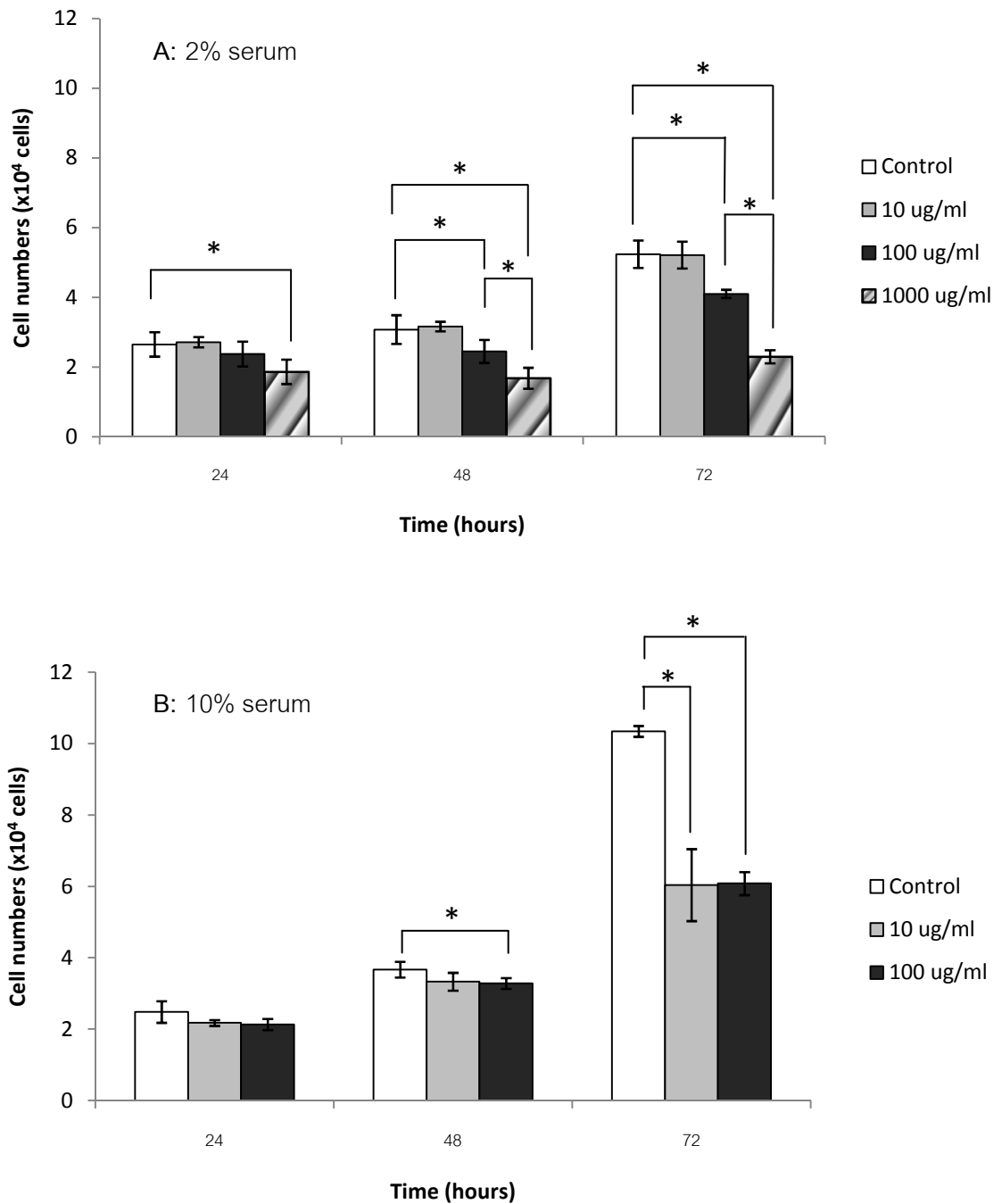
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อดูผลของ DME ว่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของ MC3T3-E1 ในสถานะที่มีซีรัมน้อยกว่าปกติได้หรือไม่ (สถานะการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้ซีรัมร้อยละ 10) โดยสาเหตุของการใช้ซีรัมน้อยลง ก็เพื่อลดผลของซีรัมให้น้อยที่สุด ทั้งนี้เพื่อป้องกันผลของโปรตีน หรือโกรทแฟคเตอร์ ที่มีในซีรัม มารบกวนผลของ DME จากผลการทดลองในภาพที่ 4.3 A พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น กลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์น้อยและไม่เพิ่มขึ้นในทุกช่วงเวลาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ต่อมาที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง กลุ่มที่อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 100 ไมโครกรัม มีจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่มที่อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 10 ไมโครกรัมและกลุ่มควบคุม ตามลำดับ แต่ในกลุ่มที่อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม กล่าวได้ว่า อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมง ของเซลล์กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลับพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ DME ในอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้น เป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงตามลำดับ แสดงว่า DME ไม่สามารถทดแทนซีรัมในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และ DME ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาในการแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (population doubling time; PDT) แสดงในตารางที่ 4.2

ข. การศึกษาผลของ DME ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรัมอัตราปกติ (10%)

สารสกัดจากเนื้อไขมันถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ชนิดผสมซีรัมร้อยละ 10 โดยปริมาตร (10% FBS) ในอัตราส่วน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อไขมัน เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) ในความหนาแน่นและสถานะเดียวกับที่กล่าวมาในการทดลอง ก. พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ทั้งสามกลุ่มตัวอย่าง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และที่เวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนน้อยกว่าเซลล์กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และที่เวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ของกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกัน แต่ทั้งสองกลุ่มมีจำนวนน้อยกว่าเซลล์กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 B

เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาในการแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (PDT) แสดงใน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า ในสภาวะปกติ (ซีรัมร้อยละ 10) กลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เท่ากับ  $0.029 \pm 0.001$  และ PDT เท่ากับ  $24.09 \pm 1.16$  ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบกับรายงานวิจัยของ Thi และคณะ (2010) ที่ระบุว่า PDT มาตรฐานของเซลล์ MC3T3-E1 อยู่ที่ระหว่าง 19 – 28 ชั่วโมง และรายงานวิจัยของ Vachiraroj และคณะ (2009) ที่ใช้เซลล์ MC3T3-E1 ที่มาจากแหล่งเดียวกันกับงานวิจัยนี้ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมร้อยละ 10 มีค่า PDT เฉลี่ยอยู่ที่  $23.95 \pm 0.15$  ชั่วโมง กล่าวได้ว่า ค่า PDT ที่ได้จากการทดลองนี้ ไม่แตกต่างกับรายงานวิจัยดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ( $p\text{-value} < 0.05$ ) แสดงว่า เซลล์ MC3T3-E1 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปกติของการทดลองนี้เจริญเติบโตได้อย่างปกติ แต่เมื่อลดปริมาณซีรัมลงให้น้อยกว่าปกติ (ซีรัมร้อยละ 2) พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงเหลือ  $0.022 \pm 0.007$  คิดเป็น 0.76 เท่าเมื่อเทียบกับสภาวะซีรัมร้อยละ 10 และ PDT เพิ่มขึ้นเป็น  $37.07 \pm 12.77$  หรือแบ่งตัวเป็น 2 เท่าได้ช้าลงประมาณ 1.54 เท่าเมื่อเทียบกับสภาวะซีรัมร้อยละ 10 และพบว่าในสภาวะที่มีซีรัมร้อยละ 2 DME ไม่ส่งผลให้ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และ PDT ของการเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่สภาวะซีรัมร้อยละ 10 กลับพบว่า DME ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และ PDT ของเซลล์ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของ DME ในอาหารเลี้ยงเซลล์มากขึ้น เซลล์ MC3T3-E1 จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจำเพาะน้อยลง และมีใช้เวลาในการแบ่งตัวเป็น 2 เท่าช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองในรูป 4.3 A แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะที่มีซีรัมน้อยกว่าปกติ DME ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้จำนวนเซลล์ MC3T3-E1 ที่เวลา 72 ชั่วโมง แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก DME ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนในช่วง 48 ชั่วโมงแรกน้อยมาก อย่างไรก็ตาม พบว่า DME ไม่ส่งผลต่ออัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในช่วง log phase เพราะเมื่อคำนวณ PDT จากช่วง log phase แล้ว ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการทดลอง และในสภาวะที่มีซีรัมปกติ DME ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้จำนวนเซลล์ในระยะเวลา 72 ชั่วโมงน้อยกว่ากับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และยังส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนในช่วง log phase ด้วย คือ ทำให้ค่า PDT มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวได้ว่า ในสภาวะปกติ DME ในทุกความเข้มข้น ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1



**รูปที่ 4.3** การเพิ่มจำนวนของเซลล์ MC3T3-E1 วิเคราะห์ด้วย MTT assay โดยเพาะเลี้ยงเริ่มแรก ความหนาแน่น  $1.05 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร สภาวะที่มี  $\text{CO}_2$  ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ตลอดการเลี้ยง โดยรูป A ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมร้อยละ 2, รูป B ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัมร้อยละ 10 (\* = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง)

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาในการเพิ่มจำนวนจากเดิมเป็น 2 เท่า (PDT) ของเซลล์ MC3T3-E1 (คำนวณจากผลการทดลองในรูปแบบที่ 4.3)

DME concentration in culture media	$\mu$		PDT (hours)	
	2% FBS	10% FBS	2% FBS	10% FBS
0 $\mu\text{g/ml}$ (Control)	0.022 $\pm$ 0.007	0.029 $\pm$ 0.001	37.07 $\pm$ 12.77	24.09 $\pm$ 1.16
10 $\mu\text{g/ml}$	0.021 $\pm$ 0.005	0.023 $\pm$ 0.009	34.48 $\pm$ 6.59	33.15 $\pm$ 10.55
100 $\mu\text{g/ml}$	0.022 $\pm$ 0.006	0.017 $\pm$ 0.001	34.45 $\pm$ 12.04	40.63 $\pm$ 2.98

#### 4.1.5 ผลของสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1

โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

##### ก. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ DME กับ Dexamethasone ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นกระดูกนั้น ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารที่ช่วยชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูก สารเหล่านั้นได้แก่  $\beta$ -glycerophosphate, L-Ascorbic acid และ Dexamethasone (Dex) โดยเรียกอาหารเลี้ยงเซลล์ประเภทนี้ว่า Osteogenic medium แต่จากการศึกษารายงานวิจัยบางฉบับ พบว่า Dex ไม่มีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงให้เซลล์ MC3T3-E1 เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก แต่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม  $\beta$ -glycerophosphate และ L-Ascorbic acid ก็เพียงพอแล้ว [Lian et al., 1997] การทดลองนี้จึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสม Dex (MEM ผสม 10%FBS + 10mM  $\beta$ -glycerophosphate + 50 $\mu\text{g/ml}$  L-ascorbic acid ; ใช้ตัวย่อว่า OM) เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุม โดยสารสกัดจากเนื้อฟัน (DME) ถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ควบคุม (OM) ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ) และเปรียบเทียบผลที่มีต่อเซลล์ MC3T3-E1 กับการ

ผสม  $10^{-7}$  M Dex ใน OM โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมทั้ง DME หรือ Dex เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) ดังจะแบ่งได้แบ่ง 4 กลุ่มตัวอย่างดังนี้

กลุ่ม 1 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM (กลุ่มควบคุม)

กลุ่ม 2 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + Dex

กลุ่ม 3 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 100 ไมโครกรัม

กลุ่ม 4 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + Dex + DME 100 ไมโครกรัม

โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดียวกับข้อ 4.1.4 เก็บตัวอย่างมา ที่เวลา 10 วัน หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลการสังเคราะห์แคลเซียมด้วยการย้อมสี Alizarin Red-s ที่เวลา 21 วัน

Dexamethasone (Dex) เป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ ที่นิยมนำมาผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก มีรายงานการวิจัยกล่าวว่า Dex นั้นช่วยส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกในการเลี้ยงเซลล์หลายชนิด [Beloti and Rosa, 2005] โดยส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) การสังเคราะห์ออกสตีโอแคลซิน (OC) และการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type-1) แต่จากการศึกษารายงานวิจัยบางฉบับ พบว่า Dex ไม่มีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงให้เซลล์ MC3T3-E1 เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก แต่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม  $\beta$ -glycerophosphate และ L-Ascorbic acid ก็เพียงพอแล้ว อีกทั้งยังพบว่า Dex ที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M ซึ่งเป็นปริมาณปกติที่ใช้ในการผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Osteogenic Medium กลับส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของ MC3T3-E1 อีกด้วย [Lian et al., 1997] จึงได้ทำการทดลองนี้ขึ้นเพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลระหว่างการใช้และไม่ใช้ Dex ร่วมกับ DME ว่าส่งผลต่างกันอย่างไรอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

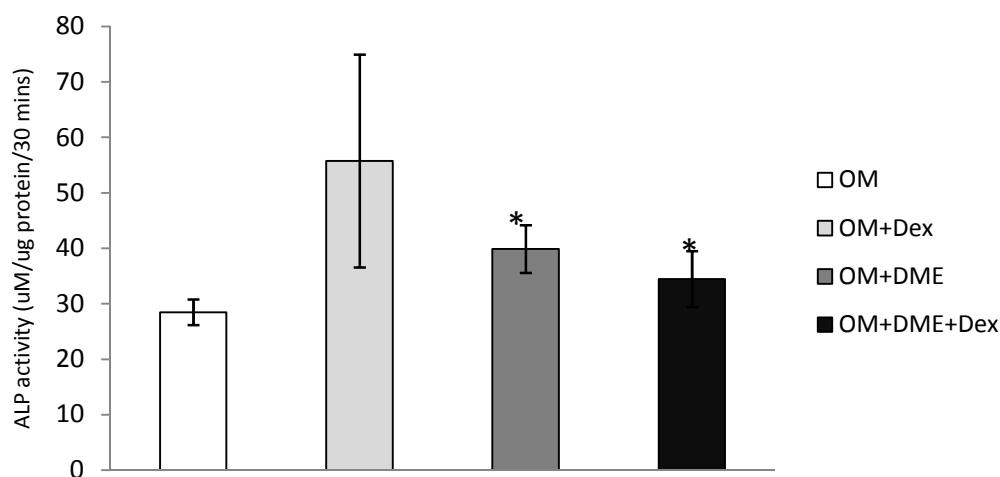
จากการวิเคราะห์ผลกิจกรรมเอนไซม์ ALP ที่ระยะเวลา 5 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ทำให้พบว่า การผสม Dex และ DME ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ ALP มากขึ้นในระยะเวลา 5 วัน โดยที่ Dex ส่งผลให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ALP มากกว่า DME แต่เมื่อผสมทั้ง Dex และสารสกัดจากเนื้อฟันด้วยกัน กลับพบว่า ส่งผลน้อยกว่าการผสมสารแค่อ่างใดอย่างหนึ่ง อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ผลกิจกรรมเอนไซม์ ALP ที่เวลา 5 วันนั้น อาจทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากไม่ใช่ช่วงที่เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ALP สูงที่สุดในการเพาะเลี้ยง จากรายงานการวิจัยของ Luan และคณะ (2012) พบว่า การเพาะเลี้ยง MC3T3-E1 เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ALP ในวันที่ 3, 6 และ 9 ของการเพาะเลี้ยง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มากที่สุดในวันที่ 6 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 9 แต่ในรายงานการวิจัยของ Wang และคณะ (2008) กลับพบว่า เซลล์



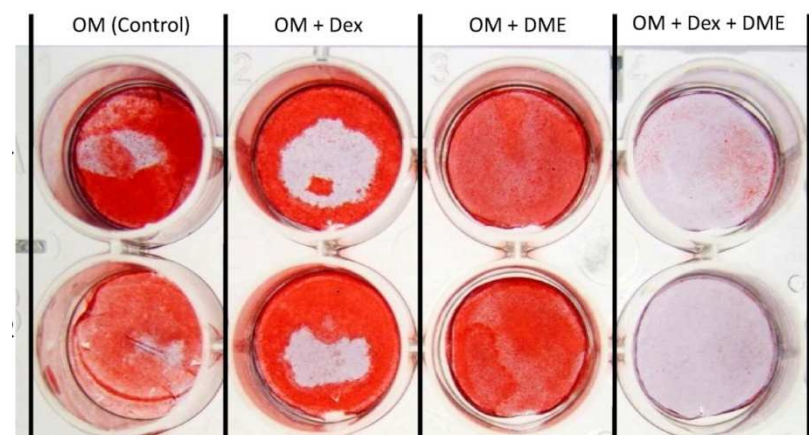
MC3T3-E1 พบกิจกรรมเอนไซม์ ALP สูงที่สุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ควรมีการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ALP ในหลายช่วงเวลา เพื่อจะได้ค่าที่ในช่วงที่มีกิจกรรมเอนไซม์ ALP มากที่สุดของเซลล์ MC3T3-E1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เพราะกิจกรรมเอนไซม์ ALP จะเกิดขึ้นในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งแล้วลดลงอย่างรวดเร็ว (ดังแสดงในรูปที่ 2.3 และ 2.5)

จากการวิเคราะห์ผลการสังเคราะห์แคลเซียมด้วยการย้อมสี Alizarin Red-s ที่ระยะเวลา 21 วัน (รูปที่ 4.5) พบว่า เซลล์ MC3T3-E1 กลุ่มควบคุม (OM) กลุ่มที่อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม Dex (OM+Dex) และกลุ่มที่อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME 100 ไมโครกรัม (OM+DME) มีการย้อมติดสีส้ม-แดงอย่างชัดเจน ในขณะที่กลุ่มที่อาหารเลี้ยงเซลล์ผสมทั้ง Dex และ DME (OM+Dex+DME) ย้อมติดสีส้มแดงเพียงเล็กน้อย (จากรูปที่ 4.5 เซลล์กลุ่ม OM+Dex มีการหลุดลอกบริเวณตรงกลาง เนื่องจากด้วยแรงกระทำที่มากเกินไปในช่วงการล้างด้วยสารละลายไซลีน แต่ก็ยังสามารถประเมินความปริมาณแคลเซียมจากความเข้มของสีที่ย้อมติดต่อพื้นที่ได้) กล่าวได้ว่าในระยะเวลาเพาะเลี้ยง 21 วัน เซลล์ MC3T3-E1 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมพิเศษกลุ่มควบคุม (OM) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม Dex (OM+Dex) และอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME (OM+DME) มีการสังเคราะห์แคลเซียมหรือสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ขึ้นมากกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม Dex และสารสกัดจากเนื้อฟัน (OM+Dex+DME) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเพียง  $\beta$ -glycerophosphate + L-Ascorbic acid สามารถทำให้เซลล์ MC3T3-E1 และการผสม Dex หรือ DME อย่างใดอย่างหนึ่งในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็ช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์แคลเซียมและสะสมแร่ธาตุในระยะเวลา 21 วันของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน ในขณะที่การผสมทั้ง Dex และ DME ในอาหารเลี้ยงเซลล์กลับส่งผลให้การสังเคราะห์แคลเซียมและสะสมแร่ธาตุลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ALP ที่ระยะเวลา 5 วัน ก่อนหน้านี้ เนื่องจาก ALP เป็นตัวบ่งชี้ช่วงต้น (early marker) ที่พบในช่วงต้นของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นกระดูก และแคลเซียมเป็นตัวบ่งชี้ช่วงปลาย (late marker) ที่พบในช่วงปลายของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นกระดูก จึงกล่าวได้ว่า แม้ไม่ได้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ALP ในช่วงที่กิจกรรมเอนไซม์มากที่สุด แต่จากผลการวิเคราะห์การสังเคราะห์แคลเซียมด้วยการย้อมสี Alizarin Red-s ได้แสดงว่า สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก แต่การใช้ทั้ง DME และ Dex ร่วมกัน กลับไม่ได้ส่งผลส่งเสริมกัน และเนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของ DME ต่อเซลล์ MC3T3-E1 จึงไม่มีการผสม Dex ในอาหารเลี้ยงเซลล์ตลอดการ

วิจัย เพื่อขจัดปัจจัยของ Dex ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ออกไป เหลือเพียงแต่ผลของ DME เท่านั้น



**รูปที่ 4.4** ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALP โดยเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุม (OM) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม Dex (OM+Dex) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME (OM+DME) และอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมทั้ง Dex และ DME (OM+Dex+DME) โดยใช้ DME เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (\* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง OM)



**รูปที่ 4.5** การย้อมสีด้วย Alizarin red-s ซึ่งแสดงการสังเคราะห์แคลเซียมของเซลล์ MC3T3-E1 ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุม (OM, control) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม Dex (OM+Dex) อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME (OM+DME) และอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมทั้ง Dex และ DME (OM+Dex+DME) โดยใช้ DME เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ DME ในอัตราส่วนต่างๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์

การเติมสารสกัดจากเนื้อฟัน (DME) ในอัตราส่วน 25, 50, 100, และ 500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมพิเศษ (MEM ผสม 10% FBS +  $\beta$ -glycerophosphate + L-Ascorbic acid ; ใช้ตัวย่อว่า OM) โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ OM ที่ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อฟัน และเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (10% FBS-MEM; ใช้ตัวย่อว่า Growth M) เป็นกลุ่มควบคุม (n=4) มีกลุ่มตัวอย่าง 6 กลุ่มดังนี้

กลุ่ม 1 : เซลล์เลี้ยงด้วย Growth M อย่างเดียว

กลุ่ม 2 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM อย่างเดียว

กลุ่ม 3 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 25  $\mu$ g/ml

กลุ่ม 4 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 50  $\mu$ g/ml

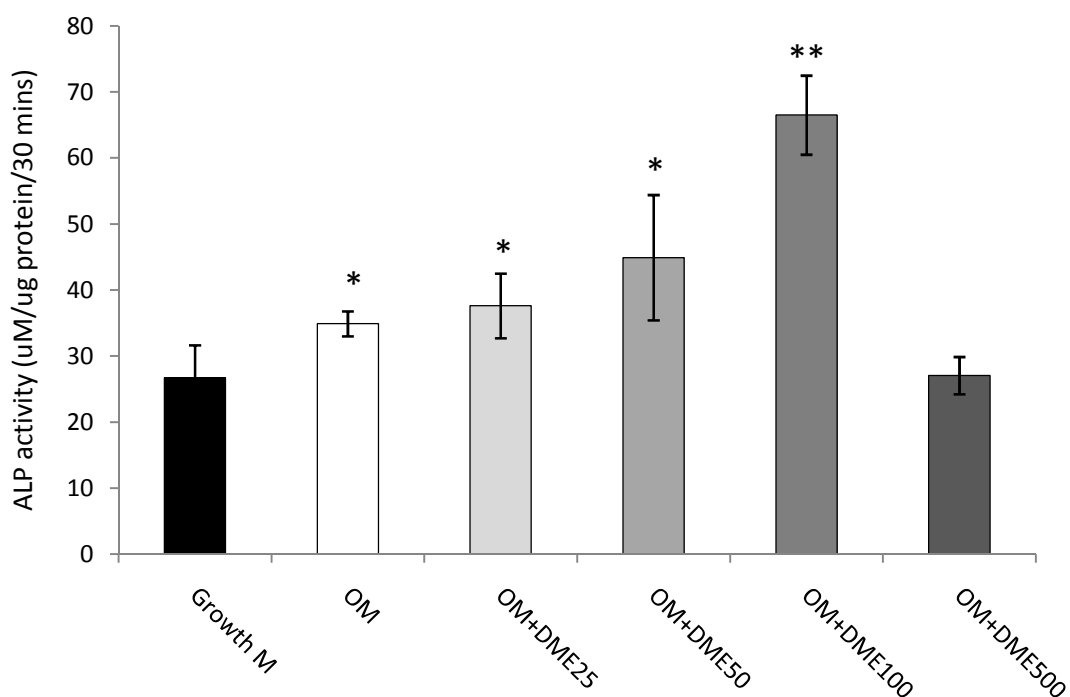
กลุ่ม 5 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 100  $\mu$ g/ml

กลุ่ม 6 : เซลล์เลี้ยงด้วย OM + DME 500  $\mu$ g/ml

เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลที่ระยะเวลา 10 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์ผลของกิจกรรมเอนไซม์ ALP ที่เกิดขึ้น

ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.6 การอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมพิเศษ (OM) นี้ ส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์ ALP ในระยะเวลา 10 วัน ของเซลล์ MC3T3-E1 มากกว่าอาหารเลี้ยงปกติ (Growth M) อย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มปริมาณ DME ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์มากขึ้น ทำให้เซลล์มีแนวโน้มการสังเคราะห์ ALP ในวันที่ 10 มากขึ้น และการผสม DME ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในอัตราส่วน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์ ALP มากกว่าการไม่ผสม DME ในอาหารเลี้ยงเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญ แต่การผสม DME 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลับส่งผลให้การสังเคราะห์ ALP เกิดขึ้นน้อยจนไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เมื่อดูจากการสังเคราะห์ ALP ของเซลล์ MC3T3-E1 ในวันที่ 10 ของทดลองนี้ กล่าวได้ว่าการผสม DME ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 แต่ปริมาณ DME ที่มากเกินไป คือ 500 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิเมตรกลับส่งผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 ผู้วิจัยจึงใช้ DME ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เพื่อศึกษาในหัวข้ออื่นๆ ต่อไป



**รูปที่ 4.6** ผลของสารสกัดจากเนื้อฟัน (DME) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ALP ของเซลล์ MC3T3-E1 วิเคราะห์ผลในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเซลล์ในส่วนผสมต่างๆ กับ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ALP ( \* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม ตัวอย่าง Growth M, \*\* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม ตัวอย่างอื่น)

#### 4.2 ลักษณะสมบัติของตัวนำส่งเจลลาตินและเจลลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย

ตัวนำส่งจากสารละลายเจลลาตินชนิด A ผสมกับสารละลายไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วนเจลลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทย เป็น 100:0, 70:30, 50:50 ตามลำดับ มีลักษณะคล้าย ฟองน้ำ เป็นทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 11 มิลลิเมตร สูง 1 มิลลิเมตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยกระบวนการพลาสมา ที่หน่วยจ่ายกลาง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ศึกษา ลักษณะสมบัติต่างๆ ได้แก่

#### 4.2.1 ลักษณะทางกายภาพ

ลักษณะทั่วไปของตัวนำส่งเจลาตินชนิด A (G:SF 100:0) และตัวนำส่งเจลาตินชนิด A ผสมไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วน 70/30 และ 50/50 (G:SF 70:30 และ G:SF 50:50 ตามลำดับ) แสดงดังรูปที่ 4.7

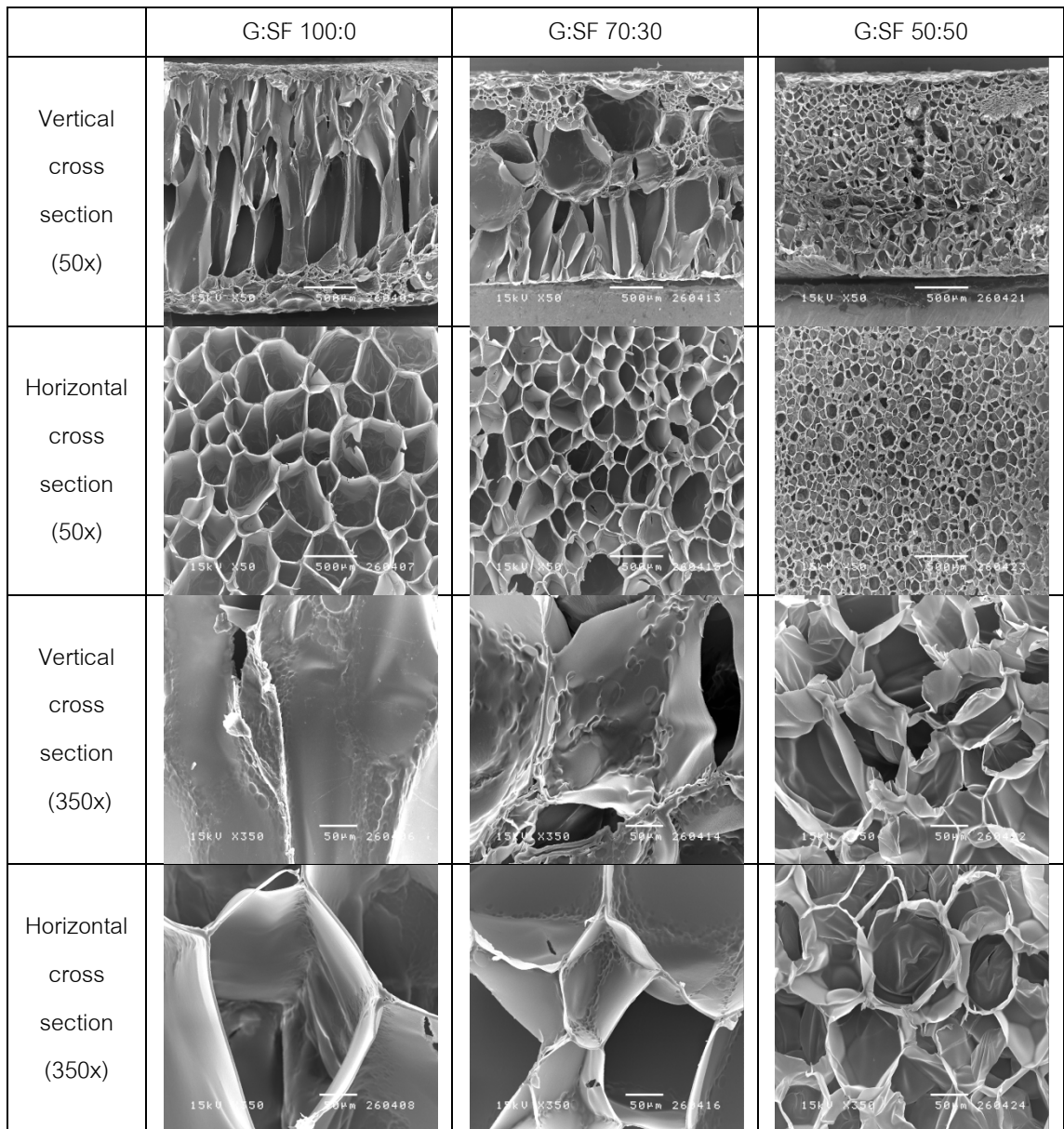


รูปที่ 4.7 รูปถ่ายตัวนำส่งเจลาตินชนิด A (G:SF 100:0) และตัวนำส่งเจลาตินชนิด A ผสมไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วน 70/30 และ 50/50 (G:SF 70:30 และ G:SF 50:50 ตามลำดับ)

ตัวนำส่งเจลาติน และเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วน 100:0, 70:30, และ 50:50 พบว่ามีค่าน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นงานตัวนำส่งอยู่ที่  $13.28 \pm 0.50$ ,  $12.86 \pm 0.56$  และ  $11.36 \pm 0.63$  มิลลิกรัม ตามลำดับ และความหนาแน่นของตัวนำส่ง มีค่าเท่ากับ  $0.059 \pm 0.002$ ,  $0.068 \pm 0.003$ , และ  $0.069 \pm 0.004$  มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) จะเห็นว่าความหนาแน่นเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทยที่ผสมเข้าไป ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับสารละลายฟอสเฟตบัพเฟออร์ (PBS absorption) ของตัวนำส่ง โดยการวัดน้ำหนักเปียกของตัวนำส่งภายหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟออร์ (PBS) (พีเอช 7.4) ที่ 37 องศาเซลเซียส เทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวนำส่ง ได้ค่าร้อยละในการดูดซับน้ำเท่ากับ  $90.43 \pm 0.29$ ,  $87.73 \pm 0.29$ , และ  $86.60 \pm 0.76$  ตามลำดับ แปรผกผันกับค่าความหนาแน่น

เมื่อตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ที่กำลังขยาย 50 และ 350 เท่า ตัวนำส่งทั้งสามชนิดมีโครงสร้างรูพรุนที่เชื่อมโยงกัน โดยตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินอย่างเดียวจะมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่า และมีความหนาแน่นน้อยกว่าตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย และเมื่ออัตราการผลิต

ไฟโบรอินไหมไทยมากขึ้น จะทำให้รูพรุนมีขนาดเล็กลง และโครงสร้างภายในของตัวนำส่งมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.8



**รูปที่ 4.8** รูปถ่ายพื้นผิวแบบตัดขวางแนวตั้งฉาก (vertical cross section) และพื้นผิวแบบตัดขวางแนวระนาบ (horizontal cross section) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย (G:SF) ในอัตราส่วนผสม 100:0, 70:30 และ 50:50 (กำลังขยาย 50 และ 350 เท่า)

**ตารางที่ 4.3** ลักษณะสมบัติทางกายภาพและการดูดซับสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ของตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาติน ผสมไฟโบรอินไหมไทยในอัตราส่วนต่างๆ (ขนาดเริ่มต้นของตัวนำส่งเมื่อแห้งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร)

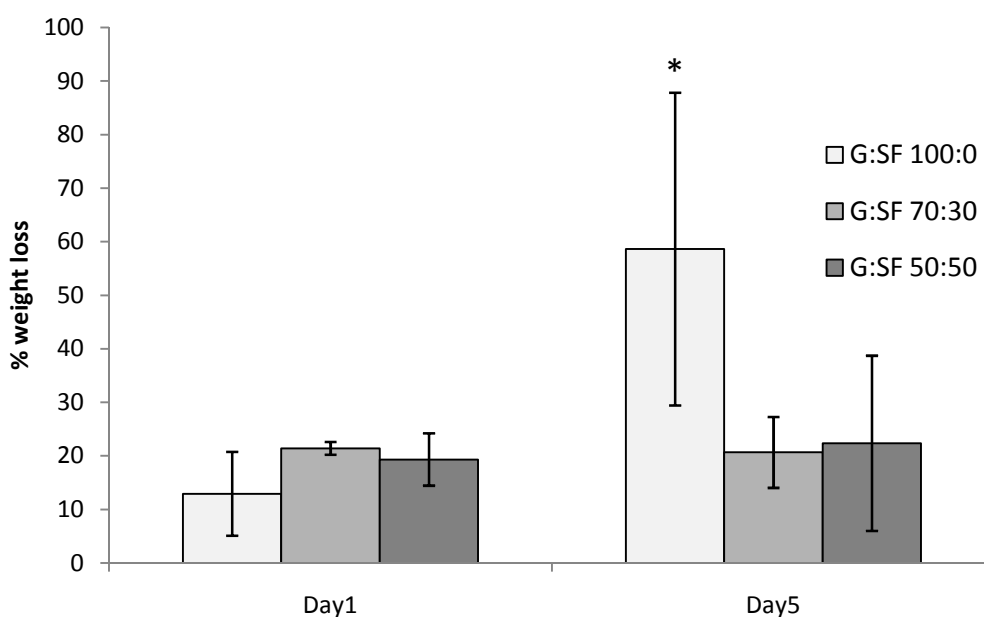
Gelatin : Thai silk fibroin	Weight ( mg )	Density ( mg/mm <sup>3</sup> )	PBS* absorption ( % wt/wt )
G:SF 100 : 0	13.28 ± 0.50	0.059 ± 0.002	90.43 ± 0.29
G:SF 70 : 30	12.86 ± 0.56	0.068 ± 0.003	87.73 ± 0.29
G:SF 50 : 50	11.36 ± 0.63	0.069 ± 0.004	86.60 ± 0.76

\* at 37°C, pH7.4, 3 hours

#### 4.2.2 ความคงตัวของตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์

ตัวนำส่งในงานวิจัยนี้ ถูกออกแบบมาให้สามารถเก็บกัก DME ด้วยกลไกทางประจุไฟฟ้า และปลดปล่อยด้วยกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ เพื่อให้สามารถประมาณอัตราการปลดปล่อย DME ตามอัตราการย่อยสลายของตัวนำส่ง จึงทำการทดลองนี้เพื่อทดสอบว่า ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางแล้วนั้น มีความคงตัวเมื่อถูกแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อย่างไร เมื่อแช่ตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสไว้ 1 และ 5 วัน พบว่าน้ำหนักของตัวนำส่งเจลาติน และเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วน 100:0, 70:30, และ 50:50 ที่ผ่านการแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เป็นเวลา 1 วัน หายไปร้อยละ 12.93 ± 7.84, 21.42 ± 1.18, และ 19.34 ± 4.88 ตามลำดับ และเมื่อผ่านไป 5 วัน น้ำหนักของตัวนำส่งจะหายไป 58.64 ± 29.20, 20.66 ± 6.62, และ 22.37 ± 16.36 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.9 ทำให้ทราบว่า ตัวนำส่งยังคงถูกละลายในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์แม้ว่าจะผ่านการเชื่อมขวางมาแล้ว และเมื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง พบว่าตัวนำส่งทั้งสามชนิดจะมีอัตราการละลายในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ไม่ต่างกันในช่วง 1 วันแรก คือร้อยละ 12.93 ± 7.84 ถึง 21.42 ± 1.18 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ตัวนำส่งที่มีส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทยจะสามารถคงตัวไว้ได้ดีกว่าตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินอย่างเดียวซึ่งอาจจะละลายหายไปเป็นส่วนใหญ่ แสดงให้เห็นว่า ถ้าใช้ตัวนำส่งเหล่านี้ในการปลดปล่อยสารโดยการแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ตัวนำส่งน่าจะมีการปลดปล่อยสารทันที (burst release) คือร้อยละ 12.93 ± 7.84 ถึง

21.42 ± 1.18 ในช่วงวันแรกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) แต่ที่เวลา 5 วัน ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินอย่างเดียว มีความสามารถในการคงตัวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย โดยมีการปลดปล่อยสารออกมาไม่น้อยกว่าร้อยละ 58.64 ± 29.20 ในขณะที่ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย ทั้งสองชนิด ยังคงตัวได้ไม่ต่างกับวันแรก กล่าวได้ว่า การผสมไฟโบรอินไหมไทยร่วมกับเจลาตินในการผลิตตัวนำส่ง ช่วยเพิ่มความคงตัวของตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ได้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Okhawilai (2010) และ Biman (2009) ที่ว่า ไฟโบรอินไหมสามารถนำมาผสมร่วมกับเจลาตินในการผลิตตัวนำส่งได้ และการใช้ไฟโบรอินไหมร่วมกับเจลาตินยังเพิ่มสมบัติให้ตัวนำส่งคงตัวมากขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้เจลาตินเพียงอย่างเดียว [Okhawilai et al., 2010, Biman et al., 2009]



**รูปที่ 4.9** ร้อยละน้ำหนักของตัวนำส่งแบบต่างๆ ที่สูญเสียไปเนื่องจากถูกละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 และ 5 วัน (n=4) (\* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างอื่นทั้งหมด)

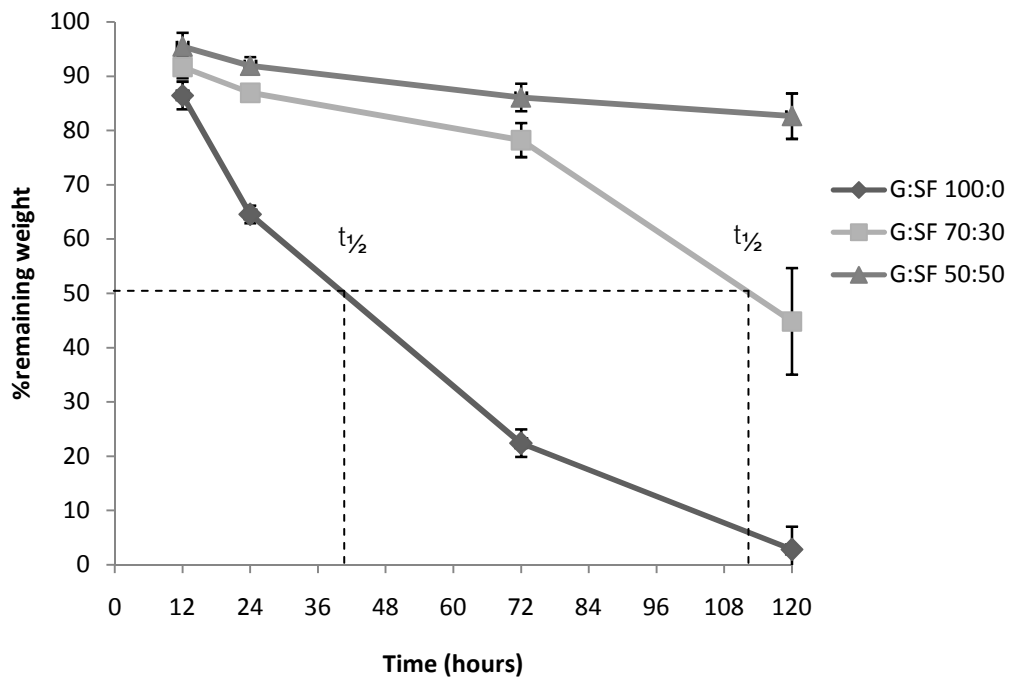


#### 4.2.3 อัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งนอกร่างกาย

เมื่อแช่ตัวนำส่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase) ความเข้มข้น 1 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 12, 24, 72 และ 120 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 4.10 พบว่า น้ำหนักของตัวนำส่งเจลาติน และเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วน 100:0, 70:30, และ 50:50 ที่ผ่านการแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง คงเหลืออยู่ร้อยละ  $86.43 \pm 3.41$ ,  $91.66 \pm 2.06$ , และ  $95.41 \pm 2.54$  ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง น้ำหนักของตัวนำส่งคงเหลืออยู่ ร้อยละ  $64.53 \pm 10.57$ ,  $86.92 \pm 1.44$ , และ  $91.89 \pm 1.60$  ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง น้ำหนักของตัวนำส่งคงเหลืออยู่ ร้อยละ  $22.40 \pm 5.76$ ,  $78.21 \pm 3.14$ , และ  $86.07 \pm 2.52$  ตามลำดับ และที่เวลา 120 ชั่วโมง น้ำหนักของตัวนำส่งคงเหลืออยู่ ร้อยละ  $2.83 \pm 0.72$ ,  $44.81 \pm 9.81$ , และ  $82.61 \pm 4.19$  ตามลำดับ และยังพบว่า เวลาที่ตัวนำส่งถูกย่อยสลายไป ร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก (ครึ่งชีวิต หรือ  $t_{1/2}$ ) พบว่า ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินอย่างเดียวถูกย่อยสลายไปร้อยละ 50 ที่เวลาประมาณ 40 ชั่วโมง ในขณะที่ ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยในอัตราส่วน 70:30 ถูกย่อยสลายไปร้อยละ 50 ที่เวลาประมาณ 110 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินอย่างเดียว (G:SF 100:0) มีอัตราการย่อยสลายที่เร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย (G:SF 70:30 และ G:SF 50:50) การที่อัตราการผสมไฟโบรอินไหมไทยมีผลต่ออัตราการย่อยสลายอย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Okhawilai และคณะ [Okawilai et al., 2010] กล่าวคือ เมื่อเพิ่มอัตราการผสมไฟโบรอินไหมไทยในการผลิตตัวนำส่ง อัตราการย่อยสลายช้าลง แสดงให้เห็นว่าการผสมไฟโบรอินไหมไทยช่วยลดอัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินได้ เนื่องจากใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นตัวทำปฏิกิริยาการย่อยสลาย ซึ่งคอลลาจีเนสจะมีความจำเพาะในการย่อยสลายกลุ่มโปรตีนคอลลาเจน เช่น เจลาติน ได้ดี ทำให้ตัวนำส่งที่ผลิตจากส่วนผสมของเจลาตินมากกว่า ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสมากกว่า เช่นกัน

จากผลการทดลองในรูป 4.9 และ 4.10 ทำให้สามารถประเมินแนวโน้มการปลดปล่อยสารของตัวนำส่งทั้งสามชนิดได้ เนื่องจากค่าประจุมรวมของพื้นผิวตัวนำส่งในสภาวะร่างกาย (ค่าพีเอชของเลือดประมาณ 7.35 - 7.45) เป็นบวก จะสามารถเก็บกักสารที่ต้องการปลดปล่อย คือ DME ที่มีค่าประจุไฟฟ้าเป็นลบ ไว้ด้วยปฏิกิริยาแรงดึงดูดระหว่างประจุไฟฟ้าที่ต่างกัน และจะเกิดการปลดปล่อย DME ออกมาจากตัวนำส่งเมื่อตัวนำส่งนั้นมีการย่อยสลาย อย่างไรก็ตามผลการทดลองการย่อยสลายภายนอกนี้ อาจแตกต่างจากผลการทดลองการย่อยสลายในร่างกาย

สัตว์ทดลอง เนื่องจากภายในร่างกายนั้น ไม่ได้มีแค่เอนไซม์คอลลาจีเนส แต่ยังมีเอนไซม์และปัจจัยอื่นๆ เช่น ไลโซไซม์ และปฏิกิริยาจากเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ที่ส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งทั้งสามชนิดนี้ด้วย ประโยชน์ที่ได้จากผลการทดลองนี้ในการเลือกชนิดของตัวนำส่งและออกแบบการทดลองให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์และความต้องการของงานวิจัยในภายหน้าต่อไป



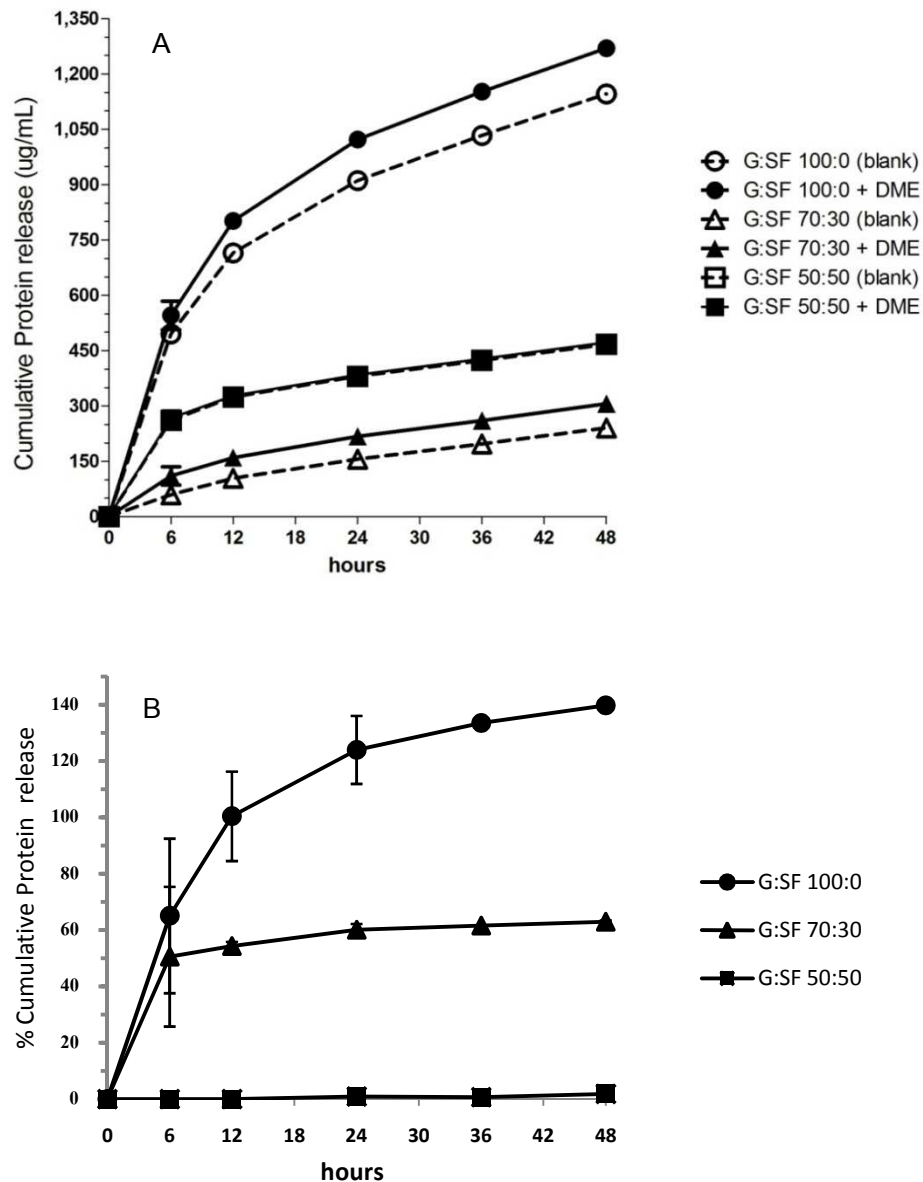
**รูปที่ 4.10** การย่อยสลายของตัวนำส่ง ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (n=4),  $t_{1/2}$  แสดงจุดที่มีการประมาณค่าครึ่งชีวิตของการย่อยสลายของตัวนำส่ง

### 4.3 การทดสอบระบบควบคุมการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย (*in vitro* controlled release)

#### 4.3.1 อัตราการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย

เพื่อพิสูจน์ว่า ตัวนำส่งสามารถกักเก็บและปลดปล่อย DME ได้ตามอัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งหรือไม่ จึงต้องทำการทดสอบการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย โดยนำตัวนำส่งที่มี DME 100 ไมโครกรัม แซ่ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลโดยการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วย BCA assay ที่เวลา 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยมีตัวนำส่งเปล่าแต่ละชนิด (blank) เป็นกลุ่มควบคุม ได้ผลดังรูปที่ 4.11 A พบว่าค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายที่วัดได้มีค่าสูง เนื่องจากทั้งตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย และ DME ที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นสารจำพวกโปรตีนและสามารถตรวจพบได้ด้วย BCA assay เหมือนกัน อย่างไรก็ตามเมื่อทำการหักลบค่าที่วัดได้จากกลุ่มควบคุมที่เป็นตัวนำส่งเปล่า (blank) ออกไป และทำการทดลองหลายๆ ซ้ำ ก็พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 4.11 B กล่าวคือ เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ตัวนำส่งชนิด G:SF 100:0 และ G:SF 70:30 ปลดปล่อย DME ออกมาประมาณร้อยละ 67.07 และร้อยละ 50.60 ตามลำดับ และหลังจากเวลา 12 ชั่วโมง อัตราการปลดปล่อยสะสมค่อนข้างคงที่ ในขณะที่ตัวนำส่งชนิด G:SF 50:50 ปลดปล่อย DME ออกมาเพียงเล็กน้อยในเวลา 24 ชั่วโมงแรก และที่ 48 ชั่วโมง สามารถวัดการปลดปล่อย DME สะสมได้เพียงร้อยละ 1.82 เท่านั้น

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงว่า เมื่ออัตราส่วนการผสมไฟโบรอินไหมไทยที่มากขึ้นในการผลิตตัวนำส่งนั้น จะส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยสาร DME ช้าลง สันนิษฐานว่า DME สามารถยึดเกาะกับตัวนำส่งชนิด G:SF 50:50 ได้ดีที่สุด ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Jetbumpenkul และคณะ (2012) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วน 50:50 มีค่าศักย์ซีต้าประมาณ  $-0.03 \pm 0.27$  มิลลิโวลต์ ที่พีเอช 7.4 และสอดคล้องกับการเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งทั้งสามชนิด ที่ว่า ตัวนำส่งชนิด G:SF 50:50 มีอัตราการย่อยสลายที่ช้าที่สุด ด้วย



**รูปที่ 4.11** การปลดปล่อย DME จากตัวนำส่งเจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทยแต่ละชนิด วิเคราะห์ที่เวลา 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง วัดปริมาณโปรตีนรวมด้วย BCA-assay โดย A แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ถูกปลดปล่อยออกมาต่อช่วงเวลา และ B แสดงร้อยละของปริมาณโปรตีนรวมหักลบค่าที่วัดได้จากตัวนำส่งเปล่า (blank)

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองดังกล่าว พบว่า การวิเคราะห์การปลดปล่อยในงานวิจัยนี้ด้วย BCA assay ไม่ใช่ที่เหมาะสมที่สุด แต่เนื่องด้วยระบบควบคุมการปลดปล่อยนี้เป็นโปรตีน

ทั้งหมด จึงต้องอาศัยวิธีการในการทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโปรตีนของตัวนำส่ง กับโปรตีนของ DME ได้ เช่นการใช้ fluorescent labeling หรือ ใช้ immunoassay เข้ามาช่วย แต่อุปสรรคที่ไม่สามารถเช่นนั้นได้เนื่องจาก DME เป็น mixed crude protein คือกลุ่มของโปรตีนหลายๆชนิดรวมกัน จึงยากต่อการที่หาสารโปรตีนสำหรับเทียบ (reference) ที่เฉพาะเจาะจงได้ แนวทางอื่นที่สามารถนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์หัตถการปลดปล่อย DME จากตัวนำส่งนี้ได้ คือ การวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเซลล์ที่มีต่อ DME ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากตัวนำส่ง

ค่าของร้อยละการปลดปล่อย DME สะสม มีค่าเกินร้อยละ 100 ขึ้นไป (จากรูปที่ 4.11 B) เนื่องจากความคลาดเคลื่อนสะสมของผลการทดลองในแต่ละช่วงเวลา แต่ยังคงสามารถวิเคราะห์แนวโน้มการปลดปล่อย DME ได้

#### 4.3.2 ผลของระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อฟันต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไลน์กระดูก MC3T3-E1

##### ก. ผลของระยะเวลาในการใช้ DME ต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MC3T3-E1

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาของเซลล์ MC3T3-E1 ต่อการคงสภาพความเข้มข้นของ DME ตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน และการใช้ DME เพียง 3 วัน แรกของการเพาะเลี้ยง ว่าการใช้ DME แบบใดจะส่งผลส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 ไปเป็นกระดูกได้ดีกว่ากัน DME โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 ในสภาวะเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว โดยไม่ใช้ตัวนำส่ง เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบ OM (MEM + 10% FBS + 10mM  $\beta$ -glycerophosphate + 50 $\mu$ g/ml L-ascorbic acid) 1 มิลลิลิตรต่อหลุม มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 3 วัน โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่ม 1 : ไม่เติม DME เป็นกลุ่มควบคุม (control)

กลุ่ม 2 : เติม DME 50 ไมโครกรัม ทุก 3 วัน (DME 50)

กลุ่ม 3 : เติม DME 100 ไมโครกรัม ทุก 3 วัน (DME 100)

กลุ่ม 4 : เติม DME 100 ไมโครกรัมครั้งเดียว (DME 100x1)

ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (gene expression) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ดังแสดงรายละเอียดใน ภาคผนวก จ โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เจาะจงกับ Collagen-1 (Col-1), Alkaline phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OC) และ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12 A

ข. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ DME ในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนตัวนำส่งต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MC3T3-E1

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาของเซลล์ MC3T3-E1 ต่อตัวนำส่งที่มีและไม่มี โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 บนตัวนำส่ง โดยแปรผันชนิดของตัวนำส่งที่มีการดูดซับ DME เท่ากันคือ 100 ไมโครกรัม ในสภาวะดังที่กล่าวมาแล้ว และมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 3 วัน โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่ม 1 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 100:0 ที่ไม่มี DME (G:SF 100:0)

กลุ่ม 2 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 100:0 ที่มี DME 100 ไมโครกรัม (G:SF 100:0 + DME)

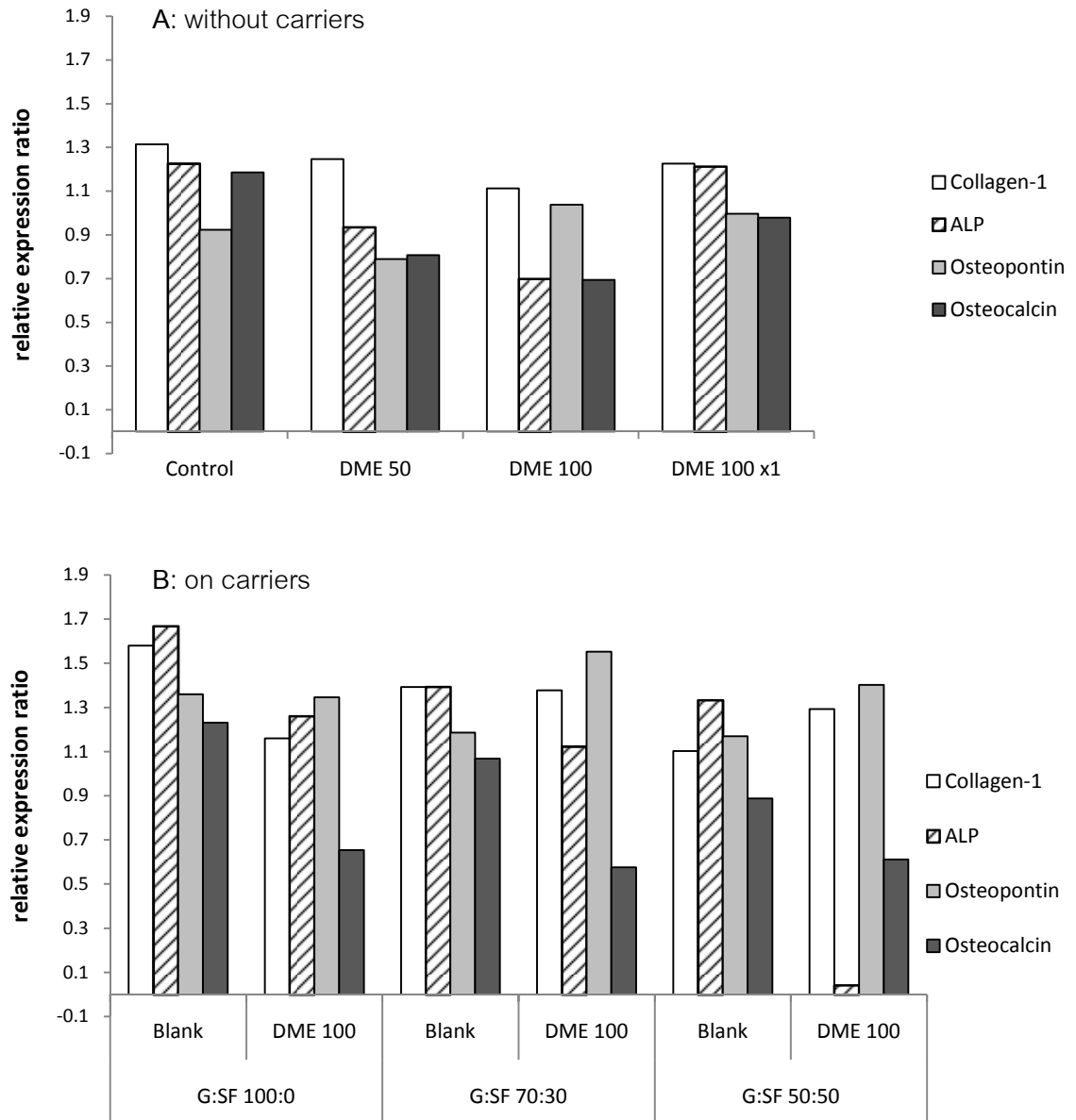
กลุ่ม 3 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 70:30 ที่ไม่มี DME (G:SF 70:30)

กลุ่ม 4 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 70:30 ที่มี DME 100 ไมโครกรัม (G:SF 70:30 + DME)

กลุ่ม 5 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 50:50 ที่ไม่มี DME (G:SF 50:50 + DME)

กลุ่ม 6 : ใช้ตัวนำส่ง G:SF 50:50 ที่มี DME 100 ไมโครกรัม (G:SF 50:50 + DME)

ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (gene expression) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เช่นเดียวกับการทดลอง ก ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12 B



**รูปที่ 4.12** การแสดงออกของยีน collagen-1, alkaline phosphatase, osteocalcin, และ osteopontin ของเซลล์ MC3T3-E1 ที่เวลา 10 วัน ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยแผนภาพแสดงอัตราส่วนค่าความเข้มแสงของการแสดงออกของยีนต่างๆ ต่อค่าความเข้มแสงของการแสดงออกของยีน GAPDH โดย A คือ การเพาะเลี้ยงโดยไม่มีตัวนำส่ง และ B คือ การเพาะเลี้ยงบนตัวนำส่งชนิดต่างๆ (รูปถ่ายของแถบโปรตีนที่ได้จากกระบวนการ Agarose gel electrophoresis แสดงในภาคผนวก ฉ)

ปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงโดยมีตัวนำส่งและไม่มีตัวนำส่ง คือการเจริญเติบโตและความหนาแน่นของเซลล์ เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่มีตัวนำส่งจะเจริญเติบโตบนภาคเลี้ยงเซลล์ในลักษณะสองมิติ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยตัวนำส่ง เซลล์จะสามารถยึดเกาะบนตัวนำส่งและเมื่อเวลาผ่านไปผิวภายนอกของตัวนำส่งเกิดการย่อยสลาย ทำให้เซลล์สามารถเข้าไปภายในโครงสร้างรูพรุนภายในตัวนำส่งและเจริญเติบโตในลักษณะสามมิติได้ เมื่อทำการทดลองโดยใช้เซลล์ในปริมาณเท่ากัน กลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับตัวนำส่งจะมีความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์ต่อพื้นที่น้อยกว่า เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตไปบนตัวนำส่งได้ ดังนั้นการวิเคราะห์ผลการทดลองนี้จึงไม่อาจเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงโดยมีตัวนำส่งและกลุ่มที่เพาะเลี้ยงโดยไม่มีตัวนำส่ง ได้โดยตรง

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.12 A พบว่า ในการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีตัวนำส่ง Col-1 มีการแสดงออกมากที่สุดเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนอื่นๆ ในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน สันนิษฐานได้ว่า เซลล์ MC3T3-E1 ในช่วงระยะเวลา 10 วัน ส่วนใหญ่จะอยู่ใน proliferation phase (อ้างอิงจากรูปที่ 2.5) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนดังกล่าว ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด เนื่องจากจำนวนตัวอย่างทำซ้ำมีน้อยเกินไป แต่แนวโน้มที่สังเกตได้คือ กลุ่มที่เติม DME เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเพียงครั้งเดียว มีการแสดงออกของ ALP ใกล้เคียงกลุ่มที่ไม่เติม DME (กลุ่มควบคุม) และมีการแสดงออกของ ALP และ OC มากกว่ากลุ่มที่เติม DME แบบต่อเนื่องทั้งที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.12 B พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงบนตัวนำส่งกับแบบไม่มีตัวนำส่ง โดยไม่เติม DME พบว่า กลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนตัวนำส่งทุกชนิดมีแนวโน้มการแสดงออกของยีน Col-1 และ ALP มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีตัวนำส่ง เนื่องจากกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนตัวนำส่งเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติแต่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับการเพาะเลี้ยงที่ไม่ใช้ตัวนำส่งซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ ทำให้ความหนาแน่นน้อยกว่าซึ่งส่งผลให้เซลล์ MC3T3-E1 สังเคราะห์ Col-1 และสันนิษฐานว่าพื้นผิวของตัวนำส่งนั้นส่งเสริมการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ ALP ของเซลล์ MC3T3-E1 สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Vachiraroj และคณะ (2009) ที่พบว่า ในวันที่ 4 และ 8 ของการเพาะเลี้ยง พื้นผิวที่เป็นเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยส่งเสริม



กิจกรรมเอนไซม์ ALP ของเซลล์ MC3T3-E1 [Vachiraroj et al., 2009] การแสดงออกของยีนของเซลล์ MC3T3-E1 ที่เพาะเลี้ยงบนตัวนำส่งทุกชนิดที่มี DME มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ มีการแสดงออกของยีน OPN สูงที่สุด แต่การแสดงออกของ OC น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มี DME สันนิษฐานในระยะเวลา 10 วัน DME ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากตัวนำส่ง สามารถส่งเสริมให้เซลล์ MC3T3-E1 เกิดการเปลี่ยนแปลงได้บ้าง แต่ไม่มากพอให้เข้าสู่ Mineralization phase เนื่องจาก DME มีผลลดการเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 (อ้างอิงจากผลการทดลองในข้อ 4.1.4) จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถขยายจำนวนจนมีความหนาแน่นมากพอให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ สอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 4.12 ก. ที่พบว่า ด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากัน กลุ่มที่เพาะเลี้ยงโดยมีการเติม DME มีการแสดงออกของ OC น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้การแสดงออกของยีนในผลการทดลองดังกล่าว ยังไม่สามารถสรุปได้เพราะจำนวนการทำซ้ำมีไม่เพียงพอให้หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างในการทดลองมีไม่เพียงพอ ทำให้ต้องรวมตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกันแล้ววิเคราะห์ผล PCR เพียงครั้งเดียว และไม่สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในแต่ละช่วงเวลาได้ เพราะฉะนั้นงานวิจัยในภายหน้า จึงควรมีการวางแผนการทดลองให้มีการเตรียมจำนวนตัวอย่างซ้ำให้มากขึ้นและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในหลายช่วงเวลา เพื่อจะเห็นการเปลี่ยนแปลง phase ต่างๆของเซลล์ได้ชัดเจนและเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาระบบควบคุมการปลดปล่อย DME ต่อไป

อย่างไรก็ตามผลการทดลองในช่วงก่อนหน้านี้นี้ พิสูจน์ได้ว่า DME มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 ไปเป็นกระดูก เนื่องจากในระยะเวลา 21 วัน สามารถพบการสังเคราะห์แคลเซียมในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME ได้ (รูปที่ 4.5) ซึ่งการสะสมแคลเซียมของเซลล์เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก จึงเป็นการยืนยันได้ว่า MC3T3-E1 มีการเปลี่ยนแปลงจากการเพาะเลี้ยงด้วย DME ที่สกัดจากฟันมนุษย์จริง

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกในประเทศที่ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดจากเนื้อฟันมนุษย์ (Dentin matrix extract; DME) และลักษณะสมบัติของ DME จากเนื้อฟันมนุษย์ ตลอดจนผลของ DME ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยพบว่าในการสกัด DME จากฟันมนุษย์นั้น มีค่าร้อยละผลได้อยู่ที่ 0.388 (น้ำหนักแห้ง) และ DME ที่สกัดได้ประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 55 - 72 กิโลดาลตัน โดยสันนิษฐานว่าเป็นกลุ่มเมทริกซ์โปรตีนที่เป็นกรด (acidic matrix protein) ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ในการตอบสนองของภาวะทางชีวภาพต่างๆ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เมื่อทำการวัดค่าศักย์ซีต้าของ DME พบว่า DME ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) พีเอช 7.5 มีค่าศักย์ซีต้าอยู่ที่  $-10.53 \pm 0.12$  มิลลิโวลต์ และ DME ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน พีเอช 5.5 มีค่าศักย์ซีต้าอยู่ที่  $-13.53 \pm 0.31$  มิลลิโวลต์ และจากการศึกษาผลของ DME ต่อการเจริญเติบโตของ MC3T3-E1 พบว่า ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรัมปกติ DME ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อจำนวนเซลล์ MC3T3-E1 ที่เวลา 72 ชั่วโมงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อความเข้มข้นของ DME มากขึ้นทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วง 48-72 ชั่วโมงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรัมน้อยกว่าปกติ (ร้อยละ 2) DME ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วง 48-72 ชั่วโมง (แตกต่างจากกลุ่มควบคุม) เมื่อศึกษาผลของ DME ต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ MC3T3-E1 พบว่า DME สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการสะสมแคลเซียมในระยะเวลา 21 วัน ได้ โดยไม่ต้องมีการใช้ Dexamethasone (Dex) และจากการศึกษาเปรียบเทียบผลของ DME ในอัตราส่วนต่างๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 โดยดูจากกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า DME ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALP มากกว่ากลุ่มที่ไม่มี DME อย่างมีนัยสำคัญ

การพัฒนาตัวนำส่ง DME ที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยเพื่อควบคุมการปลดปล่อย DME อย่างยั่งยืน (sustained release) มีการศึกษาลักษณะสมบัติของตัวนำส่ง

เจลาตินผสมไฟโบรอินใหม่ไทย ในอัตราส่วน เจลาติน:ไฟโบรอินใหม่ไทย (G:SF) เท่ากับ 100:0, 70:30, และ 50:50 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร พบว่ามีค่าน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นงานตัวนำส่งอยู่ที่  $13.28 \pm 0.50$ ,  $12.86 \pm 0.56$  และ  $11.36 \pm 0.63$  มิลลิกรัม ตามลำดับ และความหนาแน่นของตัวนำส่ง มีค่าเท่ากับ  $0.059 \pm 0.002$ ,  $0.068 \pm 0.003$ , และ  $0.069 \pm 0.004$  มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และมีค่าร้อยละในการดูดซับ PBS เท่ากับ  $90.43 \pm 0.29$ ,  $87.73 \pm 0.29$ , และ  $86.60 \pm 0.76$  ตามลำดับ แปรผกผันกับค่าความหนาแน่น ตัวนำส่งในงานวิจัยนี้ ถูกออกแบบมาให้สามารถเก็บกัก DME ด้วยกลไกทางประจุไฟฟ้า และปลดปล่อยด้วยกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ จากการศึกษาคงตัวของตัวนำส่งใน PBS พบว่า เมื่อมีการดูดซับ DME ในปริมาณที่เท่ากันคือ 100 ไมโครกรัมต่อตัวนำส่ง ตัวนำส่งน่าจะมีการปลดปล่อยสารทันที (burst release) ร้อยละ  $12.93 \pm 7.84$  ถึง  $21.42 \pm 1.18$  ในช่วงวันแรกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่เวลา 5 วัน ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินอย่างเดียวนั้นมีความสามารถในการคงตัวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินใหม่ไทย โดยมีการปลดปล่อยสารออกมาร้อยละ  $58.64 \pm 29.20$  ในขณะที่ตัวนำส่งที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินใหม่ไทย ทั้งสองชนิดมีการปลดปล่อยสะสมไม่ต่างจากวันแรก อัตราการย่อยสลายของตัวนำส่งด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ตัวนำส่ง G:SF 100:0 และ 70:30 มีค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) ประมาณ 40 และ 110 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ตัวนำส่ง G:SF 50:50 ย่อยสลายไปเพียงร้อยละ  $17.39 \pm 4.19$  ภายในระยะเวลา 120 ชั่วโมง จากการศึกษ้อัตราการปลดปล่อยภายนอกร่างกาย พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ตัวนำส่ง G:SF 100:0 และ G:SF 70:30 ปลดปล่อย DME ออกมาประมาณร้อยละ 67.07 และร้อยละ 50.60 ตามลำดับ และการปลดปล่อยสะสมค่อนข้างคงที่หลังเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่ตัวนำส่ง G:SF 50:50 ปลดปล่อย DME ออกมาเพียงเล็กน้อยในเวลา 24 ชั่วโมงแรก และที่ 48 ชั่วโมงสามารถวัดการปลดปล่อย DME สะสมได้เพียงร้อยละ 1.82 เท่านั้น จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงว่าเมื่ออัตราส่วนการผสมไฟโบรอินใหม่ไทยที่มากขึ้นในการผลิตตัวนำส่งนั้น จะส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยสาร DME ช้าลง DME สามารถยึดเกาะกับตัวนำส่งชนิด G:SF 50:50 ได้ดีที่สุด เนื่องจากความแตกต่างของประจุ ตัวนำส่งชนิด G:SF 50:50 มีอัตราการย่อยสลายที่ช้าที่สุด และเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (gene expression) ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบแนวโน้มที่สังเกตได้คือ กลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยมีการเติม DME เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพียงครั้งเดียว มีการแสดงออกของ ALP ใกล้เคียงกลุ่มที่ไม่เติม DME (กลุ่มควบคุม) และ

มีการแสดงออกของ ALP และ OC มากกว่ากลุ่มที่เติม DME แบบต่อเนื่องทั้งที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนตัวนำส่งทุกชนิดมีแนวโน้มการแสดงออกของยีน Col-1 และ ALP มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีตัวนำส่ง และการแสดงออกของยีนของกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนตัวนำส่งทุกชนิดที่มี DME มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ มีการแสดงออกของยีน OPN สูงกว่ายีนอื่นๆ แต่มีการแสดงออกของ OC น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มี DME ทั้งนี้การแสดงออกของยีนในผลการทดลองดังกล่าว ยังไม่สามารถสรุปได้เพราะจำนวนการทำซ้ำมีไม่เพียงพอให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างในการทดลองมีไม่เพียงพอทำให้ต้องรวมตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกันแล้ววิเคราะห์ผล PCR เพียงครั้งเดียว และไม่สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในแต่ละช่วงเวลาได้

จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ชัดว่า DME ที่สกัดจากเนื้อพืชมมนุษย์ด้วยวิธีที่ผู้วิจัยใช้ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC3T3-E1 ไปเป็นเซลล์กระดูกได้ มีการสะสมแคลเซียมของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม DME ได้ ในระยะเวลา 21 วัน ซึ่งการสะสมแคลเซียมของเซลล์เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก ตัวนำส่งเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยที่ผลิตด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งและใช้กลูตาโรลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุผลิตตัวนำส่ง DME ที่สกัดได้ โดยอัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ใช้ผลิตตัวนำส่ง ส่งผลให้อัตราการปลดปล่อย DME แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้นำไปใช้ว่า ต้องการปลดปล่อย DME ในระยะเวลานานเท่าใด โดยเบื้องต้นนี้ ผู้วิจัยคาดหวังให้การปลดปล่อย DME ดำเนินไปในช่วง 3 สัปดาห์ เพื่อใช้ร่วมกับการรักษาอาการบาดเจ็บของกระดูกในช่วงการเกิด Hematoma ถึง ช่วงการเกิด Soft callus เพื่อช่วยกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกแข็งต่อไป

งานที่ควรทำต่อไป คือ 1. การวิเคราะห์ผลของ DME ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในหลายช่วงเวลาเพื่อจะเห็นการเปลี่ยนแปลง phase ต่างๆของเซลล์ได้ชัดเจน 2. การวางแผนการทดลองให้มีการเตรียมจำนวนตัวอย่างซ้ำให้มากขึ้นเพื่อให้สามารถสรุปผลการทดลองได้แน่ชัด และ 3. การทดสอบระบบควบคุมการปลดปล่อย DME นี้ในสัตว์ทดลอง

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

รุสนี กุลวิจิตร. ทำไมจึงต้องเป็นศัลยศาสตร์. [ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา:  
<http://share.psu.ac.th/blog/zeta/7345> [15 กรกฎาคม 2555]

วาสนา สุขุมศิริชาติ. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน ด้วยเทคนิค Electrophoresis, Southern, Northern, Western blot hybridization [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://elearning.medicine.swu.ac.th/edu/images/stories/electrophoresis.pdf> [15 กรกฎาคม 2555]

สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก และ วินัย พากเพียร. วิทยาศาสตร์การแพทย์ของกระดูกเซลล์ต้นกำเนิดและวิศวกรรมเนื้อเยื่อ. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

สุรีย์พร บุญจง. Biochemical Bone Markers in Clinical practices. ใน Third Phramongkutklo Menopause Training Course, หน้า 1-4. 8-9 กุมภาพันธ์ 2545 ณ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า กรุงเทพมหานคร, 2545.

### ภาษาอังกฤษ

Advameg, Inc. How products are made - How gelatin is made. [Online]. 2012. Available from : <http://www.madehow.com/Volume-5/Gelatin.html> [2012, May 15]

Aubin, J.E., Principles of Bone Biology, 3rd Edition. Toronto: Academic Press Inc., 2008.

Baker, C., and Fernandes, K. Bone Ossification & Growth Answers. [Online]. 2008. Available from : <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/bone/answers/index.htm> [2012, May 15]

Biman, B.M., Jasdeep, K.M., and Kundu, S.C. Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. European Journal of Pharmaceutical Sciences 37 (2009): 160–171.

Bomers, G.N., and McCombs, R.B. Measurement of total alkaline phosphatase activity. Clinical Chemistry 21 (1975): 1988-1995.

- Bryan, H.D., Tortora, and Gerard, J. Principles of anatomy and physiology. New York: Wiley, 2005.
- Butlet, W.T., and Ritchie, H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. International Journal of Developmental Biology 39 (1995): 169-179.
- Carson, F. Histotechnology: A Self-Instructional Text, (1990): 226-227,
- Chamchongkaset, J., Kanokpanont, S., Kaplan, D.L., and Damrongsakkul, S. Modification of thai silk fibroin scaffolds by gelatin conjugation for tissue engineering. Advanced Materials Research 55-57 (2008): 685-688
- Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., and Cory, J.G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer communications 3 (1991): 207–212
- Curran, J.M., Chen, R., and Hunt, J.A. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. Biomaterials 27 (2006): 4783–4793.
- Darling, D. Bone. [Online]. Available from : <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/B/bone.html> [2012, May 15]
- Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8 (2006): 315-317.
- Donzelli, E., Salvade, A., Mimo, P., Vigano, M., Morrone, M. Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M. and Tredici, G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. Archives of oral biology 52 (2007): 64-73.
- Duthie, R.B., and Bentley, G. Mercer's Orthopaedic Surgery. 8<sup>th</sup> ed. London: Butler and Tanner, 1983.

- Eun, S.G., David, J.F., Samuel, M.H., and Richard, J.S.. Silk fibroin membranes from solvent-crystallized silk fibroin/gelatin blends: Effects of blend and solvent composition. Materials Science and Engineering 27 (2007): 426–431.
- FAO. CHARACTERISTICS OF THE COCOON. [Online]. 2012. Available from : <http://www.fao.org/docrep/x2099E/x2099e03.htm> [2012 May 23]
- Fulks, J. Chapter 4 - Bacterial Growth. [Online]. 2010. Available from : [http://www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/4\\_LectureGrowth.htm](http://www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/4_LectureGrowth.htm) [2012 May 23]
- GEA Group. Spray Drying of Blood and Gelatin (Animal). [Online]. 2012. Available from : [http://www.niroinc.com/food\\_chemical/spray\\_drying\\_gelatin.asp](http://www.niroinc.com/food_chemical/spray_drying_gelatin.asp) [2012 May 23]
- Gellynck, K., et al. Biocompatibility and biodegradability of spider egg sac silk. Journal Material Science: Mater Med 19 (2008): 2963–2970.
- Hofmann, S., et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. Biomaterials 28 (2007): 1152-1162.
- Hori, K., et al. Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. Journal of Controlled Release 118 (2007): 169–176.
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H., and Tabata, Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptideamphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. Biomaterials 27 (2006): 5089–5098.
- Hwang, Y.S., et al. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. Biomaterials 30 (2009): 499-507.

- IHC World Team. Alizarin Red S Staining Protocol for Calcium [Online]. 2003. Available from : [http://www.ihcworld.com/\\_protocols/special\\_stains/alizarin\\_red\\_s.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/alizarin_red_s.htm) [2010 March 30]
- Jetbumpenkul, P., Amornsudthiwat, P., Kanokpanont, S., and Damrongsakkul, S. Balanced electrostatic blending approach - An alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold. International Journal of Biological Macromolecules 50 (2012): 7– 13.
- Kalajzic, I., et al. Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. Bone 35 (2004): 74-82.
- Kang, H.W., Tabata, Y., and Ikada, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 20 (1999): 1339-1344.
- Khadidja, D., Biomimetics in industrial design: Bone tissue engineering [Online]. 2011. Available from : <http://khadidjad.wordpress.com/2011/11/07/biomimetics-in-industrial-design-bone-tissue-engineering/> [2012 May 21]
- Kim, H.J., Kim, U.J., Novakovic, G.V., Min, B.H., and Kaplan, D.L. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. Biomaterials 26 (2005): 4442-4452.
- Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M., and Kaplan, D.L. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. Biomaterials 26 (2005): 2775–2785.
- Langer, R. Tissue engineering. Molecular Therapy 1, (2000): 12-15.
- Lennon, D.P., et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. Experimental Cell Research 219 (1995): 211-222.
- Lian, J.B., et al. Species-Specific Glucocorticoid and 1,25-Dihydroxyvitamin D Responsiveness in Mouse MC3T3-E1 Osteoblasts: Dexamethasone Inhibits



- Osteoblast Differentiation and Vitamin D Down-Regulates Osteocalcin Gene Expression. Endocrinology 138 (1997): 2117-2127.
- Lien, S.M., Li, W.T. and Huang, T.J. Genipin-Crosslinked Gelatin Scaffolds for Articular Cartilage Tissue Engineering with a Novel Crosslinking Method. Material Science and Engineering: C. (2008): 36-43.
- Loren, W. SDS Page Gel Electrophoresis [Online]. 2001. Available from : [http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse\\_Information/4581/techniques/gel\\_elect/page\\_protein.html](http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html) [2012, May 23]
- Marieb, K.H., and Elaine N. Human Anatomy & Physiology (7th Edition), San Francisco: Benjamin Cummings.
- Masaru, M. Bone Engineering Using Human Demineralized Dentin Matrix and Recombinant Human BMP-2, Journal of Hard Tissue Biology 14 (2005): 80-81.
- Meinel, L., et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. Biomaterials 26 (2005): 147–155.
- Mizutani, H., Mera, K., Ueda, M., and Iwata, H. A study of the bone morphogenetic protein derived from bovine demineralized dentin matrix. Nagoya Journal of Medical Science 59 (1996): 37-47.
- Moorehead, w.r., and Biggs, H.G. 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. Clinical Chemistry 20 (1974): 1458.
- Netter, F.H. Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders. Summit, New Jersey: Ciba-Geigy Corporation. 1987.

- Okamoto, T., et al. Slow release of bone morphogenetic protein 2 from a gelatin sponge to promote regeneration of tracheal cartilage in a canine model. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 127 (2004): 329-334.
- Okhawiia, M., Rangkupan, R., Kanokpanont, S., and Damrongsakkula, S. Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications. International Journal of Biological Macromolecules 46 (2010): 544-550.
- Orthofix Holdings Inc. PEMF Bone Growth Stimulation [Online]. 2010. Available from : [http://www.bonestimulation.com/physio/how\\_it\\_works.html](http://www.bonestimulation.com/physio/how_it_works.html) [2009, May 21]
- Patel, Z., Yamamoto, M., Ueda, H., Tabata, Y., and Mikos, A.G. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. Acta Biomaterialia 4 (2008): 1126–1138.
- Peter, X.M., Scaffolds for tissue fabrication. Materials today (2004): 30-40
- Sang, B.L., Hyun, W.J., Young, W.L., Young, M.L., Kang, W.S., Moon, H.P., Young, S.N. and Hee, C.A. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1→3), (1→6)- $\beta$ -glucan. Biomaterials 24 (2003): 2503-2511
- Sang, B.L., Yong, H.K., Moo, S.C., Seung, H.H. and Young, M.L. Novel porous gelatin scaffolds by overrun/particle leaching process for tissue engineering applications. Biomaterials 26 (2005): 1961-1968
- Sardone, L.D., The Effect of Rosiglitazone on Bone Quality in a Rat Model of Insulin Resistance and Osteoporosis. Master's Thesis, Department of Laboratory Medicine and Pathobiology University of Toronto, 2010.
- Sautier, J.M., Nefussi, J.R., and Forest, N. In vitro differentiation and mineralization of cartilaginous nodules from enzymatically released rat nasal cartilage cells. Biology of the Cell 78 (1993): 181-189

Studio Dentaire. Dentin. [Online]. 2011. Available from:

<http://www.studiodentaire.com/en/glossary/dentin.php> [2012, May 23]

Tabata, Y., and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 31 (1998): 287–301

Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce BCA Protein Assay Kit Instructions. Rockford, IL: Pierce Biotechnology, 2011

Vachiraroj, N., Ratanavraporn, J., Damrongsakkul, S., Pichyangkura, R., Banaprasert, T., and Kanokpanont, S. A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on in vitro biocompatibility for bone substitutes. International Journal of Biological Macromolecules 45 (2009): 470–477

Wang, J., de Boer, J., de Groot, K. Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 Cells on Calcium Phosphate/Chitosan Coatings. Journal of Dental Research 87 (2008): 650-654

Wagner, K. Bioinformatics: Protein purifications. [Online]. 2002. Available from : [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html) [2012, May 23]

Waterborg, J.H. The Lowry Method for Protein Quantitation. In John M. Walker. The Protein Protocols Handbook, 2<sup>nd</sup> ed., 7-9 : Humana Press, 2002

White, B.A. PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic Engineering. Methods in Molecular Biology, Volume 67. Totowa: Humana Press Inc, 1997

Yongchaitrakul, T., and Pavasant, P. Effects of Dentin Matrix on Human Periodontal Ligament Cells Differentiation in vitro. The 12<sup>th</sup> Special CU-af Seminar (2004): 59-66

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis คือ เทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุล โดยใช้สาร Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) เป็นสารลดแรงตึงผิวประจุลบ (anionic detergent) มีความสามารถจับกับสายโซ่พอลิเปปไทด์ด้วยอัตราส่วน SDS 1.4 กรัม ต่อ สายโซ่พอลิเปปไทด์ 1 กรัม ได้ผลิตภัณฑ์เป็น SDS-polypeptide complex ประจุของ SDS ไปบดบังประจุของโปรตีน ทำให้ค่าประจุของ SDS-polypeptide complex นี้จะเป็นลบไม่ว่าจะเป็นโปรตีนชนิดใดก็ตาม และมีอัตราส่วนของประจุต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุคงที่เท่ากัน จึงสามารถนำไปเข้าสู่กระบวนการ Polyacrylamide Gel Electrophoresis ได้เนื่องจากทุกพอลิเปปไทด์คอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือเข้าหาขั้วประจุบวก เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของพอลิเปปไทด์ตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของพอลิเปปไทด์ตัวอย่างได้ [วาสนา สุขุมศิริชาติ : online]

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว สามารถใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนที่น้อยระดับไมโครกรัมได้ สารผสมโปรตีนที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลต้องถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ โดยให้ความร้อนที่ 100°C และมีการใช้สารไรโธล (thiol) ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reducer) สลายพันธะไดซัลไฟด์ สารไรโธลที่นิยมใช้คือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) และไดไธไธอริทอล (dithiothreitol; DTT) DTT มีข้อดีคือไม่มีกลิ่นและเป็นตัวรีดิวซ์ ที่ให้ผลเท่ากับ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

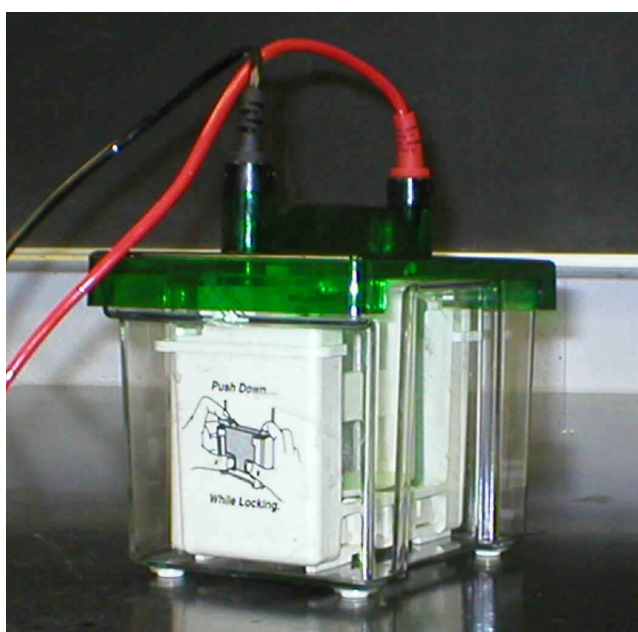
#### **อุปกรณ์และสารเคมี**

- สำหรับเตรียม Separating gel จำนวน 1 แผ่น
  - 30% Acrylamide 1.625 มิลลิลิตร
  - 10% Sodium dodecyl sulfate; SDS 50 ไมโครลิตร
  - 10% Ammonium persulfate; APS (ต้องเตรียมใช้ใหม่ทุกครั้ง) 50 ไมโครลิตร
  - Tetramethylethylenediamine; TEMED 6 ไมโครลิตร
  - 1.5 M Trisamine; Tris (pH 8.8) 1.25 มิลลิลิตร

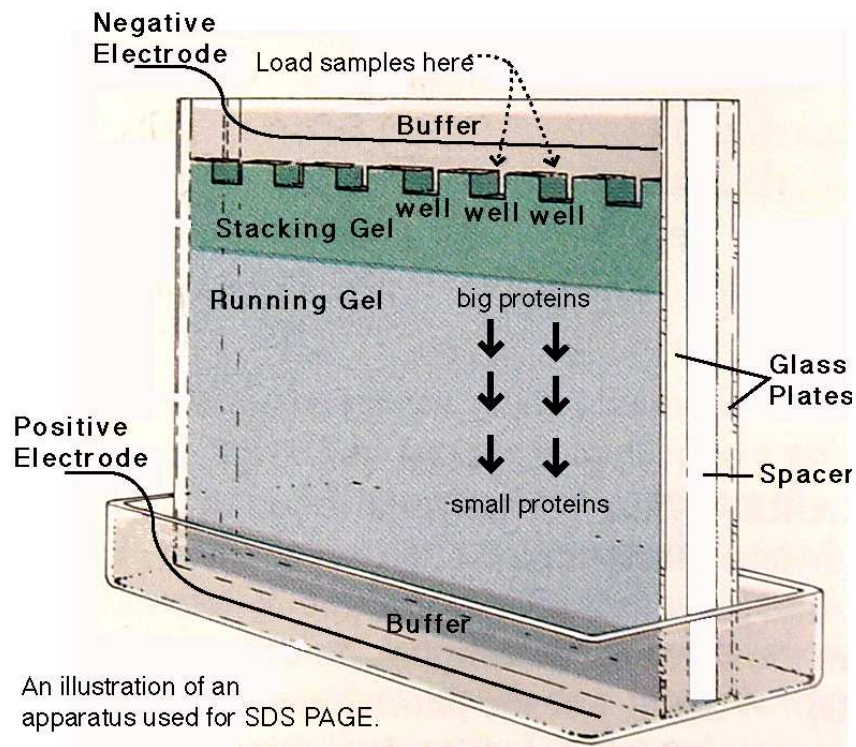
- Double distilled water; ddH<sub>2</sub>O 2.05 มิลลิลิตร
- สำหรับเตรียม Stacking gel จำนวน 1 แผ่น
  - 30% Acrylamide 0.325 มิลลิลิตร
  - 10% SDS 25 ไมโครลิตร
  - 10% APS (ทำใหม่ทุกครั้ง) 15 ไมโครลิตร
  - TEMED 4 ไมโครลิตร
  - ddH<sub>2</sub>O 1.525 มิลลิลิตร
  - 1 M Trisamine (pH 6.8) 0.65 มิลลิลิตร
- SDS Running Buffer ความเข้มข้น 5 เท่า (5x) 1 ลิตร:
  - Trisamine 15 กรัม
  - Glycine 72 กรัม
  - SDS 5 กรัม
  - ddH<sub>2</sub>O
- การย้อมสี Coomassie Blue:
  - 10% (v/v) acetic acid
  - 0.006% (w/v) Coomassie Blue dye
  - 90% ddH<sub>2</sub>O
- Isopropanol Fixing Solution:
  - 10% (v/v) acetic acid
  - 25% (v/v) isopropanol
  - 65% ddH<sub>2</sub>O
- SDS sample loading buffer 40 มิลลิลิตร:
  - ddH<sub>2</sub>O 16 มิลลิลิตร
  - 0.5 M Trisamine (pH 6.8) 5 มิลลิลิตร
  - 50% Glycerol 8 มิลลิลิตร
  - 10% SDS 8 มิลลิลิตร
  - 2-mercaptoethanol 2 มิลลิลิตร (เติมก่อนการใช้ทันที)
  - bromophenol blue
- 10% (v/v) acetic acid

## วิธีการ

1. เตรียม polyacrylamide gel โดยเตรียมส่วน Separation gel เเทลงใน SDS-page apparatus แล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวเป็นเวลาประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นเทส่วนที่เป็น Stacking gel ลงไปแล้วเสียบหัวแบ่งช่อง (Stacking slot comb) ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอีกประมาณ 15 นาที จึงดึงหัวแบ่งช่องออก
2. หยอดสารตัวอย่างลงในแต่ละช่องของเจล (หยอดสาร standard protein เพื่อเป็นตัวเทียบในช่องแรกของเจล) จากนั้น เติม 1x SDS Running Buffer ให้ท่วมเจล และรันเจล ที่ 200 V 80 mA เป็นเวลา 45 นาที
3. นำเจลออกมาวางในกล่องพลาสติก เท isopropanol fixing solution ให้ท่วมแผ่นเจล แล้วเขย่าด้วย shaker ที่อุณหภูมิต่ำ (ถ้าเจลหนา 0.75 มม. ใช้เวลา 10-15 นาที ถ้าเจลหนา 1.5 มม. ใช้เวลา 30-60 นาที)
4. เท fixing solution ออก แล้วเติม Coomassie blue staining solution ลงไปให้ท่วมเจล แล้วเขย่าด้วย shaker ที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. เท staining solution ออก แล้วเติม 10% acetic acid ลงไป แล้วทำการเขย่าด้วย shaker ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการล้าง staining solution ส่วนเกินออกจากเจล

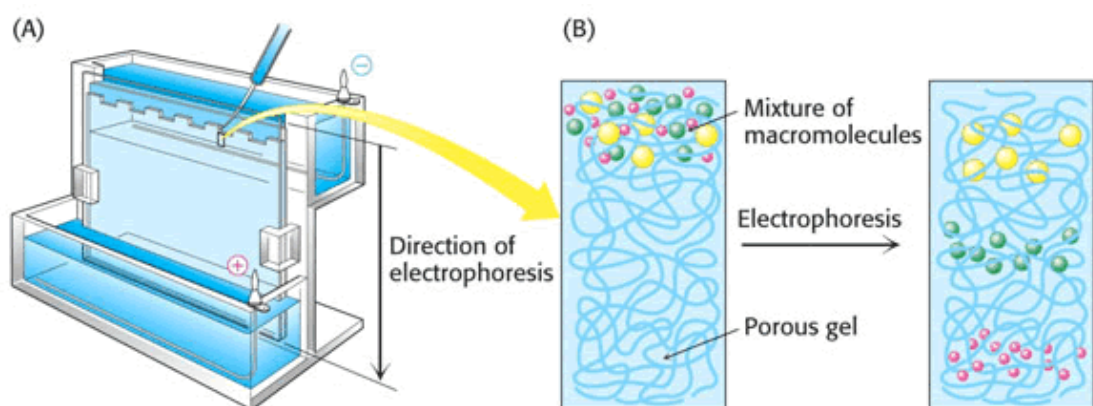


รูปที่ ก.1 เครื่อง SDS-PAGE apparatus (Biorad, USA)



รูปที่ ก.2 หลักการทำงานของเครื่อง SDS-PAGE apparatus (Biorad, USA)

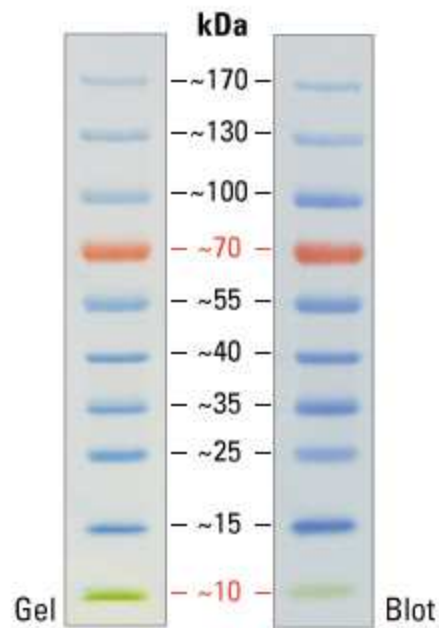
[Williams., 2001 : online]



รูปที่ ก.3 หลักการแยกโปรตีนของ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

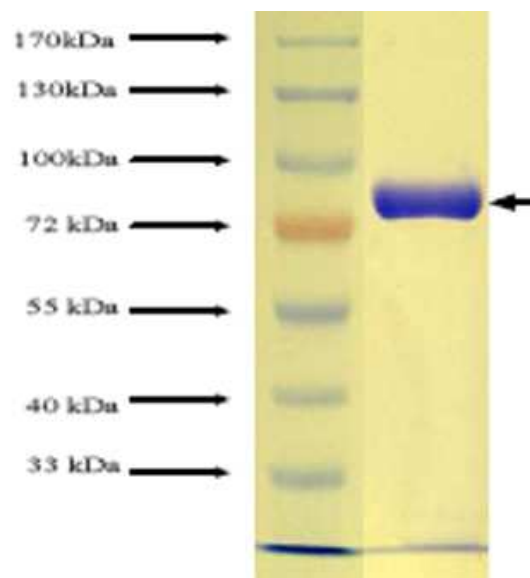
[Wagner., 2003 : online]





รูปที่ ก.4 ตัวอย่างแถบสีของโปรตีนมาตรฐานในการทำ SDS-PAGE

[Thermo Fisher Scientific Inc., 2012 : online]



รูปที่ ก.5 ตัวอย่างการเทียบแถบสีของโปรตีนที่ต้องการศึกษากับโปรตีนมาตรฐาน

ในการทำ SDS-PAGE [Abcam plc., 2012 : online]

## ภาคผนวก ข

### การวัดปริมาณเซลล์ด้วยวิธี MTT-assay

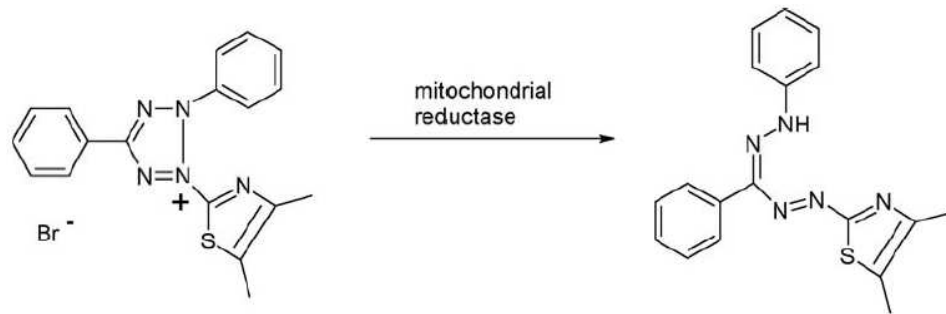
MTT-assay เป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสาร MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyltetrazolium bromide) ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) จึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร [Cory et al., 1991]

#### สารเคมีที่ใช้

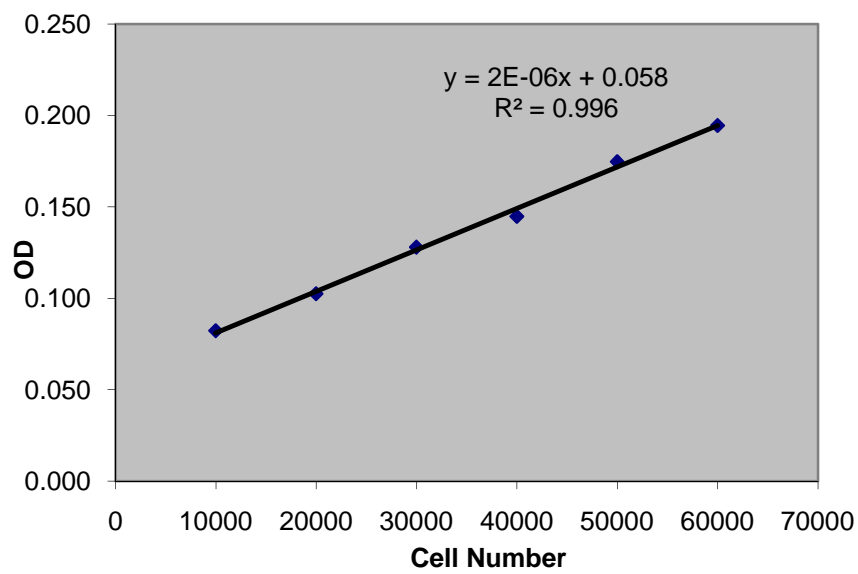
1. MTT powder
2. อาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มี Phenol red (Media without Phenol red)
3. 0.1 M Glycine buffer
4. DMSO

#### ขั้นตอนการทำ MTT assay ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24-well plate)

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากถาดเลี้ยงเซลล์ และล้างถาดเลี้ยงเซลล์ทุกหลุม 1 ครั้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อหลุม
2. เตรียมสารละลาย MTT โดยละลาย MTT powder ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มี Phenol red ในอัตราส่วน MTT 1 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลาย MTT ใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม
4. บ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
5. ดูดสารละลาย MTT ออกจากถาดเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นใส่สารละลาย Glycine buffer ผสม DMSO (125:900) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม เพื่อละลายสีภายในเซลล์ออกมา
6. เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 5 นาที เพื่อละลายสีออกจากเซลล์ให้หมด หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง absorbance microplate reader



รูปที่ ข.1 สาร MTT ถูกเปลี่ยนเป็น formazan product ด้วยกระบวนการ mitochondrial reductase [Cory et al., 1991]



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ MC3T3-E1 ด้วยวิธี MTT-assay

### ภาคผนวก ค

#### การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนทวีคูณ

คำนวณอัตราการเจริญเติบโต (growth rate;  $\mu$ ) ของเซลล์ และเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนจากเดิมเป็น 2 เท่า (population doubling time; PDT) ในช่วง Log phase ของรูปที่ ค.1 ด้วยสมการดังต่อไปนี้ [Roth, 2006]

$$\mu = \frac{1}{x_0} \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (1)$$

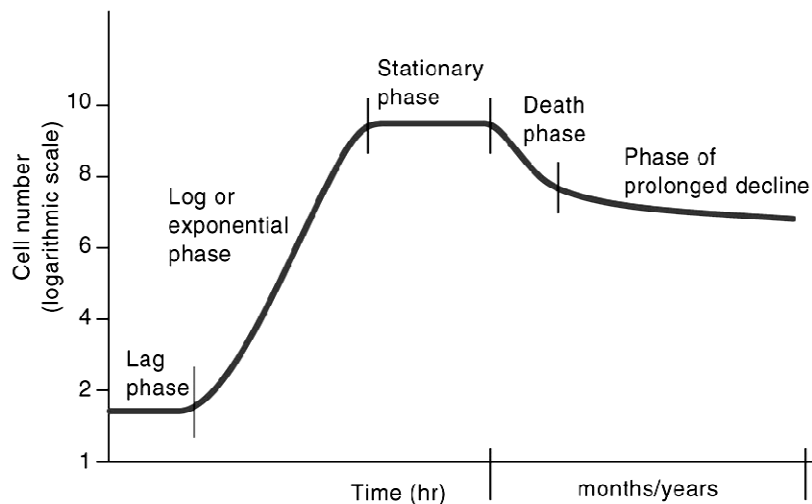
[hr<sup>-1</sup>]

$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots\dots (2)$$

[hr]

เมื่อ  $x_0$  คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้นในช่วง *log phase*

$\frac{dx}{dt}$  คือ จำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลา ในช่วง *log phase*



รูปที่ ค.1 ตัวอย่างกราฟแสดงช่วงต่างๆ ในการเจริญเติบโตของเซลล์ [Fulks, 2010 : online]

ตัวอย่างเช่น การเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดผสมซีรัม 10% โดยเลือก  
ช่วงเวลา log phase ที่เวลา 48 – 84 ชั่วโมง ดังรูป ค.2

ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีเซลล์จำนวน 36,687 เซลล์

ที่เวลา 84 ชั่วโมง มีเซลล์จำนวน 103,437 เซลล์

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต} \quad \mu = \frac{1}{x_0} \frac{dx}{dt}$$

$$\mu \int_{t_0}^t dt = \int_{x_0}^x \frac{1}{x} dx$$

$$\mu (t - t_0) = \ln x - \ln x_0$$

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$$

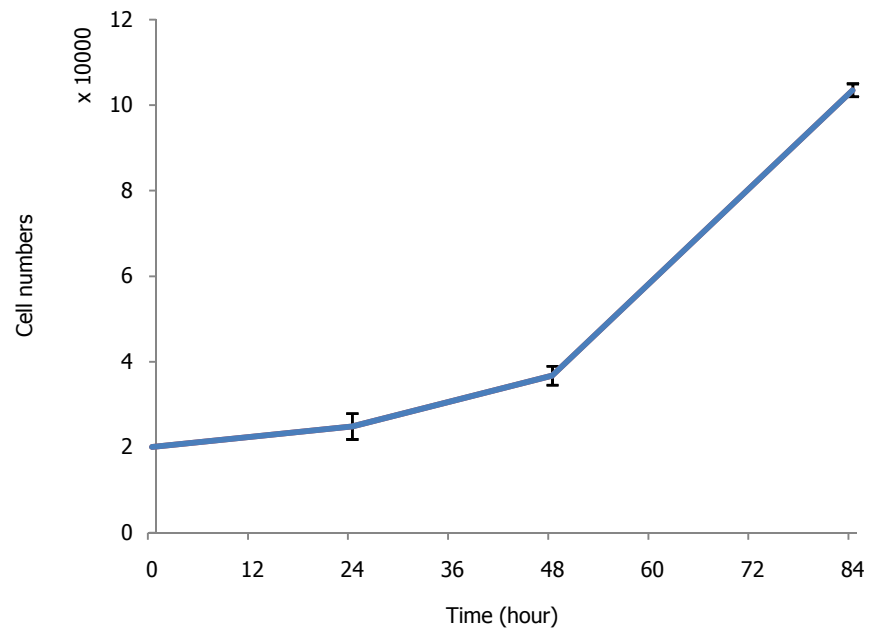
$$= \frac{\ln 103437 - \ln 36687}{84 - 48}$$

$$= 0.028793$$

$$\text{PDT} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$= \frac{\ln 2}{0.028793}$$

$$= 24.0735 \quad \text{ชั่วโมง}$$



รูปที่ ค.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ MC3T3-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมซีรัม 10%

## ภาคผนวก ง

### การวัดกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธี ALP assay

ALP assay เป็นวิธีการวัดปริมาณของเอนไซม์ ALP ซึ่งจะสร้างขึ้นในเซลล์กระดูก ทำโดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้ผนังเซลล์แตก ของเหลวที่อยู่ภายในถูกปล่อยออกมา ได้เป็น cell lysate โดยเอนไซม์จะอยู่ใน cell lysate นั้นด้วย เอนไซม์ ALP จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น p-Nitrophenyl phosphate โดยบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 3N NaOH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร [Bomers and McComb, 1975]

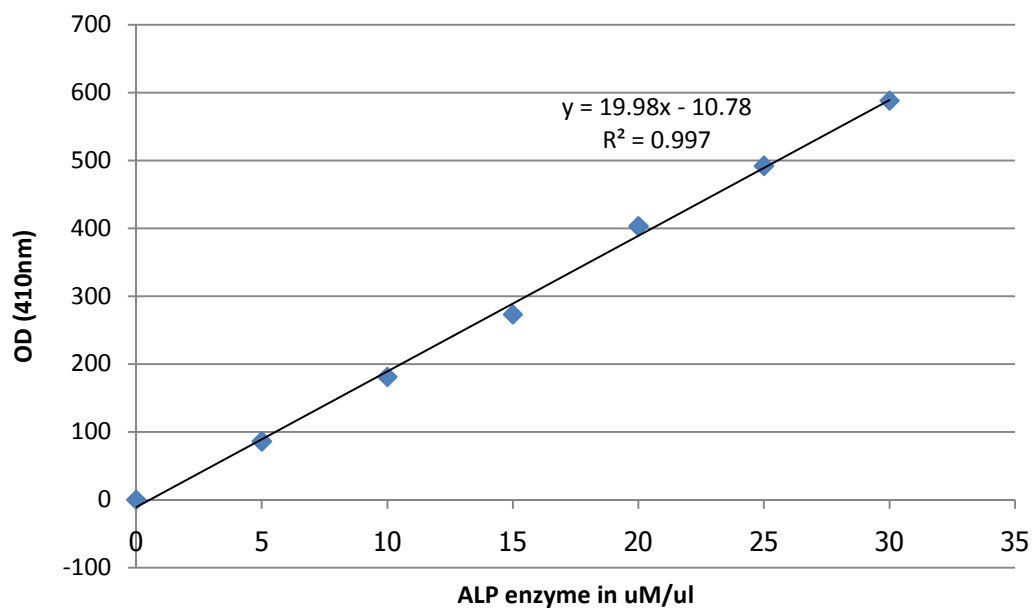
#### สารเคมี

- A. p-Nitrophenol standard solution (10 mM, Sigma, store at 4°C)
- B. p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (pNPP, Sigma, store at -20°C)
- C. 0.02 N NaOH
- D. SDS lysis buffer (Extract buffer)

#### วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ p-nitrophenol เจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 → 5 → 2.5 → 1.25 → 0.625 → 0.3125 → 0.15625 → 0.078125 มิลลิโมลาร์
2. สำหรับตัวอย่าง ล้างภาดเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นเติมสาร D. 1 มิลลิลิตรลงในภาดเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
3. ใช้หลุมว่างที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ในภาดเลี้ยงเซลล์นั้นเป็นตัวควบคุม
4. ปิเปตสารในข้อ 1-3 มา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate แล้วเติมสาร B. 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม C. 80 ไมโครลิตร เอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) จะเปลี่ยน pNPP ให้เป็น

p-Nitrophenol ได้สารสีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง absorbance microplate reader



รูปที่ ง กราฟมาตรฐานของการวัดกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ด้วยวิธี ALP-assay



## ภาคผนวก จ

### การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA-assay

BCA Protein Assay ใช้หลักการของปฏิกิริยาไบยูเรต (biuret reaction) คือปฏิกิริยารีดักชันของ  $\text{Cu}^{2+}$  ไปเป็น  $\text{Cu}^{1+}$  โดย  $\text{Cu}^{2+}$  ทำปฏิกิริยากับโปรตีนในสารละลายต่าง แล้ว  $\text{Cu}^{1+}$  จะทำปฏิกิริยากับ bicinchoninic acid ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 562 นาโนเมตร [Thermo Fisher Scientific Inc., 2011]

#### สารเคมี

1. BCA Solution (bicinchoninic acid, sodium carbonate, sodium tartrate, and sodium bicarbonate in 0.1 M NaOH, pH 11.25)
2. 4% Cupric Sulfate
3. BSA Standard (2 mg/ml)

#### ตาราง จ. การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA

Dilutions for standard assay			
Tube	Volume of BSA	Volume of diluent (DI water)	Final BSA concentration
1	250 $\mu\text{l}$ from 2 mg/ml solution	250 $\mu\text{l}$	1,000 $\mu\text{g/ml}$
2	250 $\mu\text{l}$ from tube 1	250 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{g/ml}$
3	250 $\mu\text{l}$ from tube 2	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{g/ml}$
4	300 $\mu\text{l}$ from tube 3	300 $\mu\text{l}$	125 $\mu\text{g/ml}$
5	400 $\mu\text{l}$ from tube 4	100 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{g/ml}$
6	0 (blank)	400 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{g/ml}$

#### การเตรียม BCA working reagent (WR)

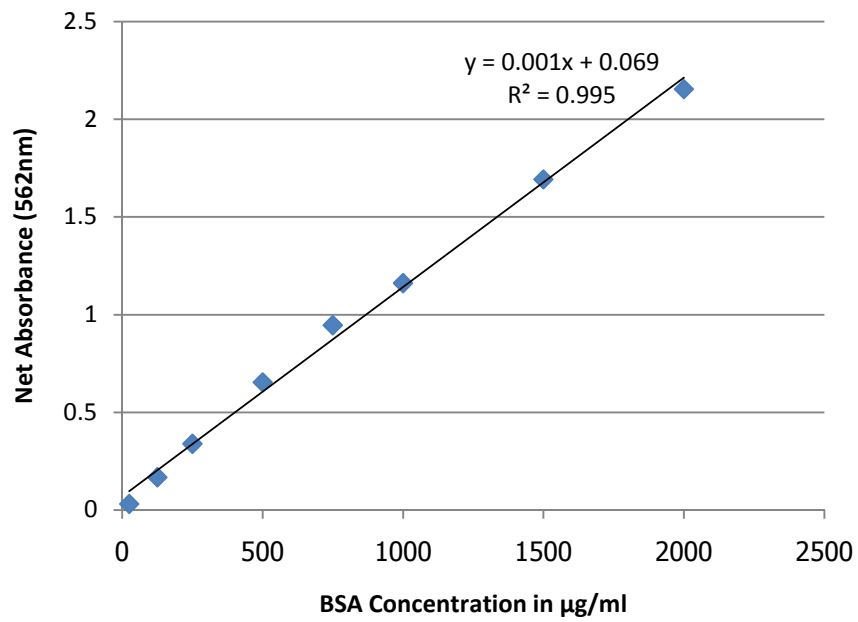
Working reagent เตรียมจากการผสม BCA solution 50 ส่วนต่อ 4% Cupric Sulfate 1 ส่วน

### การวัดค่ามาตรฐานโดยใช้ microplates

1. ปิเปตสารมาตรฐาน 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate
2. เติมสาร WR 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิดฝาแล้วนำไปเขย่าบนเครื่อง plate shaker เป็นเวลา 30 วินาที
3. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
4. ตั้ง 96-well plate ไว้ให้เย็นตัวลง ที่อุณหภูมิห้อง
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
6. นำค่าที่ได้มาทำเป็นแผนภาพกราฟมาตรฐาน BSA เพื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของโปรตีนอื่นๆที่จะวัด

### การวัดค่าของตัวอย่าง (ตัวอย่างวิธีการวัดค่าใน 6 cm plates หรือ T25 flask (25 cm<sup>2</sup>))

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างภาดเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS
2. เติมน้ำเย็นที่ปราศไออนอน 2 มิลลิลิตร ลงในภาดเลี้ยงเซลล์
3. ขูดเซลล์ให้หลุดลอกออกจากพื้นผิวภาดเลี้ยงเซลล์ด้วย cell scraper
4. ดูดสารละลายที่มีเซลล์อยู่ไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่แช่ในถังน้ำแข็ง
5. ทำการ Sonicate ที่ 30% amplitude เป็นเวลา 30 วินาที ต่อ 1 หลอด เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์
6. ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที
7. ดูดส่วนของเหลวที่ลอยอยู่ด้านบน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate และเติมน้ำปราศไออนอนปริมาตร 200 ไมโครลิตรเพื่อใช้เป็น blank
8. เติม pNPP 40 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
9. หยุดปฏิกิริยาด้วย 10 N NaOH ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม(ยกเว้น blanks)
10. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader



รูปที่ ๑ กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA)  
โดยใช้การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA-assay

## ภาคผนวก จ

### Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) หรือ RNA-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ RNA ที่ประกอบด้วยสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา reverse transcription (RT) เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA-cDNA) จากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอ โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) และปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์

Polymerase chain reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จาก ดีเอ็นเอต้นแบบ (cDNA) ที่ได้จากการทำ reverse transcriptase (RT) โดยจะสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย และใช้เวลาน้อย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง ดี เอ็น เอ ติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีน จาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (*in vitro* mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้คร่าวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ โดยปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ได้แก่

1. Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส
3. Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของ

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส [White, 1997]

### การสกัด RNA (RNA extraction)

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS)
2. ใส่สารละลาย Trizol 1 มิลลิลิตร ต่อจานเลี้ยงเซลล์ 3.5 เซนติเมตร (ถ้าเป็นภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ใช้ 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม) บ่มไว้อย่างน้อย 15 นาทีที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียสเพื่อให้เซลล์แตก
3. ชูดก้นภาชนะเลี้ยงเซลล์จนแน่ใจว่าเซลล์หลุดล่อนออกหมด บ่มไว้อีก 5 นาที ที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส เพื่อให้มั่นใจว่า เซลล์ทั้งหมดแตกตัวแล้ว หลังจากนั้นดูดสารผสมทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. เติม Chloroform 0.2 มิลลิลิตรต่อ 1 มิลลิลิตรของ Trizol ลงไป จากนั้นเขย่าด้วย vortex
5. บ่มที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 นาที
- 6.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายที่แยกเป็น 3 ส่วน
7. ดูดของเหลวที่อยู่บนสุดซึ่งเป็นส่วนที่มี RNA อยู่ใส่หลอดทดลองใหม่
8. ใส่สารละลาย Isopropanol 0.5 มิลลิลิตรต่อ 1 มิลลิลิตรของ Trizol แล้วเขย่าด้วย vortex
9. บ่มที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส จะเห็นผลึกลักษณะ Gel-like pellet ที่บริเวณก้นหลอดทดลอง
11. เทส่วนใสออก เพื่อเอาสารละลาย Isopropanol ออก
12. เติมสารละลาย 75% เอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ 1 มิลลิลิตรของ Trizol เพื่อล้างสารละลาย isopropanol ออกจากส่วนผลึก แล้วเขย่าด้วย vortex
13. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
14. เทส่วนใสออก และทิ้งให้แห้ง (รอจนส่วนผลึกค่อยๆ ไล่ขึ้น – ใช้ pipette tip ค่อยๆ ดูด และเขี่ยหยดน้ำออกมา อย่าให้ทิ้งให้แห้งหมด เพราะอาจจะลด solubility ของส่วนผลึกลง)
15. ทำละลายผลึก RNA ที่บริเวณก้นหลอดด้วย RNase-free water (DEPC water) ประมาณ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง

## การทำ Reverse transcriptase (RT)

### RT Master Mix ประกอบด้วย

1.	Improm-II 5x buffer	4 $\mu$ l / sample
2.	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 $\mu$ l/ sample
3.	dNTP mix 10 mM	1 $\mu$ l/ sample
4.	RNA seinh	0.5 $\mu$ l/ sample
5.	Improm-II Rev.	0.9 $\mu$ l/ sample
6.	Oligo	1 $\mu$ l/ sample

### ขั้นตอนการทำ Reverse transcriptase (RT)

1. วัดปริมาณ RNA ที่ถูกทำละลายใน DEPC water ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 โดยใช้ mixed sample ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
2. ผสม RNA sample กับ RT Master mix ที่ผสมไว้ตามอัตราส่วนที่กล่าวข้างต้น
3. บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 2 นาที
4. ได้ cDNA sample และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### ตารางที่ ๑.1 ส่วนประกอบในการทำ Polymerase chain reaction โดยชุด Taq DNA

Polymerase kit (Invitrogen, Brazil)

Components	Volume	Final Concentration
10X PCR buffer minus Mg	10 $\mu$ l	1X
10 mM dNTP mixture	2 $\mu$ l	0.2 mM each
50 mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l	1.5 mM
Primer mix (10 $\mu$ M each)	5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M each
Template DNA	1–20 $\mu$ l	n/a
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.2–0.5 $\mu$ l	1.0–2.5 units
Autoclaved distilled water	to 100 $\mu$ l	n/a

### การทำ Polymerase chain reaction (PCR) (Taq DNA Polymerase kit, Invitrogen, Brazil)

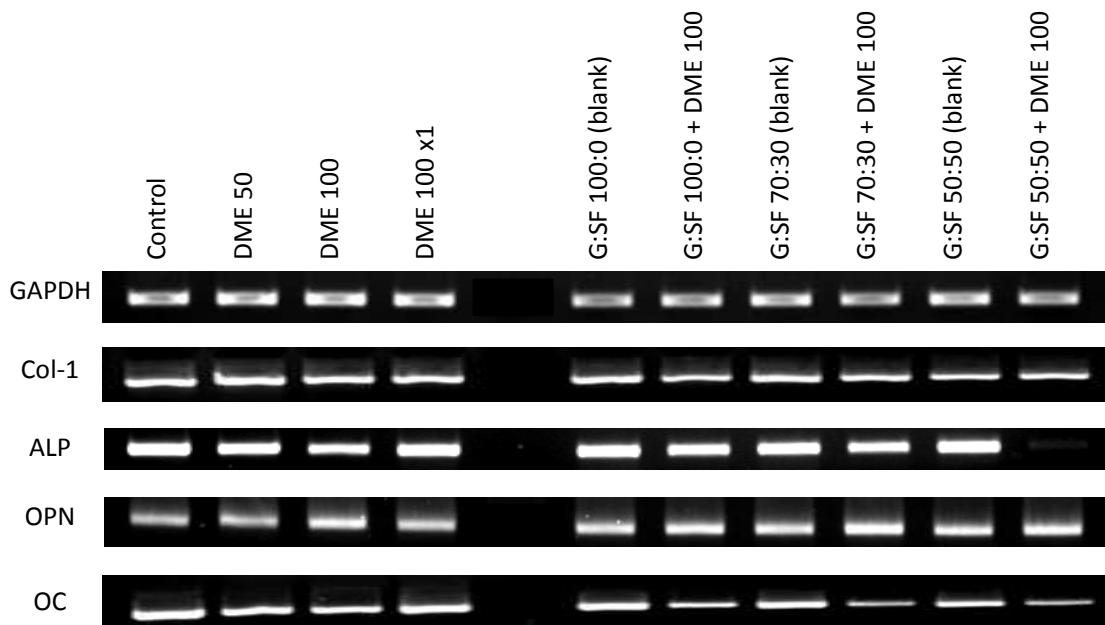
1. ผสมสารต่างๆ ดังตาราง ฉ.1 ลงใน sterile 0.5 ml microcentrifuge tube โดยวางอยู่บนน้ำแข็ง
2. นำ tube ของตัวอย่างทั้งหมด เข้าเครื่อง Thermal Cycler ยี่ห้อ Biometra รุ่น T-gradient (Germany) เพื่อทำการ PCR
3. เครื่อง Thermal Cycler จะทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อนจะเริ่มกระบวนการ PCR โดยในแต่ละ thermal cycle ประกอบไปด้วย
  - Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที
  - Anneal ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
  - Extend ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที
4. จำนวนรอบ Thermal cycle ขึ้นอยู่กับยีนแต่ละชนิด ตามตาราง ฉ.2

ตาราง ฉ.2 จำนวน Thermal cycle ในการทำ PCR ของยีนต่างๆ

ชื่อยีน	จำนวน Thermal cycle (รอบ)
Alkaline phosphatase (ALP)	35
Collagen type I (Col-1)	22
Osteopontin (OPN)	30
Osteocalcin (OC)	35
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	22

5. เตรียม agarose gel โดยละลาย agarose gel (DNA grade) 0.7 กรัม ใน TAE buffer (เข้มข้น 1 เท่า) 100 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายเป็นเวลา 2 นาที เติม Ethidium bromide 10 ไมโครลิตร
6. เท agarose gel ลงใน gel chamber ที่วางหวีแบ่งช่องไว้ แล้วปล่อยให้แข็งตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
7. ดึงหวีแบ่งช่องออกจาก agarose gel ที่แข็งตัวแล้วออกแล้ว จากนั้นเติม 1X TAE buffer ลงใน gel chamber ให้พอท่วม agarose gel

8. ผสม DNA 24  $\mu$ l กับ loading buffer (Fermentas, USA) 6  $\mu$ l ให้เข้ากัน แล้วเติมลงในแต่  
ละช่องของ agarose gel
9. ทำการรัน agarose gel electrophoresis ที่แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 17 นาที
10. วิเคราะห์แถบโปรตีนใน agarose gel ด้วยการถ่ายภาพภายใต้แสงยูวี



**รูปที่ ๑** รูปถ่ายภายใต้แสงยูวี แสดงแถบโปรตีนจากกระบวนการ agarose gel electrophoresis



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย วรสิทธิ์ อนุชिरาชีวะ เกิดที่จังหวัดชลบุรี ในวันที่ 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2529 สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในปี พ.ศ.2547 จากโรงเรียนกรุงเทพคริสเตียน วิทยาลัย กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขากายอุปกรณ์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2550 หลังจากจบ การศึกษาในระดับปริญญาบัณฑิตได้เข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเป็นผู้ช่วยวิจัย โครงการวิจัยระบบควบคุมการส่งผ่านสารสกัดจากเนื้อฟันเพื่อส่งเสริมการงอกใหม่ของกระดูก

### ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Warit Anuchiracheewa, Prasit Pavasant, and Sorada Kanokpanont , Gelatin / Fibroin Hydrogel for Controlled Release of Human Dentin Matrix Extract. *Advanced Material Research* 506 (2012): 505-508 (Online since April, 2012)

### ผลงานในการประชุมวิชาการ

- Warit Anuchiracheewa, Prasit Pavasant, and Sorada Kanokpanont, Gelatin / Fibroin Hydrogel for Controlled Release of Human Dentin Matrix Extract, Poster Presentation, Chiangmai International Conference on Biomaterials & Applications 2011 (CMICBA 2011), The Empress Hotel, Chiangmai, Thailand, 9-10 August 2011
- Warit Anuchiracheewa, Prasit Pavasant, and Sorada Kanokpanont, Effects of Gelatine/Fibroin Scaffold as a Carrier of Human Dentin Matrix on Pre-Osteoblast Cells, Poster Presentation, The 70th Anniversary Celebration 2010, Faculty of Dentistry Chulalongkorn University, Faculty of Dentistry Chulalongkorn University Bangkok Thailand, 12-14 August 2010

### รางวัลที่รับ

- The 3<sup>rd</sup> Prize Award of Conference Poster Competition in Chiangmai International Conference on Biomaterials & Applications 2011 (CMICBA 2011), The Empress Hotel, Chiangmai, Thailand, 9-10 August 2011
- ทุนวิจัย “โครงการวิจัยระบบควบคุมการส่งผ่านสารสกัดจากเนื้อฟันเพื่อส่งเสริมการงอกใหม่ของกระดูก” จากศูนย์ส่งเสริมการวิจัยในภูมิภาคเอเชียของมูลนิธิเกาหลี่เพื่อการศึกษาขั้นสูง ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย