

การประดิษฐ์และการศึกษาลักษณะของฟองน้ำคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสุกรผสม  
ไฮดรอกซีอะพาไทต์



นางสาวสุคันธา เผือกนาโพธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาเอ็นไอโอดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF PORCINE  
COLLAGEN/HYDROXYAPATITE SPONGE

Miss. Sukuntha Phuaknapho



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Operative Dentistry

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การประดิษฐ์และการศึกษาลักษณะของฟองน้ำคอลลาเจน  
ที่สกัดจากหนังสุกรมสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

โดย

นางสาวสุคันธา เผือกนาโพธิ์

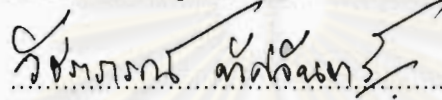
สาขาวิชา

วิทยาเอ็นโดคอนต์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

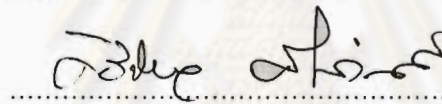
รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สมพร สวัสดิ์สรรพ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

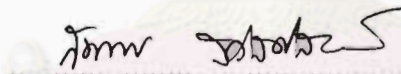


..... คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิงวัชรภรณ์ ทศจันทร์)

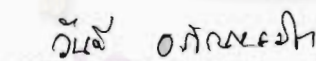
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



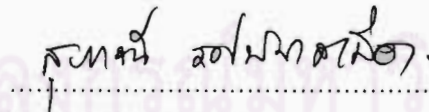
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สมพร สวัสดิ์สรรพ)



..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วันดี อภินหสมิต)



..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สุภาณี รัศมีมาสเมื่อง)

สุคันธา เมื่อนานาโพธิ์ : การประดิษฐ์และการศึกษาลักษณะของฟองน้ำคอลลาเจนที่สกัด  
จากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์. (FABRICATION AND CHARACTERIZATION  
OF PORCINE COLLAGEN/HYDROXYAPATITE SPONGE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ :  
รศ.ทพญ.ดร. สมพร สวัสดิ์สรพร, 89 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการสังเคราะห์และศึกษาลักษณะโครงค้ำยันคอลลาเจนที่  
สกัดจากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์สำหรับการนำไปใช้เป็นโครงค้ำยันในการชักนำให้เกิด  
การซ่อมแซมกระดูก คอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษานี้สกัดได้จากการละลายหนังสุกรในกรร่วมกับ  
เอนไซม์ และตกตะกอนด้วยเกลือ นำคอลลาเจนที่สกัดได้มาทำเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น  
ต่าง ๆ กัน 3 ความเข้มข้น แล้วผสมเข้ากับผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ทำการแช่แข็งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ  
ในการแช่แข็งแตกต่างกัน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทำให้อุณหภูมิต่ำลงอย่างช้า ๆ และกลุ่มที่ทำให้  
อุณหภูมิต่ำลงอย่างรวดเร็ว นำไปขึ้นรูปด้วยวิธีอบแห้งเยือกแข็ง จากนั้นทำให้โครงค้ำยัน  
คอลลาเจนคงตัวด้วยการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง ศึกษาลักษณะโครงสร้างโดยละเอียด ขนาดของรู  
พรุน ค่าการดูดน้ำ และการย่อยสลายของโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์ขึ้น ผลการศึกษาพบว่าโครงค้ำยัน  
ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ สีขาว และละลายน้ำได้อย่างรวดเร็วก่อนทำปฏิกิริยาเชื่อม  
ขวาง และเมื่อผ่านการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางแล้ว โครงค้ำยันมีความคงตัวมากขึ้น โครงค้ำยันที่  
สังเคราะห์จากคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุนไม่แตกต่างกัน  
อย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ในขณะที่โครงค้ำยันที่สังเคราะห์ภายใต้สภาวะแช่แข็งต่างกัน มี  
ขนาดของรูพรุนแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) และค่าการดูดน้ำของโครงค้ำยันที่เตรียมภายใต้สภาวะที่  
แตกต่างกันมีความแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) โครงค้ำยันที่สังเคราะห์ด้วยคอลลาเจนร้อยละ 2.5 แช่  
แข็งโดยลดอุณหภูมิต่ำลงอย่างรวดเร็วมีการย่อยสลายช้าที่สุด ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า  
คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังสุกร เมื่อนำไปผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ สามารถนำไปผลิตเป็น  
โครงค้ำยันที่คงตัวได้ด้วยวิธีอบแห้งเยือกแข็งร่วมกับการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง

ภาควิชา..... พันตกรรมหัตถการ.....  
สาขาวิชา..... วิชาเอ็นโดคอนต์.....  
ปีการศึกษา..... 2553.....

ลายมือชื่อนิสิต..... สุคันธา เมื่อนานาโพธิ์.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์..... สมพร สวัสดิ์สรพร.....

## 5176135132 : MAJOR ENDODONTOLOGY

KEYWORDS : PORCINE COLLAGEN SPONGE / HYDROXYAPATITE / SCAFFOLD  
FABRICATION / PORE SIZE / BIODEGRADATION

SUKUNTHA PHUAKNAPHO : FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF  
PORCINE COLLAGEN/HYDROXYAPATITE SPONGE. THESIS ADVISOR :  
ASSOC. PROF. SOMPORN SWADISON, 89 pp.

The objective of this study was to fabricate and characterize collagen scaffolds from porcine skin collagen mixed with hydroxyapatite for using as scaffolds in guided bone regeneration. The collagen used in this study was extracted from porcine skin by dissolving in acid-enzyme mixture and salt precipitation. Three different concentrations of the extracted collagen were mixed with hydroxyapatite. The mixtures were frozen under two conditions, slow and fast freezing conditions, then fabricated by lyophilization. The scaffolds were cross-linked to increase their stability. Ultrastructural characteristics, pore size, water absorption, and degradation of the scaffolds were studied. All collagen/hydroxyapatite scaffolds fabricated in this study were sponge-like, white, and easily dissolved in water before being cross-linked. The scaffolds became more stable after cross-linking. The mean pore size of scaffold prepared from different collagen concentrations were not statistically different ( $p > 0.05$ ) while the mean pore size of the scaffold prepared under different freezing conditions were different ( $p < 0.05$ ). Water absorption of scaffolds prepared from different conditions was also different ( $p < 0.05$ ). The scaffold fabricated from 2.5% collagen under fast freezing condition had the slowest degradation. The results suggested that porcine skin collagen mixed with hydroxyapatite can be fabricated to porous scaffold by freeze drying and cross-linking techniques.

Department : Operative Dentistry.....  
Field of Study : Endodontology.....  
Academic Year : 2010.....

Student's Signature *Sukuntha Phuaknapho.*  
Advisor's Signature *Somporn Swadison*

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันการศึกษาที่เป็นแหล่งประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สมพร สวัสดิ์สรรพ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ฉันทวัฒน์ สุทธิบุญพันธ์ ที่ให้คำปรึกษาและ ข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์ ประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วันดี อภินหสมิต รอง ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สุภาณี รัศมีมาสเมือง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องและแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาวิทยาเอ็นไอคอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ แนะนำแนวทางในการหาความรู้ ตลอดจน คุณธรรมจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณอาจารย์ไพพรรณ พิชานนท์ ที่ให้คำปรึกษาด้าน สถิติ ตลอดจนคำแนะนำทางสถิติ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.ริสา ชัยศุภรัตน์ สำหรับการตรวจสอบ โปรตีนที่สกัดได้จากหนังสุกร โดยวิธีฟอลิอะคริลามัดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยชีววิศวกรรมและ ทดสอบวัสดุทางการแพทย์ เจ้าหน้าที่วิจัยทันตวัสดุศาสตร์ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยชีวเคมี คณะทันต แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้ออุปการะสำหรับการทำ วิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ

ขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ และเพื่อน ๆ ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
คอลลาเจน.....	5
ไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	9
โครงค้ำยันที่ใช้ในการรักษาด้วยวิธีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ.....	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	15
การสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร.....	16
การตรวจสอบโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธีฟอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	19
การเตรียมโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	21
การทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	21
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	22
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	25
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	26

	หน้า
การตรวจสอบโปรตีนที่สกัดได้จากหนังสุกร.....	26
ลักษณะของโครงค้ำยันพองน้ำเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด ส่องกราด.....	27
ผลการวัดขนาดของรูพรุน.....	30
ผลการทดสอบการดูดน้ำ.....	35
ผลการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย.....	35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	41
สรุปผลการวิจัย.....	41
อภิปรายผลการวิจัย.....	41
ข้อเสนอแนะ.....	46
รายการอ้างอิง.....	48
ภาคผนวก.....	55
ภาคผนวก ก การวัดขนาดของรูพรุน.....	56
ภาคผนวก ข การทดสอบการดูดน้ำ.....	71
ภาคผนวก ค การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย.....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	89

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คำนวณฐานของเส้นรอบวงของรูปวงรีที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน.....	30
ตารางที่ 2 คำนวณฐานของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูปวงรีที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน.....	31
ตารางที่ 3 คำนวณฐานของพื้นที่ของรูปวงรีที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน.....	31
ตารางที่ 4 ร้อยละของการคูดน้ำของโครงค้ำยัน ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน.....	35


  
 ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	แผนภาพการตัดโมเลกุลของคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน..... 9
ภาพที่ 2	หนังสือกรที่หั่นเป็นชิ้นขนาด 1x3x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร..... 16
ภาพที่ 3	การปั่นหมุนหนังสือกรในสารละลายกรดที่ผสมเอนไซม์เปปซิน..... 17
ภาพที่ 4	สารละลายคอลลาเจนและตะกอนเศษเนื้อเยื่อที่เกิดจากการปั่นเหวี่ยง..... 17
ภาพที่ 5	ตะกอนเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ตกตะกอนสารละลายคอลลาเจน..... 18
ภาพที่ 6	ขั้นตอนการเตรียมคอลลาเจนจากผิวหนังสือกร..... 19
ภาพที่ 7	พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรไฟรีซิส ของสารละลายคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสือกร โดยวิธีการละลายในกรดร่วมกับเอนไซม์..... 26
ภาพที่ 8	ลักษณะทางกายภาพของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง..... 27
ภาพที่ 9	ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ แสดงลักษณะผนังของรูพรุนมีผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เกาะ..... 28
ภาพที่ 10	ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์แสดงลักษณะรูพรุนของโครงค้ำยัน..... 29
ภาพที่ 11	ค่าเฉลี่ยเส้นรอบวงของรูพรุนโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน..... 32
ภาพที่ 12	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน..... 33
ภาพที่ 13	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของรูพรุนโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน..... 34
ภาพที่ 14	การกระจายตัวของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนโครงค้ำยันในแต่ละกลุ่ม..... 34
ภาพที่ 15	การย่อยสลายของโครงค้ำยันเมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซโรไลน์ 1-3 สัปดาห์..... 37

ภาพที่ 16	การย่อยสลายของโครงค้ำยันเมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ไซไลน์ 4-6 สัปดาห์.....	38
ภาพที่ 17	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนักที่หายไปของโครงค้ำยันเมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ไซไลน์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	39
ภาพที่ 18	การย่อยสลายของโครงค้ำยันเมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 31.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ระยะเวลา 1 วัน.....	40



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการซ่อมแซมบาดแผลที่เกิดขึ้นกับกระดูก อาจเกิดได้ในลักษณะของการซ่อมแซมด้วยเนื้อเยื่อยึดต่อ (repair by connective tissue) หรือซ่อมแซมด้วยเนื้อเยื่อกระดูก ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่เนื้อเยื่อถูกทำลายได้เร็วที่สุด<sup>[1]</sup> โดยปกติแล้วเซลล์ของเนื้อเยื่อยึดต่อมักเคลื่อนมายังตำแหน่งที่เป็นบาดแผลได้เร็วกว่าเซลล์ชนิดอื่น และทำให้เกิดการซ่อมแซมบาดแผลด้วยเนื้อเยื่อยึดต่อหรือเนื้อเยื่อไฟบรัส (fibrous tissue) ซึ่งการหายของแผลในลักษณะนี้ เมื่อเกิดการติดเชื้อมักจะเกิดการหายอย่างรวดเร็ว<sup>[2]</sup> ด้วยเหตุดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีการรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้นกับกระดูกหลายวิธี เช่น การปลูกกระดูกโดยใช้กระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง หรือกระดูกที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น การปลูกกระดูกร่วมกับการใช้แผ่นเยื่อขวางกั้น (barrier membrane) เพื่อขัดขวางเซลล์ของเนื้อเยื่อยึดต่อไม่ให้เข้ามาในบริเวณบาดแผลและสนับสนุนการงอกใหม่ของกระดูกจากเซลล์กระดูกบริเวณใกล้เคียงที่เคลื่อนมายังบาดแผล นอกจากนี้ ในปัจจุบัน ยังมีการนำเอาวัสดุทางชีวภาพต่าง ๆ มาใช้เป็นโครงค้ำยัน (scaffold) ใส่ในบาดแผล เพื่อให้เป็นแนวทางสำหรับการเคลื่อนที่และเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกหรือเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ของเซลล์กระดูกเข้าไปยังบริเวณของบาดแผล และเกิดการซ่อมแซมด้วยกระดูกได้<sup>[3]</sup> วิธีการนี้จัดเป็น “วิศวกรรมเนื้อเยื่อ” (tissue engineering)<sup>[4]</sup> ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยพื้นฐาน 3 ประการ คือ เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณการทำงานระหว่างเซลล์ (morphogenic signals) และโครงค้ำยันที่เป็นที่ยึดเกาะของเซลล์

ลักษณะของโครงค้ำยันที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ควรมีคุณสมบัติเป็นโครงค้ำยัน 3 มิติที่สามารถส่งผ่านสัญญาณชักนำให้เซลล์มายึดเกาะ เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน<sup>[5]</sup> วัสดุที่นำมาสังเคราะห์เป็นโครงค้ำยันอาจเป็นวัสดุได้จากธรรมชาติ หรือจากสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม<sup>[6]</sup> โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากวัสดุธรรมชาติส่วนใหญ่มักทำขึ้นจากเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่เซลล์มีความคุ้นเคย ดังนั้นโครงค้ำยันชนิดนี้จึงมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ สามารถรองรับการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดี<sup>[7]</sup> แต่มีข้อเสียคือ ขาดความแข็งแรง ย่อยสลายง่าย ทำให้เกิดความยุ่งยากเมื่อนำไปใช้ในหัตถการหรือนำไปใช้จริงทางคลินิก<sup>[8]</sup> ส่วนโครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากวัสดุสังเคราะห์ เช่น กรดพอลิแลคติก (polylactic acid,

PLA) กรดพอลิไกลโคลิก (polyglycolic acid, PGA) มีข้อดี คือสามารถผลิตให้มีคุณสมบัติทางกลที่แข็งแรงและผลิตได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก<sup>[9]</sup> แต่มีข้อเสียคือ อัตราการย่อยสลายไม่เหมาะสม บางครั้งพบการแพร่กระจายของเซลล์อักเสบในบริเวณที่มีการสร้างเนื้อเยื่อไฟบรอสโรบวัสคูล<sup>[10]</sup>

โดยทั่วไปโครงค้ำยันที่ผลิตจากธรรมชาตินิยมผลิตจากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักของร่างกาย รวมทั้งเป็นเมทริกซ์หลักของเนื้อเยื่อกระดูก<sup>[11]</sup> คอลลาเจนที่นำมาประดิษฐ์โครงค้ำยันที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้ามักนำมาจากคอลลาเจนชนิดที่ I (type I collagen) ที่ได้จากสัตว์ เช่น วัว<sup>[12]</sup> และสุกร<sup>[13]</sup> ข้อดีของโครงค้ำยันที่ผลิตได้จากคอลลาเจน คือ มีลักษณะคล้ายคลึงกับเมทริกซ์นอกเซลล์และมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่ำ<sup>[14]</sup> สามารถกระตุ้นให้มีการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี ใช้ได้ดีกับบาดแผลในตำแหน่งต่าง ๆ ทั้งบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue)<sup>[15]</sup> และบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue)<sup>[16]</sup> อีกทั้งสามารถหาได้ง่ายจากธรรมชาติ และมีการย่อยสลายได้เอง แต่ข้อเสียของโครงค้ำยันคอลลาเจน คือ ขาดความแข็งแรง ย่อยสลายง่าย โครงค้ำยันคอลลาเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าส่วนใหญ่จึงมีการปรับปรุงคุณภาพให้เหมาะสมกับการใช้งานมากขึ้นด้วยการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง (cross linking) โมเลกุลของคอลลาเจน<sup>[17]</sup> ปฏิกิริยานี้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางโดยใช้พลังงานจากต้นกำเนิดภายนอก ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของโมเลกุล<sup>[18]</sup> เช่น การใช้ความร้อน (dehydrothermal) การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือการใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง เช่น กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde)<sup>[19]</sup> ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde)<sup>[20]</sup> สารเคมีทั้งสองชนิดนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูตาราลดีไฮด์เป็นพิษต่อเซลล์ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์และการหายของบาดแผลช้าลง เนื่องจากการปลดปล่อยกลูตาราลดีไฮด์ออกมาในระหว่างการย่อยสลายของคอลลาเจน<sup>[21]</sup> ปัจจุบันมีการแนะนำสารประกอบระหว่าง 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดอิมิด (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) และสารเอ็นไฮดรอกซีซัคซินไมด์ (N-hydroxysuccinimide, NHS) ซึ่งพบว่าสามารถช่วยให้โครงค้ำยันคอลลาเจนมีความคงตัวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์<sup>[22]</sup> โครงค้ำยันคอลลาเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า ส่วนใหญ่ผลิตจากเอ็นยึดกล้ามเนื้อและหนังของวัว<sup>[23]</sup> ซึ่งพบว่าการใช้เนื้อเยื่อจากวัวมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อน และอาจทำให้เกิดการติดเชื้อและแพร่กระจายของโรคควัวบ้า (Mad cow disease) ได้<sup>[24]</sup> การผลิตโครงค้ำยันในปัจจุบันจึงพยายามใช้คอลลาเจนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมาทดแทนคอลลาเจนจากวัว เช่น คอลลาเจนจากหนังสุกร<sup>[13]</sup> หนังปลาทะเล<sup>[25]</sup> และ เอ็นยึดกล้ามเนื้อม้า<sup>[26]</sup> เป็นต้น

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ เป็นสารอนินทรีย์ที่มีองค์ประกอบหลักคือแคลเซียมและฟอสเฟต มีสูตรโครงสร้างคือ  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  พบได้ในส่วนประกอบของกระดูกและฟันในมนุษย์ ด้วยลักษณะสมบัติที่มีความคล้ายคลึงกันกับส่วนประกอบของกระดูก จึงมีการนำไฮดรอกซีอะพาไทต์ มาผลิตเป็นโครงค้ำยันหรือเป็นส่วนประกอบของโครงค้ำยันสำหรับการซ่อมแซมกระดูก<sup>[27]</sup> มีการศึกษาพบว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อและสามารถเหนียวนำไปให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี<sup>[28]</sup> แต่ไฮดรอกซีอะพาไทต์เองมีความเปราะสูงและไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นโครงค้ำยันเดี่ยว จึงนิยมนำมาใช้ร่วมกับคอลลาเจนในการผลิตเป็นโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์<sup>[29]</sup>

จากปัญหาเกี่ยวกับการแพร่กระจายของโรคคว่ำบ้า จึงทำให้วัตถุดิบที่มาจากหนังสุกรเป็นทางเลือกที่ปลอดภัย ประกอบกับสุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่เลี้ยงกันแพร่หลายในประเทศไทย หนังสุกรจึงหาได้ง่ายและราคาไม่แพง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสังเคราะห์โครงค้ำยันคอลลาเจน ที่ได้จากคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสุกรผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ เพื่อนำมาใช้เป็นโครงค้ำยันสำหรับสนับสนุนการงอกใหม่ของกระดูกในการซ่อมแซมบาดแผลของกระดูก อันจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาทางทันตกรรมที่มีความเกี่ยวข้องกับการบาดเจ็บของกระดูก

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประดิษฐ์และศึกษาลักษณะของโครงค้ำยันคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำสำหรับการนำไปใช้เป็นโครงค้ำยันสำหรับการซ่อมแซมกระดูก
2. เพื่อนำเสนอนวัตกรรมอันนำไปสู่การค้นคว้าพัฒนาวัสดุทางทันตกรรมที่สามารถผลิตขึ้นใช้เองภายในประเทศ ทดแทนการนำเข้าวัสดุดังกล่าวซึ่งมีราคาแพงจากต่างประเทศอันเป็นการส่งเสริมนโยบายการพึ่งพาตนเอง และสอดคล้องกับปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง

### ขอบเขตของการวิจัย

1. สกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร โดยใช้วิธีการละลายในกรดร่วมกับเอนไซม์
2. ขึ้นรูปโครงค้ำยัน 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ ด้วยวิธีการทำให้แห้งโดยแช่แข็ง
3. ศึกษารูปร่าง ขนาดของรูพรุน และการย่อยสลายของโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์ขึ้น

### ข้อจำกัดของการวิจัย

โครงค้ำยันที่ผลิตได้ยังไม่สามารถนำไปใช้งานได้จริง เนื่องจากเป็นการประดิษฐ์ขั้นต้นในห้องปฏิบัติการ ต้องทำการศึกษาถึงความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ หรือสัตว์ทดลองก่อนนำไปใช้

### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

การเชื่อมขวาง

การประดิษฐ์โครงค้ำยัน

ขนาดของรูพรุน

คอลลาเจน

ไฮดรอกซีอะพาไทต์

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์จากหนังสือร่วมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์มาใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงคุณภาพการผลิตโครงค้ำยันให้มีคุณภาพที่ดีขึ้นเหมาะสมกับการนำไปใช้งานต่อไปในอนาคต
3. เป็นการนำเสนอนวัตกรรม อันนำไปสู่การค้นคว้าพัฒนาวัสดุทางทันตกรรมที่สามารถผลิตขึ้นใช้เองภายในประเทศ ทดแทนการนำเข้าวัสดุจากต่างประเทศ อันเป็นการส่งเสริมนโยบายการพึ่งตนเองและสอดคล้องกับปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง

### วิธีดำเนินการวิจัย

วิจัยเชิงทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

จุดมุ่งหมายของการรักษาคลองรากฟันที่ต้องมีการทำศัลยกรรมปลายรากร่วมด้วย ก็เพื่อกระตุ้นให้เกิดการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน ในบางกรณีการหายของรอยโรคไม่สามารถเกิดขึ้นได้โดยสมบูรณ์ถ้ารอยโรครอบปลายรากฟันมีขนาดใหญ่มาก ดังนั้นจึงมีการแนะนำวิทยาการใหม่ ๆ เพื่อช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่มีการสูญเสียไปมาก เช่น การรักษาโดยใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งการรักษาด้วยวิธีนี้ ประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐาน 3 ประการ คือ เซลล์ โครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ และโมเลกุลที่ช่วยส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ โดยโครงค้ำยันที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติมักเป็นโครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจน ซึ่งผลิตภัณฑ์ทางการค้าส่วนใหญ่มักเป็นโครงค้ำยันที่ทำมาจากคอลลาเจนจากวัว แต่เนื่องจากในปัจจุบันมีการรายงานถึงการติดเชื้อโรควัวบ้าในวัว จึงมีความพยายามที่จะผลิตคอลลาเจนจากสัตว์ชนิดอื่น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการนำเสนอการผลิตโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ที่สกัดจากหนังสุกรเพื่อทดแทนคอลลาเจนจากวัว เนื่องจากสุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่เลี้ยงกันแพร่หลายในประเทศไทย การได้มาซึ่งวัตถุดิบจากหนังสุกรจึงเป็นเรื่องที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่แพง โครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นเป็นการผสมคอลลาเจนเข้ากับไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นการสร้างกระดูก เพื่อให้ได้โครงค้ำยันสามมิติที่มีรูพรุนลักษณะคล้ายฟองน้ำ นอกจากนี้ยังทำการปรับปรุงโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้แข็งแรงขึ้นโดยใช้สารคาร์โบไดไฮไมด์อีกด้วย

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ และเป็นส่วนประกอบร้อยละ 30 ของมวลโปรตีนในร่างกาย พบได้ทั่วไป เช่น ที่ผิวหนัง กระดูก และฟัน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300 กิโลดาลตัน ความยาว 300 นาโนเมตร ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 3 สายพันกันเป็นเกลียว แต่ละสายเรียกว่า สายโซ่แอลฟา ( $\alpha$ -chain) ประกอบด้วยกรดอะมิโน ที่มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Gly-X-Y เรียงตัวต่อเนื่องกันเป็นสายยาว โดย Gly คือ ไกลซีน (glycine) ส่วน X-Y สามารถเป็นกรดอะมิโนชนิดใดก็ได้ แต่โดยทั่วไปมักเป็นกรดอะมิโนชนิดโพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ตามลำดับ<sup>[30]</sup> การเรียงตัวโดยกรดอะมิโน 3 ชนิดนี้ มีผลให้



โมเลกุลของคอลลาเจนเสถียรที่สุดและทำให้สายโซ่แอลฟาที่มีลักษณะเป็นเกลียว โมเลกุลของคอลลาเจนเกิดจากการที่สายโซ่แอลฟาจำนวน 3 สายมาพันเกลียวกันทำให้เกิดเป็นโครงสร้างเกลียวซ้อนเกลียวซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของคอลลาเจนที่เรียกว่า ทริปเฟลิกซ์ (triple helix)

เส้นใยคอลลาเจนถูกสร้างขึ้นที่ไรโบโซม (ribosome) และเข้าสู่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) โดยเป็นสายพอลิเพปไทด์เดี่ยวที่มีขนาดยาวกว่าปกติเรียกว่า “สายโซ่โพรแอลฟา” (pro  $\alpha$  chain) สายโซ่โพรแอลฟา 3 สายเรียงตัวขนานกันยึดเกาะกันที่ปลายคาร์บอกซิล (carboxyl terminus) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และพันกันเป็นเกลียวไปยังปลายอะมิโนเกิดเป็นสายเกลียวทริปเฟลิกซ์ โมเลกุลนี้เรียกว่า “โพรคอลลาเจน” (procollagen) ซึ่งจะถูกส่งออกไปภายนอกเซลล์ ที่ภายนอกเซลล์ โพรคอลลาเจนจะถูกเอนไซม์โพรคอลลาเจนเปปติเดส (procollagen peptidase) ตัดส่วนปลายของทั้งสองข้างคือปลายคาร์บอกซิลและปลายอะมิโน เกิดเป็นสายโปรตีนที่สั้นลง เรียกว่า “โทรโปคอลลาเจน” (tropocollagen) หรือ “คอลลาเจน” การตัดส่วนปลายออกนี้ช่วยให้สายเกลียวของคอลลาเจนสามารถเรียงตัวต่อกันเกิดเป็นเส้นใยคอลลาเจนหรือคอลลาเจนไฟบริล (collagen fibril) ได้

ในปัจจุบันมีการค้นพบคอลลาเจนไม่น้อยกว่า 28 ชนิด โดยแบ่งคอลลาเจนเหล่านี้ออกเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ คอลลาเจนที่มีการสร้างเป็นเส้นใย (fibril forming collagen) คอลลาเจนที่มีการสร้างเป็นเส้นใยขนาดเล็ก (microfibril forming collagen) คอลลาเจนที่เกี่ยวข้องกับเส้นใย (fibril-associated collagen with interrupted triple helix หรือที่เรียกย่อ ๆ ว่า FACITs) คอลลาเจนที่เรียงตัวกันเป็นร่างแห (network forming collagen) คอลลาเจนที่เรียงตัวขนานกันทางด้านข้าง (collagen with lateral association) คอลลาเจนที่มีส่วนของโมเลกุลอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane collagen) และกลุ่มสุดท้าย คอลลาเจนชนิดที่มีคอลลาเจนโดเมน (domain) สั้น ๆ สลับกับส่วนที่ไม่เป็นทริปเฟลิกซ์ คอลลาเจนในกลุ่มนี้ มีชื่อเรียกว่า มัลติเพล็กซ์ (multiplexin) แต่กลุ่มที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์โครงค้ำยันคือ คอลลาเจนในกลุ่มที่มีการสร้างเส้นใยโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คอลลาเจนชนิดที่ I

เนื่องจากเมทริกซ์นอกเซลล์พบได้ทั่วไปในร่างกายและมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ และพัฒนาการของเซลล์ ดังนั้นจึงมีการผลิตโครงค้ำยันให้มีความคล้ายคลึงกับเมทริกซ์นอกเซลล์ โดยนำคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนหลักและสามารถขึ้นรูปได้ในลักษณะต่าง ๆ กันมาใช้เป็นโครงค้ำยันสำหรับเซลล์ ในทางการแพทย์ ทันตกรรม และเภสัชกรรม เช่น ใช้แผ่นคอลลาเจนปิดบริเวณแผลผ่าตัดเพื่อห้ามเลือด<sup>[31]</sup> ใช้เป็นโครงค้ำยันสำหรับเซลล์ในรูปแบบของฟองน้ำ

เพื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่เป็นผิวหนังหรือกระดูก<sup>[32]</sup> หรือผลิตคอลลาเจนในรูปแบบเม็ด เพื่อเป็นตัวนำยาเข้าสู่ร่างกาย<sup>[33]</sup>

นอกจากข้อดีของโครงค้ำยันคอลลาเจนที่มีสมบัติคล้ายคลึงกับเมทริกซ์นอกเซลล์และสามารถขึ้นรูปได้หลายลักษณะแล้ว โครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนยังมีสมบัติที่ดีอีกหลายประการ เช่น ไม่เป็นพิษ ย่อยสลายได้ง่าย และเข้ากันได้ดีกับพอลิเมอร์สังเคราะห์อื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตาม โครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนยังมีข้อด้อย เช่น คอลลาเจนชนิดที่ I บริสุทธิ์ มีราคาสูง มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ทำให้ย่อยสลายเร็วเกินไป อีกทั้งโครงค้ำยันคอลลาเจนที่ผลิตจากคอลลาเจนจากหนังวัว อาจมีผลข้างเคียงและทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรควัวบ้าได้<sup>[34]</sup>

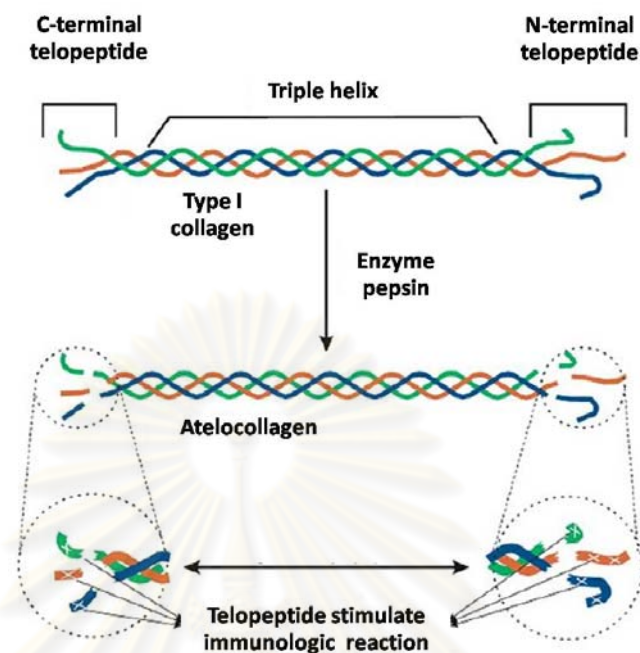
จากข้อด้อยเกี่ยวกับการย่อยสลายเร็วเกินไปของโครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจน จึงมีวิธีการปรับปรุงคุณภาพโดยใช้ปฏิกิริยาเชื่อมขวาง เพื่อให้โครงค้ำยันคอลลาเจนมีความคงตัว มีความแข็งแรงมากขึ้น และทนต่อการย่อยสลายจากเอนไซม์ได้ดี ทำให้บาดแผลหดตัวลดลงและสนับสนุนการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อได้<sup>[35]</sup> ปฏิกิริยาเชื่อมขวางนี้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ปฏิกิริยาเชื่อมขวางโดยใช้สารเคมี เช่น กลูตารัลดีไฮด์ ฟอรัลดีไฮด์ สารประกอบระหว่าง 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดอิมิด และสารเอ็นไฮดรอกซีซัคซินไมด์ หรือใช้วิธีการทางกายภาพเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวาง เช่น ใช้รังสีอัลตราไวโอเลต การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นต้น

ดังได้กล่าวแล้วว่าคอลลาเจนที่นิยมนำมาใช้ทำโครงค้ำยัน ส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจนชนิดที่ I เส้นใยคอลลาเจนชนิดนี้มีพันธะระหว่างโมเลกุลทำให้ยากต่อการละลายจากเนื้อเยื่อได้ โดยปกติคอลลาเจนไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ สามารถละลายในน้ำได้ในปริมาณเล็กน้อย จึงจำเป็นต้องใช้วิธีการพิเศษในการสกัดเอาคอลลาเจนออกจากเนื้อเยื่อและนำมาผลิตโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถกระทำได้หลายวิธี<sup>[36]</sup> เช่น

- การละลายคอลลาเจนออกโดยใช้สารละลายเกลือที่เป็นกลาง (neutral salt solution) สารละลายเกลือที่เป็นกลางที่ใช้โดยทั่วไป เช่น โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 0.15-0.2 โมลาร์ สามารถละลายคอลลาเจนออกจากเนื้อเยื่อได้ ซึ่งเมื่อสกัดได้คอลลาเจนแล้วต้องนำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis) การตกตะกอน และการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ปัจจัยที่ส่งผลต่อส่วนประกอบของคอลลาเจนที่สกัดได้ คือ อุณหภูมิ ปริมาตรสารละลายเกลือที่ใช้ในการสกัด อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มักไม่ค่อยนิยมใช้เนื่องจากสกัดคอลลาเจนได้ปริมาณน้อย

- การใช้กรดละลายคอลลาเจน เป็นวิธีการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเจือจาง เช่น กรดแอซิติก (acetic acid) 0.5 โมลาร์ หรือกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) พีเอช 2-3 พบว่ามีประสิทธิภาพในการสกัดเอาคอลลาเจนออกได้ดีกว่าวิธีการใช้สารละลายเกลือ ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นคือกรดเจือจางทำลายแรงยึดต่อระหว่างโมเลกุลของสายคอลลาเจน ทำให้เกิดเป็นคอลลาเจนโมเลกุล แต่กรดเจือจางนี้ไม่สามารถทำลายพันธะที่แข็งแรง เช่น พันธะคีโตอิมีน (keto-imine bonds) ที่ประกอบอยู่ในกระดูก กระดูกอ่อน หรือคอลลาเจนในสิ่งมีชีวิตที่อายุมาก ๆ ได้ โดยทั่วไปวิธีการนี้มักทำในอุณหภูมิต่ำร่วมกับการละลายคอลลาเจนด้วยน้ำเกลือ
- การใช้เอนไซม์ละลายคอลลาเจน วิธีการนี้เป็นวิธีการใช้เอนไซม์เพื่อทำลายพันธะเพปไทด์ที่ส่วนปลายของเส้นใยคอลลาเจนที่สกัดได้ ทำให้เส้นใยคอลลาเจนถูกตัดเป็นสายสั้น ๆ ดังนั้นคอลลาเจนที่สกัดได้จึงมีขนาดโมเลกุลสั้นกว่าวิธีการละลายคอลลาเจนด้วยกรดเพียงอย่างเดียว<sup>[37]</sup> และเส้นใยคอลลาเจนที่ถูกตัดนี้ เรียกว่า “อะทีโลคอลลาเจน” (atelocollagen) (ภาพที่ 1) ข้อดีของการสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีการนี้คือ มีการกำจัดส่วนของโมเลกุลที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายออกไปได้<sup>[38]</sup> ทำให้เนื้อเยื่อที่สัมผัสกับอะทีโลคอลลาเจนเกิดปฏิกิริยาต่อต้านโดยภูมิคุ้มกันลดลง ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีนี้ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเนื้อเยื่อ 1:10 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ละลายร่วมกันในกรดแอซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพื่อให้คอลลาเจนสามารถละลายได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 แผนภาพการตัดโมเลกุลของคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน

### ไฮดรอกซีอะพาไทต์

ไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นสารอนินทรีย์ที่มีองค์ประกอบหลักคือ แคลเซียมและฟอสเฟต มีสูตรโครงสร้างคือ  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ในธรรมชาติไฮดรอกซีอะพาไทต์พบได้ในส่วนประกอบของกระดูกและฟันในมนุษย์และในปะการัง เนื่องจากไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความคล้ายคลึงกันกับส่วนประกอบของสารอนินทรีย์ในกระดูก จึงมีการนำมาผลิตเป็นโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุน และใช้ในการซ่อมแซมกระดูก<sup>[27]</sup> โครงค้ำยันไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี อีกทั้งไม่มีกลุ่มของโปรตีนเป็นส่วนประกอบ ทำให้ลดการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ที่ได้ยังไม่เหมาะสมเท่าใดนัก เนื่องจากมีความเปราะแตกหักง่าย ทำให้ขาดความแข็งแรงและการคงสภาพ นอกจากนี้ยังย่อยสลายได้ยาก<sup>[39]</sup> จึงไม่นิยมนำมาใช้เป็นโครงค้ำยันเดี่ยว ๆ ส่วนใหญ่ที่มีการนำมาใช้ในทางคลินิกคือใช้เคลือบบนโลหะ หรือผสมกับสารพอลิเมอร์ เช่น คอลลาเจนในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ใช้โดยทั่วไปมักอยู่ในรูปผง ซึ่งอาจเป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า หรือไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผลิตขึ้นเองจากสารเคมี เช่น แคลเซียมไนเตรต (calcium nitrate) และแอมโมเนียมฟอสเฟต (ammonium phosphate) หรือจากการสกัดจากกระดูกสัตว์ เช่น กระดูกวัว เป็นต้น

## โครงค้ำยันที่ใช้ในการรักษาด้วยวิธีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

การรักษาด้วยวิธีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นแขนงหนึ่งของวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่อาศัย ศาสตร์วิชาการหลายสาขาวิชา เช่น เคมีวิทยาของโปรตีน ชีววิทยาและอณูวิทยาของเซลล์ และ ชีววัสดุศาสตร์ ให้สร้างเนื้อเยื่อเพื่อทดแทนเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เสียหาย โครงค้ำยันที่ใช้ในการ รักษาด้วยวิธีวิศวกรรมเนื้อเยื่อประกอบไปด้วยโครงสร้างพื้นฐาน 3 ประการ<sup>[40]</sup>

1. เซลล์ ซึ่งอาจเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บหรือเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้ป่วย หรือผู้ที่บริจาค เนื่องจากในปัจจุบันมีการพัฒนาความรู้และเทคโนโลยีเกี่ยวกับเซลล์ มากขึ้น การค้นพบเซลล์ต้นกำเนิดในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และสามารถแยกเซลล์จากเซลล์ ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อได้ ตัวอย่างเช่นภายในไขกระดูกจะมีแหล่งกำเนิดของเซลล์ที่จะ พัฒนาไปทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้ เช่น เซลล์สร้างกระดูก เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ไขมัน ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้สามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ได้อีกหลายชนิด
2. โมเลกุลที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณการทำงานภายในเซลล์ ได้แก่ สารกระตุ้นหรือ สัญญาณการกระตุ้น เช่น โกรทแฟกเตอร์ (growth factor) หรือเมทริกซ์นอกเซลล์
3. โครงค้ำยันมีลักษณะเป็นโครงสร้างสามมิติที่มีความพรุน เพื่อให้เซลล์สามารถยึด เกาะ เจริญเติบโต และขยายตัว ป้องกันอันตรายต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อเซลล์ รวมไปถึง สนับสนุนให้เซลล์และเนื้อเยื่อใหม่เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่ต้องการ อีกทั้งยังเป็น ช่องทางให้สารอาหารต่าง ๆ เข้ามาเลี้ยงเซลล์ ได้อีกด้วย คุณสมบัติที่ดีของโครงค้ำยัน คือ มีส่วนประกอบหรือเมทริกซ์ที่คล้ายคลึงกับโครงค้ำยันของเนื้อเยื่อในร่างกาย ไม่ เป็นพิษกับร่างกาย มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ ไม่กระตุ้นการอักเสบ ไม่ก่อให้เกิด อาการแพ้ ย่อยสลายได้ และควรมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อ สุดท้ายควรมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม คือมีความแข็งแรง เพื่อให้สามารถ ควบคุมได้ง่ายขณะใช้งาน ปัจจุบันโครงค้ำยันที่ผลิตได้มีลักษณะแตกต่างกันหลาย แบบ เช่น เป็นแบบตาข่าย แบบเจล แบบเม็ด แบบแผ่น และแบบคล้ายฟองน้ำ

โครงค้ำยันในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมี 2 ประเภท คือโครงค้ำยันที่ผลิตจากธรรมชาติ และ โครงค้ำยันที่ผลิตจากวัสดุสังเคราะห์

1. โครงค้ำยันที่ผลิตจากธรรมชาติ มักเป็นโครงค้ำยันที่มีส่วนประกอบคล้ายคลึงกับ เมทริกซ์นอกเซลล์ของเนื้อเยื่อ เช่น คอลลาเจน อีลาสติน (elastin) ไฟโบรเนกติน

(fibronectin) และไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) นอกจากนี้โครงค้ำยันชนิดนี้ยังผลิตได้จาก อัลจิเนต (alginate) และไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ได้พบภายในร่างกายของมนุษย์ แต่ถึงอย่างไรสูตรโครงสร้างของอัลจิเนตและไคโตซานมีความคล้ายคลึงกับไกลโคซามิโนไกลแคน ซึ่งพบในเมทริกซ์นอกเซลล์บริเวณผิวหนัง กระดูก และหลอดเลือด จึงนิยมนำมาผลิตเป็นโครงค้ำยันด้วย

2. โครงค้ำยันที่ผลิตจากวัสดุสังเคราะห์ ได้แก่ โครงค้ำยันที่ผลิตจากเซรามิก (ceramic) ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ ตัวอย่างของโครงค้ำยันชนิดนี้ ได้แก่ เช่น อะลูมินา (alumina) เซอร์โคเนีย (zirconia) และแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) คุณสมบัติที่สำคัญของเซรามิก คือ สนับสนุนการเจริญของกระดูก (osteoconductive) และมีเซรามิกแค่เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูกได้ (osteoinductive) เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไบโอแอกทิฟกลาส (bioactive glasses) เซรามิกที่ใช้สำหรับประดิษฐ์โครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์สำหรับกระดูก เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต บางครั้งนิยมนำมาเคลือบผิววัสดุที่ฝังลงในกระดูก (implant) เพื่อเหนี่ยวนำให้กระดูกสามารถยึดติดกับเนื้อเยื่อโดยรอบได้ นอกจากนี้ เซรามิกแล้วโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นอีกชนิด คือ โครงค้ำยันชนิดพอลิเมอร์ ตัวอย่างของโครงค้ำยันชนิดนี้ ได้แก่ กรดพอลิแลคติก (polylactic acid, PLA) กรดพอลิไกลโคลิก (polyglycolic acid, PGA) และโคพอลิเมอร์ต่าง ๆ เช่น กรดพอลิแลคติกโคไกลโคลิก (polylactic-co-glycolic acid, PLGA) ถูกนำมาใช้เพื่อซ่อมแซมอวัยวะ ซึ่งได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา แล้วว่ามีความปลอดภัย เนื่องจากโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นมานี้ สามารถที่จะควบคุมกลไกการผลิตได้ จึงสามารถผลิตโครงค้ำยันที่มีคุณสมบัติทางกลและทางกายภาพได้ตามต้องการมากกว่าโครงค้ำยันที่ผลิตจากธรรมชาติ อีกทั้งยังสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายและผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายได้อีกด้วย แต่มีข้อเสีย คือ มักเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ เปราะ และย่อยสลายได้ยาก<sup>[41]</sup>

ในการออกแบบโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ มีความจำเป็นต้องพิจารณาคุณสมบัติให้เหมาะสมกับการนำไปใช้กับเซลล์แต่ละชนิดหรือรูปแบบโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ที่จะนำไปใช้งาน โครงค้ำยันที่ใช้ในการรักษาด้วยวิธีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มีสิ่งที่ควรคำนึงถึงหลายประการ เช่น

1. ความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ คือ ความสามารถของโครงค้ำยันที่ไม่กระตุ้นการอักเสบหรือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การฝังโครงค้ำยันเข้าไปในร่างกายสิ่งมีชีวิตจะประสบความสำเร็จหรือไม่ ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่ใช้ผลิตโครงค้ำยันเป็นสำคัญ ถ้าโครงค้ำยันไม่เป็นพิษและเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อใหม่จะสามารถสร้างขึ้นแทนที่โครงค้ำยันได้ดี แต่ถ้าโครงค้ำยันไม่เข้ากันกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ร่างกายจะมีปฏิกิริยาต่อต้านหรือปฏิเสธเนื้อเยื่อโดยเกิดการอักเสบ หรือการสร้างเนื้อเยื่อไพบรวัสส์ล้อมรอบโครงค้ำยันนั้น สำหรับโครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์นั้น มีหลายการศึกษาพบว่ามีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ เนื่องจากส่วนผสมที่ใช้ในการผลิต โครงค้ำยันมีลักษณะคล้ายคลึงกันกับโครงสร้างของกระดูกในร่างกาย ที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ หรือส่วนที่เป็นโปรตีน เช่น คอลลาเจน และส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ Mehlisch และคณะ<sup>[42]</sup> ทำการศึกษาการซ่อมแซมกระดูกขากรรไกรในผู้ป่วยจำนวน 5 รายพบว่าโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูกขากรรไกรได้ และมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก
2. ความสามารถในการย่อยสลาย อัตราการย่อยสลายของโครงค้ำยันมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย โครงค้ำยันที่ย่อยสลายเร็วเกินไปอาจมีผลเสียหายต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ เช่น เกิดการหดตัวของบาดแผล หากโครงค้ำยันย่อยสลายช้าเกินไปจะขัดขวางกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อทำให้การหายของบาดแผลไม่สมบูรณ์ นอกจากอัตราการย่อยสลายแล้ว ผลิตผลจากการย่อยสลายของโครงค้ำยันอาจมีผลเสียต่อการซ่อมแซมของบาดแผลโดยมีการกระตุ้นการอักเสบหรือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยหลักการของการซ่อมแซมบาดแผลด้วยวิธีการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โครงค้ำยันที่ใช้ในบาดแผลต้องถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อจากร่างกายบริเวณรอบ ๆ บาดแผล ดังนั้นโครงค้ำยันควรมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับอัตราการสร้างของเนื้อเยื่อใหม่ และผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายต้องถูกขับออกจากร่างกายได้ ทั้งทางกระบวนการเมแทบอลิซึม และระบบขับถ่าย ปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายของโครงค้ำยัน ได้แก่ ชนิดของวัสดุที่นำมาผลิตโครงค้ำยัน ขนาดและลักษณะของโครงค้ำยัน<sup>[43]</sup>
3. คุณสมบัติทางกล โครงค้ำยันที่ผลิตขึ้นควรเป็นโครงค้ำยัน 3 มิติ เพื่อให้เนื้อเยื่อสามารถยึดเกาะได้ และในขณะเดียวกันโครงค้ำยันที่ผลิตควรมีความแข็งแรง

เพียงพอ เมื่อนำมาใช้งานทางคลินิกสามารถทนต่อแรงกดอัดในขณะที่ทำการฝังโครง  
ค้ำยันในเนื้อเยื่อ และควรมีความคงรูปและคงตัวภายใต้สภาวะของบาดแผลใน  
ร่างกายในระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ<sup>[44]</sup>

4. ลักษณะทางกายภาพของโครงค้ำยัน ความพรุนของโครงค้ำยันทำให้เซลล์สามารถ  
ยึดเกาะได้ดี ลักษณะของรูพรุนสังเกตได้จากขนาดของรูพรุน รูปร่าง เส้นเชื่อม  
ระหว่าง รูพรุน หรือระดับของความพรุน และพื้นที่ผิว ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะช่วยทำ  
ให้เซลล์ ที่มีความเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อรวมถึงหลอดเลือดและสารอาหาร  
ต่าง ๆ เคลื่อนที่เข้ามาในโครงค้ำยันได้ โครงค้ำยันที่ผลิตควรมีที่ว่างมากพอสำหรับ  
การเจริญเติบโตของเซลล์ มีพื้นที่ผิวมากและมีความพรุนสูง เพื่อให้มีเนื้อที่สำหรับ  
การสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ของเซลล์ โดยปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ขนาดของรูพรุน<sup>[45]</sup>  
การศึกษาขนาดของรูพรุนยังไม่มีข้อสรุปแน่ชัดว่าขนาดของรูพรุนเท่าใดจึงจะมีความ  
เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตและการขยายตัวของเซลล์ จากหลาย  
การศึกษาพบว่าโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์  
สร้างกระดูก มีขนาดตั้งแต่ 100 ไมโครเมตร<sup>[46]</sup> จนถึงขนาด 500 ไมโครเมตร<sup>[47]</sup> ถ้า  
ขนาดของรูพรุนมีขนาดเล็กเกินไป เซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปในโครงค้ำยันได้  
ขณะที่รูพรุนที่มีขนาดใหญ่เกินไปทำให้เซลล์ไม่สามารถยึดเกาะกันได้ นอกจากนี้การ  
เคลื่อนที่ของเซลล์ภายในโครงค้ำยันมีความสัมพันธ์กับความพรุนและเส้นเชื่อม  
ระหว่างรูพรุนด้วย โครงค้ำยันที่เหมาะสมควรมีความพรุน และระดับความพรุน  
มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งเหมาะแก่การเคลื่อนที่ของเซลล์และสารต่าง ๆ ได้ดี

ปัจจุบันมีการค้นคว้าและพัฒนาโครงค้ำยันเพื่อใช้สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากมาย  
หลายชนิด เช่น โครงค้ำยันที่ใช้ในการซ่อมแซมบาดแผลของผิวหนัง<sup>[48]</sup> และระบบหลอดเลือด<sup>[49]</sup>  
โครงค้ำยันสำหรับกระดูก<sup>[28]</sup> และโครงค้ำยันของกระดูกอ่อน<sup>[50]</sup> ในด้านทันตกรรมได้มีการนำโครง  
ค้ำยันมาใช้เพื่อเสริมสร้างกระดูกที่ถูกทำลายไปมาก เช่น ใช้โครงค้ำยันจากคอลลาเจนชนิดที่ I  
ใส่ลงไปในตำแหน่งที่กระดูกหักเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูก จากการศึกษาในกระดูก  
ขากรรไกรล่างของหนูที่ใช้โครงค้ำยันคอลลาเจนชนิดที่ I ในกระดูกที่ทำให้เกิดความพิการ พบการ  
สร้างเชื่อมกันของกระดูกเกิดขึ้นใน 6 สัปดาห์ภายหลังการใส่โครงค้ำยัน<sup>[51]</sup>

การสร้างโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบัน มีเทคโนโลยีในการผลิตโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ให้  
มีรูปร่าง และรูปแบบตามที่ต้องการ รวมทั้งการกำหนดสมบัติทางกายภาพของโครงค้ำยันเลี้ยง



เซลล์ในด้านความพรุน ขนาดของรูพรุนภายในโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์และอัตราการย่อยสลาย จากการศึกษาของ Hutmacher<sup>[44]</sup> พบว่า วิธีการประดิษฐ์โครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์มีหลายวิธีและแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เนื่องจากชนิด และรูปร่างของโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ รวมถึงปัจจัยต้นทุนในการผลิต ซึ่งพบว่าวิธีที่ใช้ผลิตโครงค้ำยันในปัจจุบัน มีหลายวิธี เช่น เทคนิคการหล่อแบบ/ ก้ำจัดอนุภาค (Solvent casting and particulate leaching methods)<sup>[52]</sup> การแยกเฟสโดยใช้สถานะของสาร (Phase separation)<sup>[53]</sup> วิธีการทำให้แห้งโดยแช่แข็ง (Freeze drying)<sup>[50]</sup> วิธีใช้ก๊าซเป็นโฟโรเจน (Foaming)<sup>[54]</sup> วิธีการสร้างรูพรุนโดยใช้สารอิมัลชัน (Emulsion templating)<sup>[55]</sup> ซึ่งแต่ละวิธีมีหลักการเดียวกัน คือ ใช้สารตัวกลางในการทำให้เกิดรู ซึ่งสารนั้นอาจเป็นของแข็งของเหลว สารอิมัลชัน และก๊าซ ละลายร่วมกับสารละลายพอลิเมอร์ที่ต้องการขึ้นรูปและทำให้แห้ง จากนั้นกำจัดสารตัวกลางดังกล่าวออกจะทำให้ได้โครงค้ำยันที่มีรูพรุนเกิดขึ้น ปัจจุบันมีการใช้คอมพิวเตอรืในการขึ้นรูปโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ (Solid Free Form Fabrication) หรือเรียกว่า “Rapid prototyping”<sup>[56]</sup> ข้อดีของวิธีการนี้คือ สามารถควบคุมการผลิตโครงค้ำยันให้มีขนาด และรูปร่างของรูพรุนตามที่ต้องการได้ แต่มีข้อสังเกตว่าคอลลาเจนที่ขึ้นรูปด้วยวิธีนี้สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์ได้ไม่ดีเท่ากับคอลลาเจนที่ขึ้นรูปด้วยวิธีอื่น สำหรับคอลลาเจนและไฮดรอกซีอะพาไทต์มักนิยมขึ้นรูปด้วยวิธีการทำให้แห้งโดยแช่แข็ง เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สามารถระเหิดตัวทำละลายออกไปได้ดี<sup>[57]</sup>

จากที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะคิดค้นพัฒนาโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยการใช้คอลลาเจนที่สกัดจากหนังสุกรและขึ้นรูปเป็นลักษณะคล้ายฟองน้ำ จึงเป็นที่มาของการวิจัยในครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

##### วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

- หนังกุญชร
- ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 200 นาโนเมตร (Sigma-Aldrich, USA)
- กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์
- กรดกลูตาเมตแอซีติก
- เอนไซม์เพปซิน (Sigma-Aldrich, USA)
- โซเดียมคลอไรด์
- อะซิโตน
- ถุงเยื่อไดอะไลซิส (MW cut off 12,000-14,000 Spectra/Por® molecularous, USA)
- เอ็น-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดไฮไมด์ (Sigma-Aldrich, USA)
- เอ็นไฮดรอกซีซึกซินิไมด์ (Sigma-Aldrich, USA)
- อะคริลิไมด์ (Sigma-Aldrich, USA)
- โซเดียมไดออกซีฟอสเฟต (Sigma-Aldrich, USA)
- คูแมสซี บิลีเลียนท์ บลูอาร์ 250 (Sigma-Aldrich, USA)
- โบรโมฟีนอลบลู (Sigma-Aldrich, USA)
- Precision Plus Protein™ Standards (BIO-RAD, USA)
- โซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิก
- โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิก
- เอนไซม์คอลลาจีเนส (Sigma-Aldrich, USA)

### อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge 6K15, Sigma, USA)
- Lyophilizer (Flexi-Dry MP, Sigma, USA)
- เครื่องเจาะ (puncher) ขนาด 5 มิลลิเมตร
- เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (40SM-200A Precisa, Switzerland)
- เครื่องตัดเนื้อเยื่อแผ่นบาง (Microtome, RM2255, Leica Microsystems, USA)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JEOL, Japan)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาว (BH-2, Olympus optical, Japan)
- ชุดโปรแกรมถ่ายภาพ (Motic Advance Image 3.2, Motic China Group, China)

### การสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร

คอลลาเจนที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ เตรียมจากผิวหนังสดของสุกร ด้วยวิธีการละลายในกรดพร้อม กับเอนไซม์โดยดัดแปลงตามวิธีของ Rousseau และ Gagnieu<sup>[58]</sup> มีขั้นตอนคือ

1. นำผิวหนังสดของสุกรมาล้างให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1x3x0.5 ลูกบาศก์ เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 3 ครั้ง



ภาพที่ 2 หนังสุกรที่หั่นเป็นชิ้นขนาด 1x3x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. นำหนังสุกรที่ได้ไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.015 โมลาร์ ที่ผสมเอนไซม์ เพปซินในปริมาณ 20 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักของหนังสุกร 1 กรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาตรของกรดผสมเอนไซม์ไม่น้อยกว่า 50 เท่าของปริมาตรหนังสือกร บั่นให้เข้ากัน เพื่อให้เอนไซม์และกรดทำปฏิกิริยากับคอลลาเจนในหนังสือกร



ภาพที่ 3 การบั่นหมุนหนังสือกรในสารละลายกรดที่ผสมเอนไซม์เปปซิน

- จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปบั่นด้วยเครื่องเหยียงตตะกอน ด้วยค่าแรงเหยียงหนีศูนย์กลาง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ที่ตั้งส่วนตะกอนซึ่งประกอบด้วยเศษเนื้อเยื่อไป นำเฉพาะส่วนของเหลวมาตตะกอนให้ได้คอลลาเจนด้วย เกลือโซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือเป็น 0.6 โมลาร์

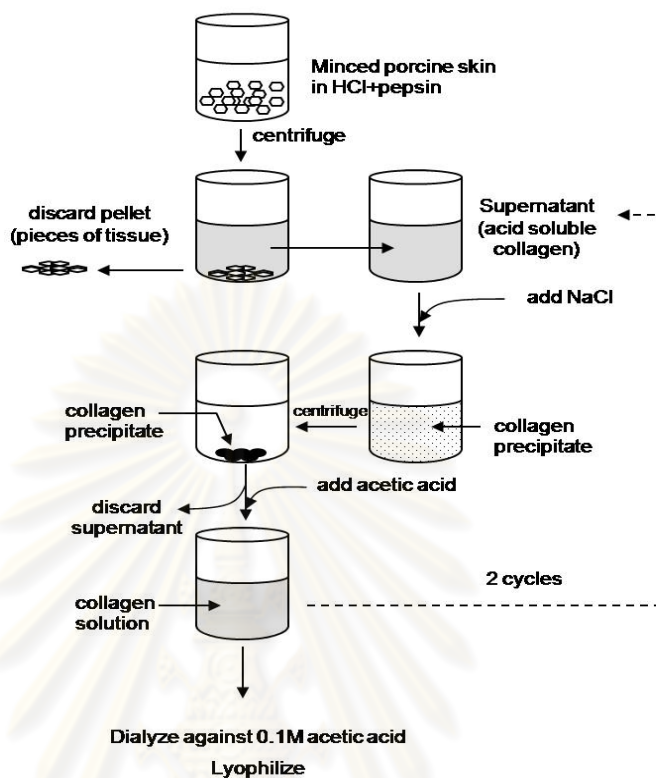


ภาพที่ 4 สารละลายคอลลาเจนและตะกอนเศษเนื้อเยื่อที่เกิดจากการบั่นเหยียง (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 5 ตะกอนเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ตกตะกอนสารละลายคอลลาเจน

4. นำไปเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้งเป็นเวลา 45 นาที ทิ้งส่วนเหลว เก็บเฉพาะส่วนตะกอน ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยคอลลาเจน ละลายตะกอนคอลลาเจนในกรดและตกตะกอนด้วยเกลือซ้ำ 2 ครั้งเพื่อให้ได้คอลลาเจนที่สะอาด
5. ตะกอนคอลลาเจนสุดท้าย นำมาสกัดไขมันออกด้วยอะซิโตน แล้วปล่อยให้แห้ง
6. ละลายตะกอนคอลลาเจนด้วยกรดโดยใช้สารละลายกรดแอสติค ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อีกครั้ง
7. ทำการกำจัดเกลือที่ใช้ตกตะกอนคอลลาเจนด้วยการทำไดอะไลซิส (dialysis) นำสารละลายคอลลาเจนที่ได้ใส่ในถุงเยื่อไดอะไลซิสของสารละลายคอลลาเจนในกรด แอสติคความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้เยื่อไดอะไลซิสที่มีความสามารถจำกัดการซึมผ่านของโมเลกุลที่มีน้ำหนัก 12,000-14,000 ดาลตัน (Spectra/Por® dialysis membrane, MW cut off 12,000-14,000, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน
8. จากนั้นสารละลายคอลลาเจนที่ปราศจากเกลือปนเปื้อนถูกนำไปอบแห้งเยือกแข็ง (lyophilization) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมคอลลาเจนจากผิวหนังสุกร

### การตรวจสอบโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธีฟอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำคอลลาเจนที่สกัดได้มาละลายด้วยกรดแอสติก ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้กับตัวอย่าง (sample buffer) ซึ่งบัฟเฟอร์ตัวอย่าง สามารถเตรียมได้จาก โบโรโม ฟีนอลบลู 0.005 กรัม นำมาละลายใน ทริสไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายตัวอย่างผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง ในอัตราส่วน สารละลายตัวอย่าง : บัฟเฟอร์ที่ใช้กับตัวอย่าง 4:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบ

### การเตรียมพอลิอะคริลอะไมด์เจล

การเตรียมเจลใช้กระจก 2 แผ่นขนาดกว้าง 8 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร และขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) กว้าง 0.9 เซนติเมตร ยาว 8.5 เซนติเมตรหนา 0.1 เซนติเมตร วางเป็นกรอบแม่พิมพ์ นำ separating gel ที่มีความเข้มข้นของอะคริลอะไมด์ ร้อยละ 10 เทลงในกระจกแม่พิมพ์อย่างช้าๆ โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ให้เจลมีความสูง 5 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยใช้น้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้จนแผ่นเจลแข็งตัว ประมาณ 45- 90 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง จากนั้น เททับด้วยสารละลาย stacking gel ที่มีความเข้มข้นของอะคริลอะไมด์ ร้อยละ 5 ใส่แม่พิมพ์ลงในช่องเจล (comb) ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 30-60 นาที

### การเตรียมเจล

1) 10% Separating gel	
น้ำกลั่น	5.9 ml
30%stock acrylamide	5.0 ml
10% SDS	0.15 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.80 ml
TEMED	15.00 µl
10 % ammonium persulfate	200 µl
2) 5% Stacking gel	
น้ำกลั่น	5.5 ml
30%stock acrylamide	1.3 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	1.0 ml
10% SDS	0.08 ml
TEMED	0.1 ml
10 % ammonium persulfate	15 µl

### การย้อมสีโปรตีนในแผ่นพอลิอะคริลอะไมด์เจล

นำแผ่นเจลที่ผ่านขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ไปย้อมสีของโปรตีนด้วยสารละลายคูแมสซี บริลเลียนท์ บลูอาร์ 250 (coomassie brilliant blue R250) อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชะสีส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution) ซึ่งเตรียมได้

จาก สารละลายที่มีส่วนผสมของเมทานอลร้อยละ 30 ผสมกับ กรดกลูตาซีลแอซิดิก ร้อยละ 10 ในน้ำกลั่น แชนแผ่นเจลจนกระทั่งส่วนที่เป็นโปรตีนบนเจลปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินชัดเจน

### การเตรียมโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

จากขั้นตอนการศึกษานำร่องใช้คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดหนังสุกรผสมกับกรดแอซิดิกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 กรัมต่อปริมาตรกรด 100 มิลลิลิตร พบว่าที่อัตราส่วนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 กรัม โครงค้ำยันไม่สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นตามที่ต้องการได้ จึงเลือกใช้อัตราส่วนในการทดลองครั้งนี้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 2 และ 2.5 กรัม ใช้เวลาผสมให้เข้ากันนาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนสารละลายเริ่มเป็นวุ้น จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในอัตราส่วน ไฮดรอกซีอะพาไทต์ต่อสารละลายคอลลาเจน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) คนให้เข้ากัน นำสารละลายคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ได้ใส่แบบพิมพ์พลาสติก ขนาดกว้าง 30 มิลลิเมตร ยาว 30 มิลลิเมตร และสูง 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำแบบพิมพ์ที่ได้ไปแช่แข็งโดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกทำให้สารละลายผสมแข็งตัวโดยลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ด้วยการนำไปแช่ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสอีก 30 นาที กลุ่มที่ 2 นำไปแช่แข็ง โดยลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ด้วยการแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทันที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแบบพิมพ์ทั้งสองกลุ่มไปอบแห้งเยือกแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### การทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

สารที่ใช้ในปฏิกิริยาเชื่อมขวางคอลลาเจนในการศึกษานี้ เป็นสารผสมของ 33 มิลลิโมลาร์ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดอิมิด กับ 6 มิลลิโมลาร์ เอ็นไฮดรอกซีซึกซินไมด์ (Sigma-Aldrich, USA) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ของ 2-มอโฟไลโนอีเทนซัลโฟนิคแอซิด (2-morpholinoethane sulphonic acid) และเอทานอล ร้อยละ 40<sup>[22]</sup> ปฏิกิริยาเชื่อมขวางทำโดยแช่โครงค้ำยันคอลลาเจนที่สังเคราะห์ขึ้นในสารเชื่อมขวาง ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวนมาก นำไปอบแห้งเยือกแข็งอีกครั้ง



## การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ศึกษาลักษณะโครงสร้างโดยละเอียดของโครงค้ำยันคอลลาเจนที่สังเคราะห์ได้ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด โดยสุ่มเลือกโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์ขึ้นในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 1 ชิ้น ตัดตำแหน่งกึ่งกลางของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หนา 3 มิลลิเมตร จากนั้นเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying) ก่อนที่จะนำไปยึดติดบนแผ่นทองเหลือง (specimen stub) และเคลือบผิวตัวอย่างด้วยอนุภาคทอง (gold particles) ศึกษาลักษณะพื้นผิวและความพรุนของโครงค้ำยันคอลลาเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ที่ 15 กิโลโวลต์ที่กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพด้วยระบบดิจิทัล (Semafor® 5.0 digital imaging system JEOL, Japan)
2. การวัดขนาดของรูพรุน (pore size) ทำโดยนำโครงค้ำยันที่ขึ้นรูปไว้มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น ที่ตำแหน่งกึ่งกลางและมุมทั้ง 4 ของโครงค้ำยัน นำไปแช่น้ำกลั่นจนอิ่มตัวเพื่อให้ฟองน้ำดูดซับน้ำได้เต็มที่ จากนั้นตรึงสภาพฟองน้ำด้วยร้อยละ 0.25 กลูตารัลดีไฮด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น ร้อยละ 60, 70, 80, และ 95 เป็นเวลา 30 นาที ตามลำดับ สุดท้ายนำมาแช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และนำไปใส่สารละลายไซลีนที่มีพาราฟิน (paraffin) เป็นส่วนผสมอีก 30 นาที โดยขั้นตอนที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ ต้องทำภายใต้สภาวะสุญญากาศเพื่อให้สารต่าง ๆ แทรกซึมเข้าไปในช่องว่างของโครงค้ำยันให้มากที่สุด จากนั้นนำแผ่นฟองน้ำแช่ในพาราฟิน เพื่อเตรียมขึ้นฟองน้ำสำหรับตัดเป็นแผ่นบางขนาด 5 ไมโครเมตร (microtome, RM2255, Leica Microsystems, USA) ย้อมแผ่นบางฟองน้ำด้วยสีฮีมาทอกไซลีน (haematoxylin) นำแผ่นบางที่ได้จากการตัดวางบนแผ่นสไลด์ สไลด์ละ 5 แผ่น จำนวน 3 สไลด์ต่อโครงค้ำยัน 1 ชิ้น สุ่มเลือกแผ่นสไลด์ 1 ชิ้นตรวจดูขนาดของรูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบใช้แสงขาว (BH-2, Olympus optical, Japan) กำลังขยาย 10 เท่า ด้วยชุดโปรแกรมถ่ายภาพ Motic Advance Image 3.2 (Motic China Group, China) วัดขนาดของรูพรุนด้วยเครื่องมือวัดพื้นที่อิสระ (irregular) ขนาดของพื้นที่หลายเหลี่ยม (polygon) และเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) วิธีการสำหรับการวัดขนาดของพื้นที่อิสระและพื้นที่หลายเหลี่ยมคือใช้เมาส์ลากผ่านรูพรุนที่ต้องการวัดขนาด โดยวงของรู

พูนที่ใช้เมาส์ลากต้องมีเส้นโดยรอบชัดเจน วัดทุกวงที่ปรากฏในภาพ สำหรับการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง ทำโดยใช้เมาส์ลากเส้นผ่านศูนย์กลางที่กว้างที่สุดของรูพูนที่มีเส้นรอบวงชัดเจนโดยรอบ โดยมีผู้วัดขนาดของรูพูนเพียงคนเดียวและผ่านการปรับความแม่นยำในการวัดรูพูน ด้วยการวัดภาพของขนาดรูพูน 2 ครั้งนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้สถิติทดสอบแพร์ที่เทสต์ (paired t-test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 สำหรับค่าขนาดของเส้นรอบวงของรูพูน เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพูนมีหน่วยเป็นไมโครเมตร ส่วนค่าพื้นที่ของรูพูนมีหน่วยเป็นตารางไมโครเมตร นำค่าของรูพูนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของรูพูน และแบ่งขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพูนเป็น 3 กลุ่ม โดยให้คะแนนดังนี้

เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพูน

คะแนน 1 เมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพูนมีขนาดน้อยกว่า 100 ไมโครเมตร

คะแนน 2 เมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพูนมีขนาด 100-300 ไมโครเมตร

คะแนน 3 เมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพูนมีขนาดมากกว่า 300 ไมโครเมตร

3. การทดสอบการดูดน้ำ (water absorption test) การศึกษาสมบัติการดูดน้ำของโครงค้ำยัน ทำได้โดยการวัดน้ำหนักของโครงค้ำยันภายหลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (phosphate-saline buffer) โดยมีขั้นตอนคือ ตัดโครงค้ำยัน ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หนา 3 มิลลิเมตร ในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 5 ชิ้น ชั่งน้ำหนักเพื่อให้ทราบน้ำหนักก่อนทดลอง จากนั้นนำโครงค้ำยันแช่ในสารละลายที่ได้จากการผสมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิก จำนวน 0.264 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตไดเบสิก จำนวน 2.17 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโครงค้ำยันไปกำจัดส่วนเกินของน้ำออกโดยวางไว้บนกระดาษชรอง 1 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักโครงค้ำยันด้วยเครื่องชั่งอีกครั้ง บันทึกค่าที่ได้เป็นทศนิยม 5 ตำแหน่ง คำนวณร้อยละของการดูดน้ำจากสูตร

$$\text{ร้อยละของการดูดน้ำ} = \frac{W-W_0}{W_0} \times 100$$

Wo

เมื่อ  $W$  คือ น้ำหนักของโครงค้ำยันภายหลังจากแช่สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
 $W_0$  คือ น้ำหนักของโครงค้ำยันก่อนแช่สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์ โดยในแต่ละ  
 ครั้งของการทดลองจะทำการชั่ง 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย

#### 4. การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกในร่างกาย (*In vitro* biodegradation)

4.1) การย่อยสลายในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์ : ทำโดยการวัดน้ำหนักที่  
 หายไปของโครงค้ำยันภายหลังจากแช่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
 โดยมีการเปลี่ยนสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยมี  
 ขั้นตอนคือ ตัดโครงค้ำยันให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หนา 3  
 มิลลิเมตร ในแต่ละกลุ่มกลุ่มละ 40 ชิ้น ซึ่งน้ำหนักเพื่อให้ทราบน้ำหนักก่อน  
 ทดลอง จากนั้นนำโครงค้ำยันแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์ ที่ได้  
 จากการผสมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิก จำนวน 0.264 กรัม ในน้ำ  
 ปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตไดเบสิก จำนวน  
 2.17 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร พีเอช=7.4 อุณหภูมิ 37 องศา  
 เซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในกระบอกที่มีฝาปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4  
 เซนติเมตรโดยมีการเปลี่ยนสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์ทุกวัน เก็บ  
 ตัวอย่างทุก 1 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 5 ชิ้น จนครบ 8 สัปดาห์ ทำให้แห้งภายใต้ตู้  
 ดูดความชื้น วัดน้ำหนักแห้งที่หายไปจนค่าน้ำหนักที่วัดได้มีค่าคงที่ บันทึกค่า  
 น้ำหนักแห้งของโครงค้ำยันที่มีค่าคงที่ ณ เวลาต่าง ๆ นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละ  
 ละของน้ำหนักที่หายไป (% weight loss) จากสูตร

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักที่หายไป} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

$W_1$  = น้ำหนักของโครงค้ำยันก่อนการแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์

$W_2$  = น้ำหนักของโครงค้ำยันที่แห้งภายหลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์

เซไลน์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

บันทึกภาพโครงค้ำยันในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์ทุก ๆ

สัปดาห์ ก่อนนำไปทำให้แห้ง

- 4.2) การย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส : ทำโดยการวัดน้ำหนักที่หายไปของโครงค้ำยันภายหลังการแช่อยู่ในสารละลายสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 31.2 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์<sup>[59]</sup> ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำซ้ำตามวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์

### การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการบรรยายลักษณะของโครงค้ำยันที่ผลิตได้และลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

บันทึกข้อมูลค่าเฉลี่ย การดูดน้ำ ขนาดของรูพรุน และการสลายตัวทางชีวภาพ ของโครงค้ำยันในแต่ละกลุ่มการทดลองลงในตาราง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการสลายตัวทางชีวภาพของโครงค้ำยันที่ช่วงเวลา 6 สัปดาห์โดยใช้กราฟ ทดสอบความแตกต่างของการดูดน้ำ และค่าเฉลี่ยขนาดของรูพรุน ด้วยสถิตินอนพาราเมตริก (non-parametric) ชนิดครุสคัลวัลลิส (Kruskal-Wallis) การเปรียบเทียบพหุคูณ โคโนเวอ อินแมน (multiple comparisons, all pairwise comparison : Conover Inman) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม สแตตส์ไคเรคท์ ฟอร์ วินโดวส์ เวอร์ชัน 2.7.2 (StatsDirect for Windows version 2.7.2)

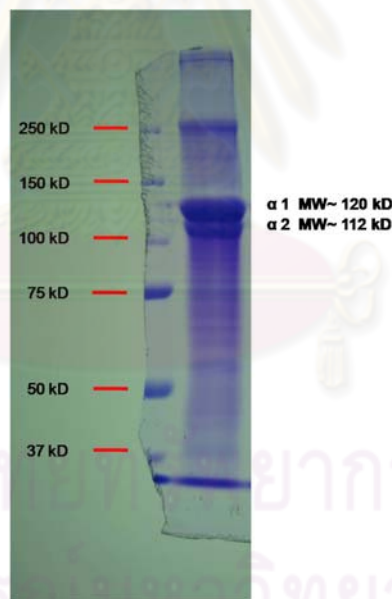
## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบ

##### การตรวจสอบโปรตีนที่สกัดได้จากหนังสือ

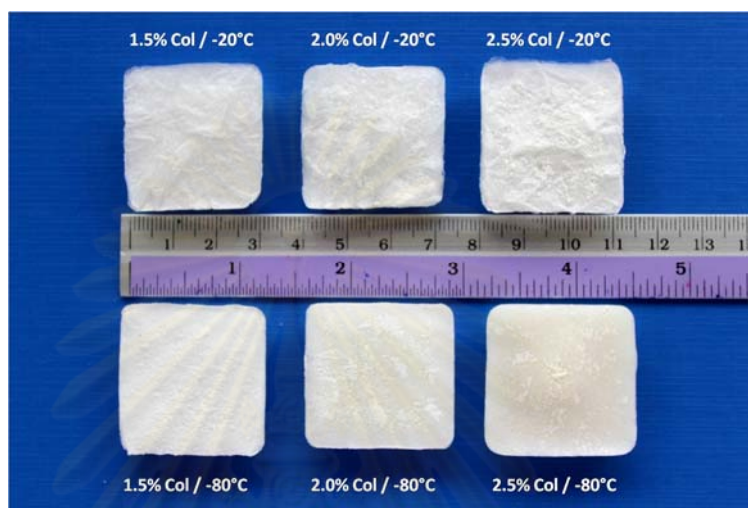
การสกัดคอลลาเจนจากหนังสือด้วยวิธีการละลายในกรดและตกตะกอนด้วยเกลือในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าหนังสือสดจำนวน 100 กรัม สามารถสกัดได้คอลลาเจนที่อบแห้งเยือกแข็งได้ประมาณ 0.9 กรัม คอลลาเจนที่ได้จากหนังสือนี้ เมื่อนำมาศึกษาด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าองค์ประกอบหลักที่สกัดได้คือ คอลลาเจนชนิดที่ I ที่ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 2 สาย คือ แอลฟา 1 ( $\alpha 1$ ) และแอลฟา 2 ( $\alpha 2$ ) ในตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120 และ 112 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของสารละลายคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสือ โดยวิธีการละลายในกรดร่วมกับเอนไซม์

เมื่อนำคอลลาเจนดังกล่าวมาผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์และสังเคราะห์เป็นโครงค้ำยันโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนในกรด ร้อยละ 1.5, 2 และ 2.5 กรัม และผ่านการอบเยือกแข็งที่

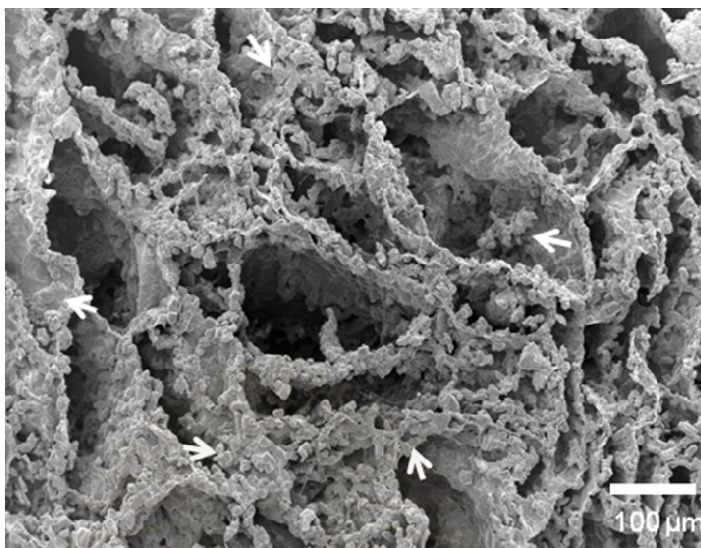
สภาวะต่างกัน 2 สภาวะ พบว่าโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นทุกกลุ่มมีลักษณะเป็นรูปวงคล้ายฟองน้ำ มีสีขาว (ภาพที่ 8) กดนิ่ม ไม่มีกลิ่น และเมื่อนำโครงค้ำยันเหล่านี้ไปแช่ในน้ำกลั่นก่อนทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง พบว่าโครงค้ำยันทุกกลุ่มมีลักษณะนิ่ม ไม่คงตัว ซึ่งภายหลังจากการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางพันธะแล้ว โครงค้ำยันเหล่านี้อุ้มน้ำได้ดี กดแข็งขึ้น มีความคงตัวมากขึ้น โดยสีไม่เปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ก่อนทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง

#### ลักษณะของโครงค้ำยันเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

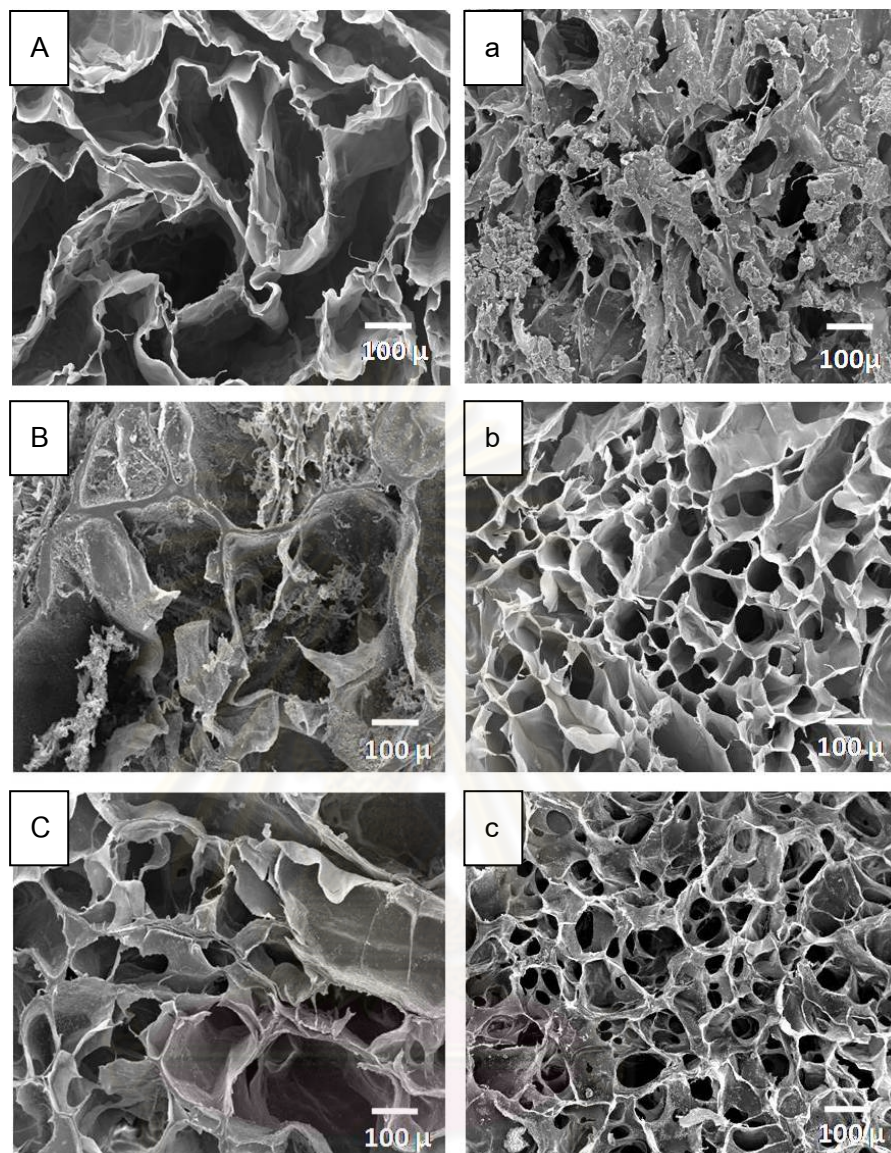
จากการศึกษาลักษณะของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเชื่อมขวางแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าโครงค้ำยันเหล่านี้ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่อัดกันแน่นเป็นแผ่นและสานกันไปมาเกิดเป็นรูปวงที่มีผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เกาะกระจายอยู่ไม่สม่ำเสมอบนแผ่นคอลลาเจน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของโครงค้ำยัน  
คอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ แสดงลักษณะผนังของรูพรุนมีเปลือก  
ไฮดรอกซีอะพาไทต์เกาะ (ลูกศรชี้)

เมื่อพิจารณาโครงค้ำยันคอลลาเจนไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในแต่ละกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์  
อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นขนาดของรูพรุนจะเล็กลง แต่เมื่อ  
เปรียบเทียบโครงค้ำยันที่ใช้ความเข้มข้นในการสังเคราะห์เท่ากันขนาดของรูพรุนของกลุ่มที่ใช้  
อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็วจะมีขนาดเล็กกว่า โครงค้ำยันที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่าง  
ช้า ๆ (ภาพที่ 10)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 ภาพที่ 10 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของโครงค้ำยันคอลลาเจน  
 ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์แสดงลักษณะของรูพรุนของโครงค้ำยัน

คอลลาเจนร้อยละ 1.5 อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้าๆ (A)

คอลลาเจนร้อยละ 1.5 อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว (a)

คอลลาเจนร้อยละ 2.0 อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้าๆ (B)

คอลลาเจนร้อยละ 2.0 อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว (b)

คอลลาเจนร้อยละ 2.5 อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้าๆ (C)

คอลลาเจนร้อยละ 2.5 อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว (c)



### ผลการวัดขนาดของรูพรุน

จากการศึกษาการวัดขนาดของรูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบแสงขาว ก่อนการวัดค่าเฉลี่ยของรูพรุน ผู้วิจัยได้ทดสอบความแม่นยำในการวัด โดยวัดค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุน 2 ครั้ง แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.436$ ) ได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะและขนาดของรูพรุนในโครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งก่อนการอบเยือกแข็งที่สภาวะต่างกันด้วยการวัดขนาดรูพรุนเหล่านี้ ผลการวัดแสดงไว้ในตาราง

ตารางที่ 1 ค่ามัธยฐาน (median) ของเส้นรอบวงของรูพรุนโครงค้ำยัน ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

Collagen concentration	diameter ( $\mu\text{m}$ ) under slow freezing Condition		diameter ( $\mu\text{m}^2$ ) under fast freezing Condition	
	Median (interquartile range)	Max-Min	Median (interquartile range)	Max-Min
1.5% collagen	406 (417-384)	433-376	296 (300-284)	306-276
2.0% collagen	353 (382-242)	384-327	303 (309-292)	316-274
2.5% collagen	385 (426-359)	468-354	307 (325-285)	362-271

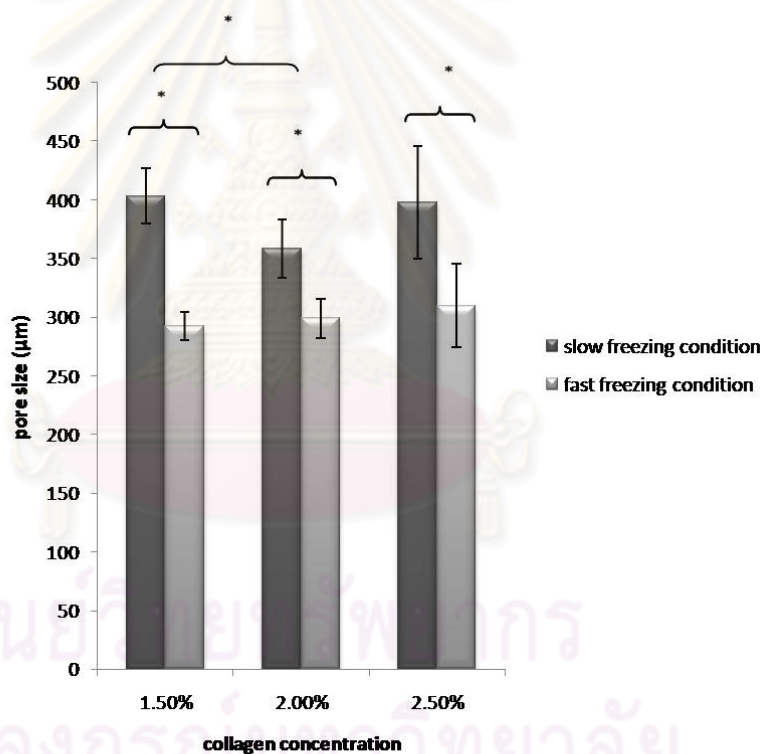
ตารางที่ 2 ค่ามัธยฐานของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนโครงค้ำยัน ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

Collagen concentration	diameter ( $\mu\text{m}$ ) under slow freezing Condition		diameter ( $\mu\text{m}^2$ ) under fast freezing Condition	
	Median (interquartile range)	Max-Min	Median (interquartile range)	Max-Min
1.5% collagen	153 (176-140)	256-106	136 (145-123)	180-79
2.0% collagen	171 (221-135)	292-107	127 (140-116)	192-98
2.5% collagen	170 (195-149)	307-125	132 (141-118)	164-94

ตารางที่ 3 ค่ามัธยฐานของพื้นที่ของรูพรุนโครงค้ำยัน ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

Collagen concentration	pore area ( $\mu\text{m}^2$ ) under slow freezing Condition		pore area ( $\mu\text{m}^2$ ) under fast freezing Condition	
	Median (interquartile range)	Max-Min	Median (interquartile range)	Max-Min
1.5% collagen	8,404 (10,895-7,152)	17,467-5,642	5,136 (6,173-3,181)	11,421-2,045
2.0% collagen	8,088 (9,837-6,943)	11,078-6,126	4,298 (6,135-3,343)	7,604-2,430
2.5% collagen	8,553 (10,588-7,376)	22,118-6,901	5,156 (6,759-4,465)	7,906-3,673

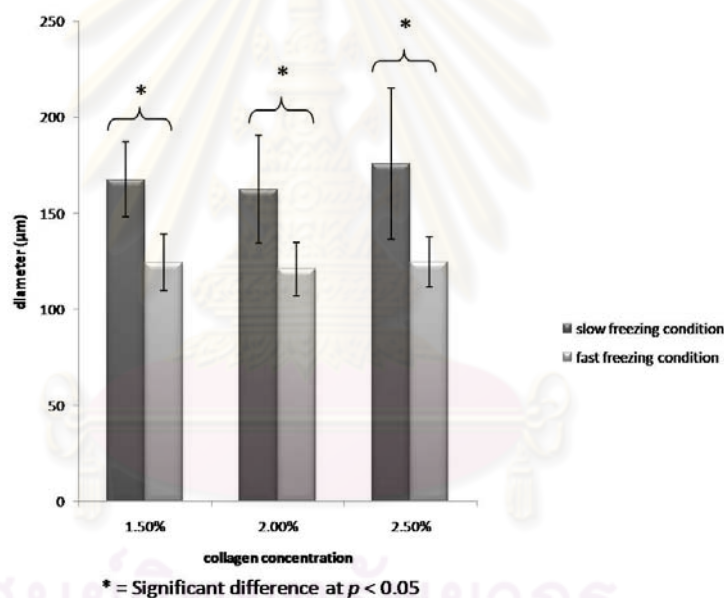
เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของรูพรุนของโครงค้ำยันในแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติทดสอบครุสคัล-วัลลิสและการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบโคโนเวออินแมน พบว่า ค่าเฉลี่ยของเส้นรอบวงของรูพรุนโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ ในแต่ละความเข้มข้นของคอลลาเจนมีค่าเฉลี่ยของเส้นรอบวงของรูพรุนมากกว่าค่าเฉลี่ยของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของรูพรุนที่ผลิตขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคอลลาเจนแตกต่างกัน พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุนไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) ยกเว้นกลุ่มที่ผลิตจากคอลลาเจนร้อยละ 1.5 กรัม และใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างช้า ๆ กับกลุ่มที่ผลิตจากคอลลาเจนร้อยละ 2.0 กรัม และใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างช้า ๆ ที่พบความแตกต่างกัน ( $p = 0.02$ ) (ภาพที่ 11)



\* = Significant difference at  $p < 0.05$

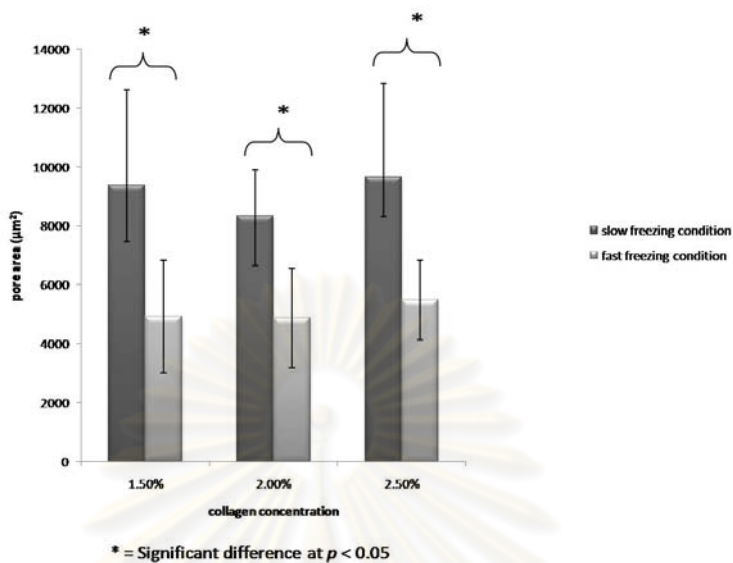
ภาพที่ 11 ค่าเฉลี่ยเส้นรอบวงของรูพรุนโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

สำหรับการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของพื้นที่และเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนของโครงค้ำยันในแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติทดสอบครุสคัล-วัตลิสและการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบโคโนเวออินแมน พบว่า ค่าเฉลี่ยของพื้นที่และเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ ในแต่ละความเข้มข้นของคอลลาเจนมีค่าเฉลี่ยของพื้นที่และเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนมากกว่าค่าเฉลี่ยของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพื้นที่และเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่ผลิตขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคอลลาเจนแตกต่างกัน พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุนไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) (ภาพที่ 12 และ 13)



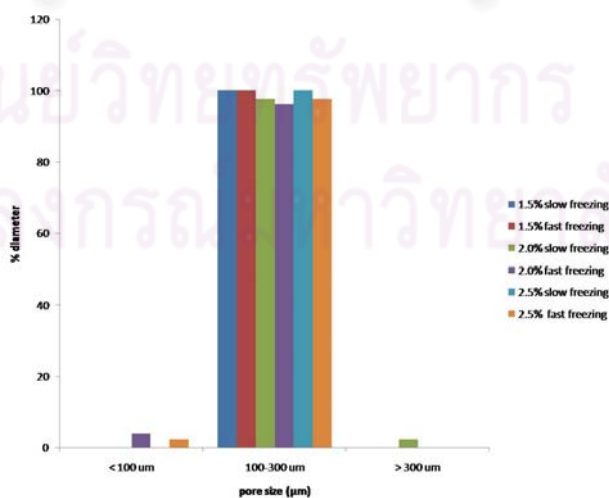
ศูนย์วิทยุทางการแพทย์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 12 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน



ภาพที่ 13 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของรูพรุนโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

เมื่อศึกษาการกระจายตัวของรูพรุนที่เกิดขึ้นจะพบว่า ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่ได้จากการศึกษานี้ส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 100-300 ไมโครเมตร ดังภาพที่14



ภาพที่ 14 การกระจายตัวของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนโครงค้ำยันในแต่ละกลุ่ม

### ผลการทดสอบการดูดน้ำ

ค่าเฉลี่ยของการดูดน้ำของโครงค้ำยันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่ม โดยค่าเฉลี่ยของการดูดน้ำจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายคอลลาเจนเพิ่มขึ้น และจะมีค่าเฉลี่ยการดูดน้ำสูงขึ้นเมื่อโครงค้ำยันที่ผลิตจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำลงอย่างรวดเร็ว ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ร้อยละของการดูดน้ำของโครงค้ำยัน ที่ผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

กลุ่มทดลอง	ร้อยละของการดูดน้ำ Mean $\pm$ SD
collagen 1.5%, slow freezing	624.85 $\pm$ 50.55 *
collagen 1.5%, fast freezing	823.18 $\pm$ 38.26 *
collagen 2.0%, slow freezing	996.78 $\pm$ 18.54 *
collagen 2.0%, fast freezing	1033.81 $\pm$ 30.44 *
collagen 2.5%, slow freezing	1085.84 $\pm$ 16.34 *
collagen 2.5%, fast freezing	1261.54 $\pm$ 104.06 *

\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$

### ผลการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย

การศึกษากการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย ใน 2 สภาวะ คือ การย่อยสลายของโครงค้ำยันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซโรไลน์ และสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซโรไลน์

การศึกษากการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงค้ำยันภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซโรไลน์ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโครงค้ำยันก่อนแช่มีค่า ประมาณ 5.05-7.20 มิลลิกรัม เมื่อพิจารณาจากภาพถ่ายพบว่า

โครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 1.5 กรัม อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ เมื่อครบหนึ่งสัปดาห์ โครงค้ำยันย่อยสลายจนไม่คงสภาพเดิม ส่วนโครงค้ำยันที่ผลิตจาก

คอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 1.5 กรัม คุณหมุมิแซ่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว เมื่อครบสามสัปดาห์ โครงค้ำยน์ย่อยสลายจนไม่คงสภาพเดิม

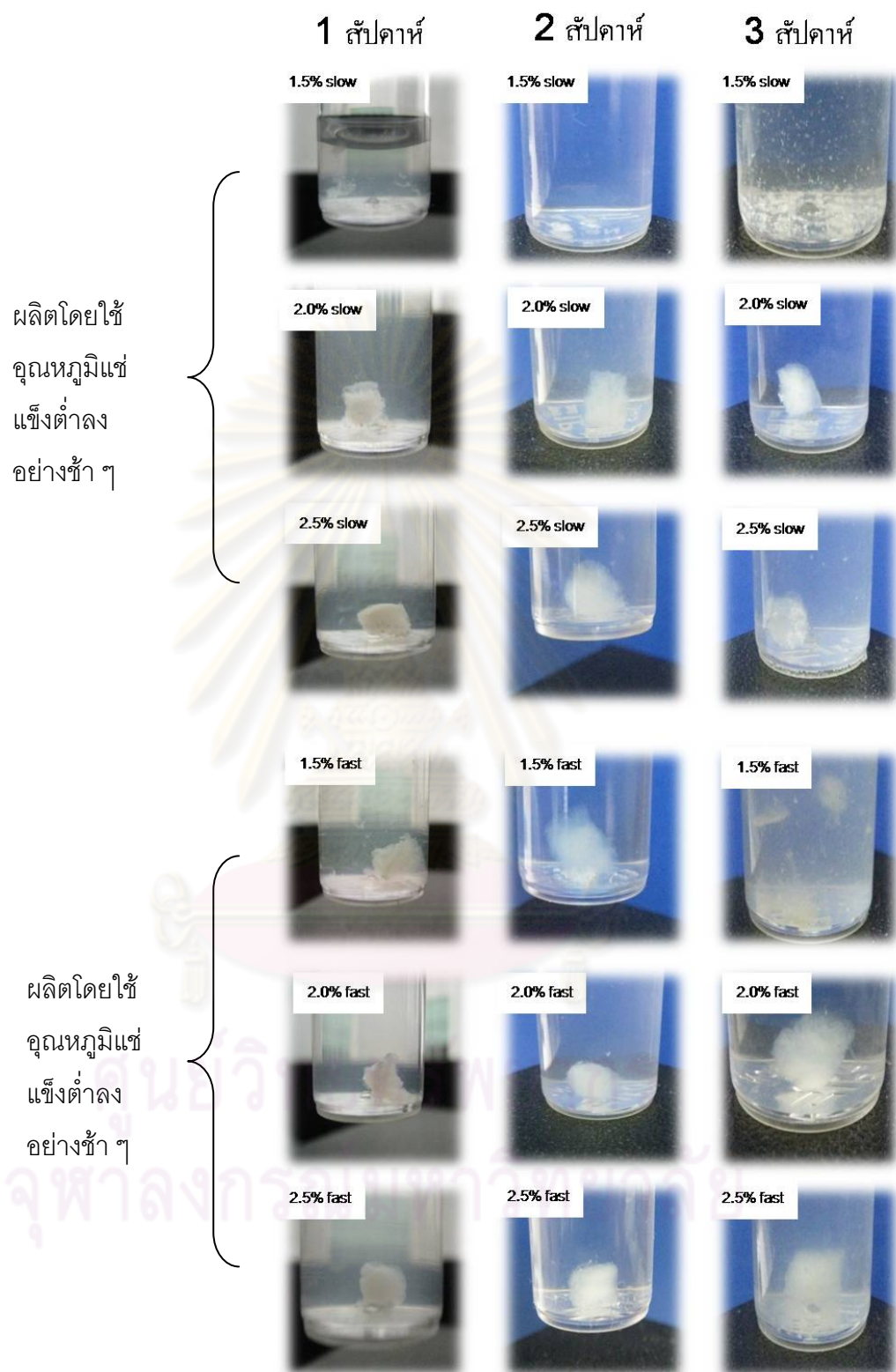
ในขณะที่โครงค้ำยน์ที่ผลิตจากคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และ 2.5 กรัม กลุ่มที่แซ่แข็งโดยลดคุณหมุมิลงอย่างช้า ๆ จะเริ่มพบการย่อยสลายของโครงค้ำยน์เมื่อครบสี่สัปดาห์ และเมื่อครบหกสัปดาห์ โครงค้ำยน์จะย่อยสลายจนไม่คงสภาพเดิม

ส่วนโครงค้ำยน์ที่ผลิตจากคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และ 2.5 กรัม กลุ่มที่แซ่แข็งโดยลดคุณหมุมิลงอย่างรวดเร็ว เมื่อครบ 6 สัปดาห์ โครงค้ำยน์ยังคงรูปร่างได้ดี

สรุปได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นโครงค้ำยน์จะสลายตัวเพิ่มมากขึ้นโดยกลุ่มที่สลายตัวเร็วที่สุด คือกลุ่มที่ผลิตจากคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (ภาพที่ 15 และ 16)

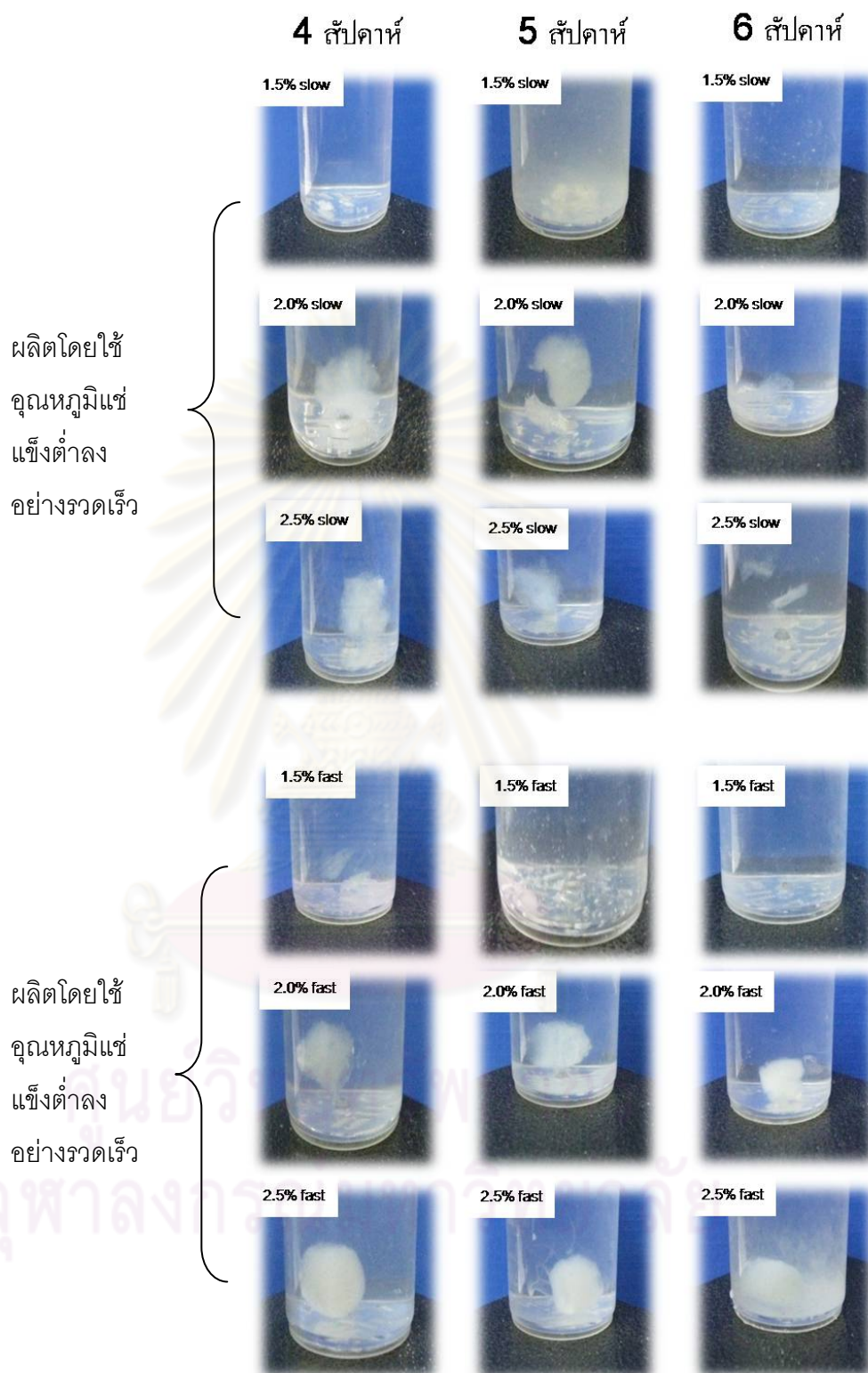


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 15 การย่อยสลายของโครงข่ายเมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
1-3 สัปดาห์





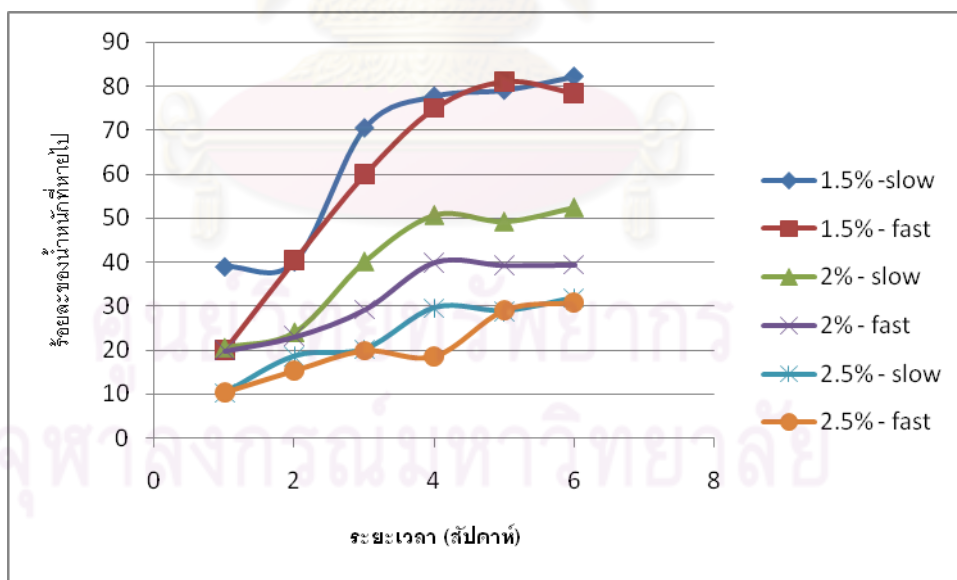
ภาพที่ 16 การย่อยสลายของโครงค้ำยันเมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไฮดรอกไซด์  
4-6 สัปดาห์

โดยเมื่อพิจารณาจากร้อยละของน้ำหนัที่หายไปของโครงค้ำยันจากกราฟ (ภาพที่ 17) จะพบว่า กลุ่มที่ผลิตจากคอลลาเจนร้อยละ 1.5 กรัมจะย่อยสลายได้เร็วที่สุด และมีน้ำหนัที่หายไปมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์ และน้ำหนัที่หายไปประมาณร้อยละ 80 เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์

กลุ่มที่มีความเข้มข้นของคอลลาเจนร้อยละ 2.0 กรัม และผลิตโดยเริ่มลดอุณหภูมิแช่แข็งลงอย่างรวดเร็ว เมื่อครบ 3 สัปดาห์ น้ำหนัที่หายไปของโครงค้ำยันจะหายไปประมาณร้อยละ 30-40 จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ ร้อยละน้ำหนัที่หายไปของโครงค้ำยันที่หายไปจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 40-50 โดยกลุ่มที่ผลิตโดยลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ จะมีน้ำหนัที่หายไปมากกว่ากลุ่มที่ผลิตโดยลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว

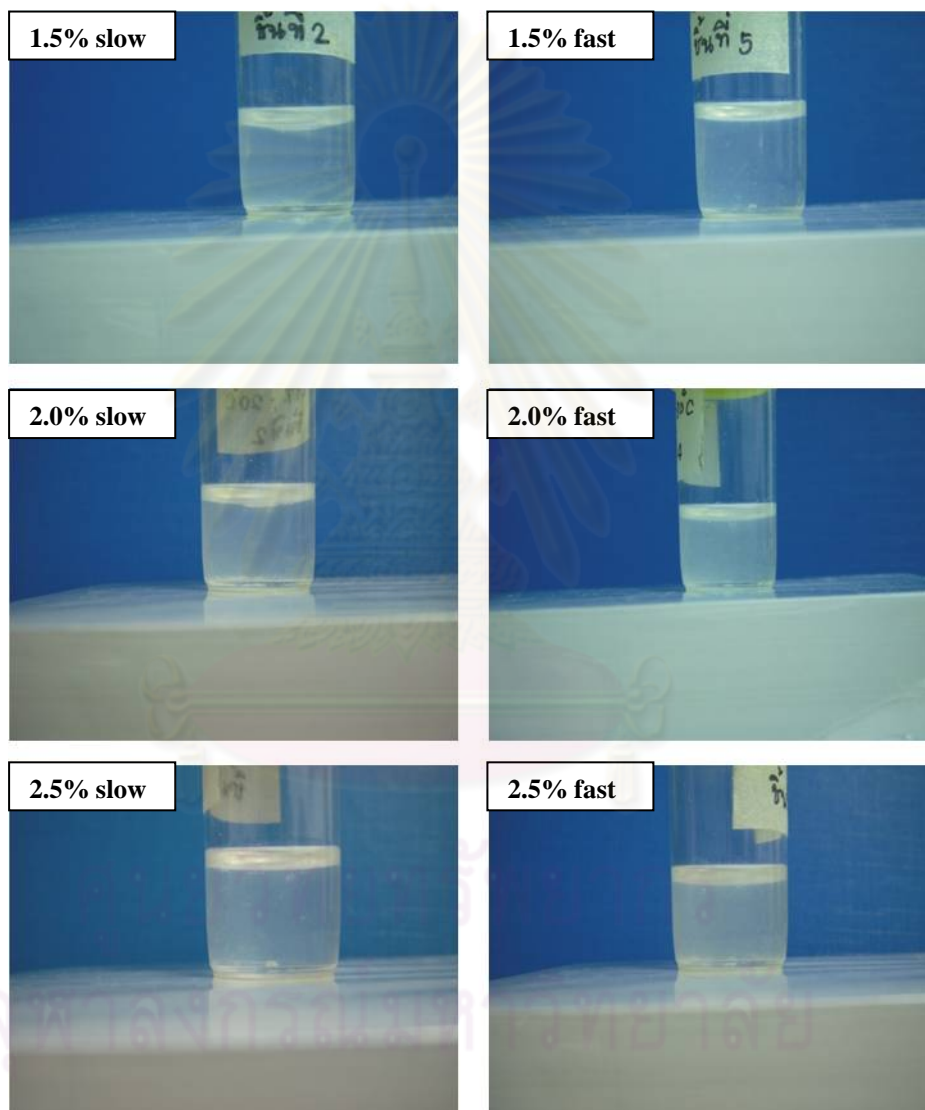
สำหรับกลุ่มที่มีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบมากที่สุด คือ กลุ่มที่ผลิตจากคอลลาเจนร้อยละ 2.5 กรัม น้ำหนัที่หายไปของโครงค้ำยันจะหายไปประมาณ ร้อยละ 20 เมื่อเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์ และเมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ ร้อยละของน้ำหนัที่หายไปจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 30

โดยรวมจะพบว่าโครงค้ำยันคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นมากกว่าจะย่อยสลายช้ากว่าโครงค้ำยันที่มีความเข้มข้นของคอลลาเจนน้อย และโครงค้ำยันที่ผลิตโดยวิธีแช่แข็งที่เริ่มจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำลงอย่างรวดเร็วจะย่อยสลายช้ากว่าการผลิตที่เริ่มแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำลงอย่างช้า ๆ



ภาพที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนัที่หายไปของโครงค้ำยันเมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไฮโดรเจนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงค้ำยันภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 31.2 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซโรไลน์ พบว่าภายในระยะเวลา 1 วัน โครงค้ำยันไม่สามารถรักษาสภาพได้ ละลายในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสจนหมด กลายเป็นสารละลายใสที่มีตะกอนของไฮดรอกซีอะพาไทต์อยู่ด้านล่าง (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การย่อยสลายของโครงค้ำยันเมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 31.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ระยะเวลา 1 วัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังสุกร เมื่อนำไปผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ สามารถนำไปผลิตเป็นโครงค้ำยันด้วยวิธีอบแห้งเยือกแข็ง โดยใช้สาร 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดโอไมด์ร่วมกับเอ็นไฮดรอกซีซัคซินิไมด์เป็นตัวเชื่อมพันธะ ภายหลังจากสังเคราะห์ได้เป็นโครงค้ำยันที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ สีขาว ดูน้ำได้ดี คงสภาพได้ดีหลังจากผ่านปฏิกิริยาเชื่อมโยงพันธะ ละลายตัวได้ในน้ำและละลายได้ดีในเอ็นไซม์คอลลาจีเนส และในกระบวนการเตรียมโครงค้ำยัน เมื่อใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างช้า ๆ โครงค้ำยันที่ได้มีขนาดเฉลี่ยของรูพรุนใหญ่กว่าโครงค้ำยันที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างรวดเร็ว

#### อภิปรายผลการวิจัย

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่า การใช้คอลลาเจนจากวัว ทำให้มีโอกาสเสี่ยงกับการติดเชื้อโรคที่มาจากวัว จึงได้มีการสกัดคอลลาเจนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเพื่อใช้ทดแทน เช่นสุกร<sup>[13]</sup> ม้า<sup>[26]</sup> หนั่งปลาทะเล<sup>[25]</sup> สำหรับการศึกษานี้ ได้เลือกที่จะสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร เนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูก อีกทั้งมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าโครงค้ำยันที่ผลิตจากหนังสุกรทำให้เซลล์บุหลอดเลือดเพิ่มจำนวนได้ดี<sup>[13]</sup> วิธีการสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้โดยการละลายกรดเพียงอย่างเดียว หรือใช้กรดร่วมกับเอ็นไซม์ ซึ่งในการศึกษานี้ได้เลือกใช้การสกัดด้วยกรดร่วมกับเอ็นไซม์เพปซิน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ เอ็นไซม์ทำลายพันธะเพปไทด์ที่ส่วนปลายของโมเลกุลคอลลาเจนที่สกัดได้ ทำให้คอลลาเจนถูกตัดเป็นสายสั้นลง ซึ่งเรียกว่า “อะทีโลคอลลาเจน” ดังนั้นคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการนี้จึงมีขนาดโมเลกุลสั้นกว่าวิธีการละลายคอลลาเจนด้วยกรดเพียงอย่างเดียว<sup>[37]</sup> ข้อดีของการสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีการนี้คือ มีการกำจัดส่วนของโมเลกุลที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายออกไป<sup>[60]</sup>

จากผลการศึกษาชนิดของโปรตีนที่สกัดได้จากหนังสุกร ในการศึกษาพบว่าส่วนใหญ่ของสารที่สกัดได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งปรากฏเป็นแถบของสายไซแอลฟา 1 และสายไซแอลฟา 2 ในแผ่นเจล เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า โดยแถบทั้งสองอยู่ในตำแหน่งของน้ำหนักโมเลกุล 120 และ 112 กิโลดาลตันตามลำดับ แถบของน้ำหนักโมเลกุลที่มีน้ำหนัก 120 กิโลดาลตัน มีความหนาแน่นมากกว่าแถบ 112 กิโลดาลตัน ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของคอลลาเจนประกอบด้วยสายไซแอลฟา 1 จำนวน 2 สาย และ สายไซแอลฟา 2 จำนวน 1 สาย ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลนี้มีค่า

ใกล้เคียงกับน้ำหนักของสายโซ่แอลฟาของเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ I ในการศึกษาของ Nalinanon และคณะ<sup>[37]</sup> ที่สกัดคอลลาเจนจากหนังวัวโดยใช้เอนไซม์เพปซินในการสกัดคอลลาเจน และรายงานว่าคอลลาเจนจากหนังวัว ประกอบด้วย สายโซ่แอลฟา 1 สายโซ่แอลฟา 2 ซึ่งมีน้ำหนัก ประมาณ 118 และ 111 กิโลดาลตันตามลำดับ

ในระยะแรกของการเตรียมโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยยังไม่ได้ทำการเชื่อมโยงพันธะ พบว่าโครงค้ำยันที่ได้ไม่มีความคงตัวและย่อยสลายง่าย ทำให้ยากแก่การนำไปใช้ในบาดแผล เพราะไม่สามารถคงรูปเป็นโครงให้เซลล์เกิดการยึดเกาะและเคลื่อนที่ได้ ตลอดจนไม่สามารถคงรูปร่างและเก็บพื้นที่ให้กับการเจริญของเซลล์กระดูกได้ ดังนั้นในการเตรียมโครงค้ำยันครั้งต่อมา จึงเพิ่มความคงตัวของโครงค้ำยันโดยทำการเชื่อมขวางโมเลกุลของคอลลาเจนด้วย สาร 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดไฮไมด์ร่วมกับเอ็นไฮดรอกซีซัคซินิไมด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคาร์โบไดไฮไมด์ สาร 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดไฮไมด์ ร่วมกับเอ็นไฮดรอกซีซัคซินิไมด์ โดยมีรายงานการศึกษาพบว่ามีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์และเนื้อเยื่อ<sup>[23, 61]</sup> ปฏิริยาเชื่อมขวางที่เกิดขึ้น เกิดจากการกระตุ้นปลายคาร์บอกซิล (carboxyl terminus) ของเส้นใยคอลลาเจนให้ทำปฏิกิริยากับปลายอะมิโน (amino terminus) ของเส้นใยคอลลาเจนอื่นที่อยู่ใกล้เคียง ทำให้เกิดพันธะที่เชื่อมโยงกันระหว่างโมเลกุล โครงค้ำยันคอลลาเจนที่ได้จึงมีความแข็งแรงและคงตัวมากขึ้น<sup>[62]</sup>

โครงค้ำยันที่เตรียมได้ในการศึกษานี้เกิดจากส่วนผสมของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสุกร และ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งองค์ประกอบทั้งสองเป็นวัสดุทางชีวภาพที่มีความเหมาะสมกับการนำมาใช้ซ่อมแซมแผลกระดูก เนื่องจากมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับส่วนประกอบของกระดูก<sup>[63]</sup> มีการศึกษาที่พบว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถกระตุ้นการสร้างโบนไซอะโลโพรทีน (bone sialoprotein) และ ออสทีโอพอนทิน (osteopontin) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสร้างกระดูกด้วยการหลั่งแคลเซียมไอออน<sup>[64]</sup> และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมและฟอสเฟตไอออนจากไฮดรอกซีอะพาไทต์จะช่วยให้เพิ่มการสร้างของกระดูกใหม่ได้ดี<sup>[65]</sup> ถึงแม้มีการศึกษาพบว่า ไฮดรอกซีอะพาไทต์จะถูกย่อยสลายได้ช้า แต่เมื่อนำมาผลิตเป็นโครงค้ำยันร่วมกับคอลลาเจนพบว่าการย่อยสลายได้ในอัตราที่เหมาะสม<sup>[63]</sup> อีกทั้งมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์มีสมบัติทางกลและอัตราการย่อยสลายเหมาะสมกว่าการใช้คอลลาเจนอย่างเดียวในการผลิตโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์ อีกด้วย<sup>[66]</sup>

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์หลังการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่อัดกันแน่นเป็นแผ่น และมีผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ติดอยู่ที่ผนังของรูพรุน ลักษณะของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พบยังไม่กระจายไปทั่วทั้งโครงค้ำยัน มักจับกลุ่มเป็นก้อนและตกตะกอน จึงจำเป็นต้องหาวิธีการในการสังเคราะห์โครงค้ำยันที่มีการกระจายของไฮดรอกซีอะพาไทต์อย่างสม่ำเสมอต่อไป

จากผลการศึกษาที่แสดงว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนในการผลิตโครงค้ำยันมากขึ้นจะได้ขนาดของรูพรุนที่เล็กลง ลักษณะเช่นนี้อาจเกิดจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนทำให้ปริมาณเส้นใยคอลลาเจนมากขึ้น มีช่องว่างระหว่างเส้นใยที่น้ำสามารถแทรกเข้าไปได้น้อยกว่า ทำให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก เมื่อผ่านการทำให้แห้งโดยแช่แข็งจึงได้รูพรุนที่มีขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ไม่สามารถวัดขนาดของรูพรุนได้อย่างชัดเจนมากนัก เนื่องจากภาพที่ได้เป็นลักษณะของภาพสามมิติ ทำให้ยากแก่การกำหนดขอบเขตของรูพรุน จึงได้ศึกษาขนาดของรูพรุนด้วยการตัดเป็นแผ่นบางแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบแสงขาว และพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไม่ได้ทำให้ค่าเฉลี่ยของเส้นรอบวงของรูพรุนที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นกลุ่มที่มีความเข้มข้นของคอลลาเจนร้อยละ 2.0 กรัม และใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ ที่ให้ผลการศึกษาแตกต่างจากกลุ่มอื่น ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายคอลลาเจนไม่มีผลต่อขนาดของรูพรุน ให้ผลการศึกษาแตกต่างจากการศึกษาของ Tierney และคณะ<sup>[67]</sup> ที่พบว่าความเข้มข้นของคอลลาเจนมีผลกับขนาดรูพรุน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การศึกษานี้ใช้คอลลาเจนที่มีความเข้มข้นมากกว่า คือใช้คอลลาเจนร้อยละ 1.5 กรัมขึ้นไป ในขณะที่การศึกษาของ Tierney และคณะใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนเพียงร้อยละ 0.25 - 1 กรัมเท่านั้น อีกทั้งวิธีการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางที่แตกต่างกัน การศึกษาของ Tierney และคณะ ใช้การเพิ่มอุณหภูมิและลดความดันเพื่อเชื่อมโยงพันธะ ซึ่งอาจทำให้ผลการศึกษาที่ได้มีความแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ถึงขนาดของรูพรุนที่เกิดจากการใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่างกันทั้งสองสภาวะพบว่า กลุ่มที่ลดอุณหภูมิแช่แข็งอย่างช้า ๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยประมาณของรูพรุนมากกว่า 100 ไมโครเมตร ซึ่งต่างจากกลุ่มที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างรวดเร็ว ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยประมาณของรูพรุนประมาณ 100 ไมโครเมตร ค่าที่ได้นี้ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของรูพรุนจากการศึกษาของ Kang และคณะ<sup>[68]</sup> ที่ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการแช่แข็งโครงค้ำยัน ที่อุณหภูมิ -20, -80 องศาเซลเซียสและแช่

ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ได้ค่าเฉลี่ยของรูพรุน  $250 \pm 120$ ,  $85 \pm 35$  และ  $45 \pm 5$  ไมโครเมตร ตามลำดับ และเมื่อทำการวัดและวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของรูพรุนเมื่อศึกษาด้วยวิธีการตัดเป็นแผ่นบางแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบแสงขาว พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุนมีความสอดคล้องกับสภาวะของอุณหภูมิแช่แข็งที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างรวดเร็วจะทำให้ขนาดของรูพรุนของโครงค้ำยันมีค่าน้อยกว่าการใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างช้า ๆ เช่นเดียวกันกับการศึกษาอื่น ๆ <sup>[45, 50, 68]</sup> ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างช้า ๆ ความเย็นที่ลดต่ำลงอย่างช้า ๆ นี้ ทำให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นเมื่อแรกเริ่มมีจำนวนน้อย ผลึกเหล่านี้จะเป็นแกนให้น้ำที่อยู่รอบ ๆ แช่แข็งตัว ส่งผลต่อมาให้ขนาดของผลึกใหญ่ขึ้นและแทรกซึมอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน จึงทำให้เกิดรูพรุนขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของโครงค้ำยันที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่อุณหภูมิที่ลดต่ำลงอย่างรวดเร็วได้ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กจำนวนมากพร้อม ๆ กัน แทรกซึมอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจนจึงกลายเป็นรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาค่าเฉลี่ยของรูพรุนได้จากการวัดค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางที่กว้างที่สุดและแคบที่สุดของรูพรุน<sup>[67]</sup> บางครั้งพบว่าวงของรูพรุนที่ได้จากการศึกษามีรูปร่างรี จึงอาจทำให้ค่าที่ได้จากการวัดไม่สามารถเป็นตัวแทนของขนาดรูพรุนที่ดีได้ แต่การศึกษานี้ค่าขนาดของรูพรุนเป็นพื้นที่ซึ่งน่าจะเป็นตัวแทนของขนาดรูพรุนได้ดีกว่า

เมื่อใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดมีค่า 250-350 ไมโครเมตรโดยประมาณ และมีค่าเฉลี่ยประมาณ 150-250 ไมโครเมตร เมื่อใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าค่าเฉลี่ยของรูพรุนที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์อยู่ที่ประมาณ 100-500 ไมโครเมตร<sup>[46, 47, 69]</sup> ดังนั้นค่าเฉลี่ยรูพรุนของโครงค้ำยันที่ผลิตขึ้นในการศึกษานี้ จึงนับว่ามีขนาดที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์

จากการศึกษาสมบัติการดูดน้ำของโครงค้ำยันในการศึกษานี้พบว่า โครงค้ำยันทุกกลุ่มที่ผลิตขึ้นให้ค่าการดูดน้ำที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มที่ให้ค่าการดูดน้ำมากที่สุดคือ โครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนร้อยละ 2.5 กรัมและลดอุณหภูมิแช่แข็งอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากมีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบมากที่สุด ทำให้สามารถอุ้มน้ำได้ดี ซึ่งค่าการดูดน้ำของโครงค้ำยันที่ผลิตขึ้นมีค่ามากกว่า 6 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้นของโครงค้ำยัน และมีค่ามากกว่าค่าการดูดน้ำที่ศึกษาโดย Ratanavaraporn และคณะในปี 2006<sup>[70]</sup> ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาของ Ratanavaraporn และคณะ ใช้ความเข้มข้นของโครงค้ำยันเพียงแค่อ้อยละ 0.6 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในการศึกษานี้ อีกทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาค่าการดูดน้ำจากการศึกษาของ

Ratanavaraporn นั้นมีช่วงระยะเวลาที่น้อยกว่าเพียงแค่ 5 ชั่วโมง ซึ่งโครงค้ำยันอาจยังดูน้ำได้ไม่เต็มที ทำให้ค่าการดูน้ำที่ได้น้อยกว่าค่าการดูน้ำของการศึกษานี้ ซึ่งแค่โครงค้ำยันในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความสามารถในการกักเก็บน้ำของโครงค้ำยันนี้มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์ เพราะเป็นส่วนสำคัญในการเป็นตัวกลางส่งผ่านสารสื่อระหว่างเซลล์ สารอาหาร และสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมผ่านทางโครงค้ำยันเหล่านี้ นอกจากนี้การที่โครงค้ำยันดูน้ำได้ดียังทำให้เซลล์ยึดติดได้ดี อีกทั้งยังทำให้เซลล์สามารถเคลื่อนเข้าไปในโครงค้ำยันและเจริญเติบโตได้ดีอีกด้วย

จากการศึกษาการย่อยสลายของโครงค้ำยันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไฮดรอกไซด์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ร้อยละของน้ำหนักที่หายไปจะเพิ่มมากขึ้น ทำให้โครงค้ำยันมีขนาดเล็กลง สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ในทุกช่วงเวลาของการศึกษา ซึ่งการย่อยสลายที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจากการกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) อันเป็นกระบวนการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ให้กลายเป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน ในการศึกษาครั้งนี้คอลลอยด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของโครงค้ำยันจึงถูกย่อยสลายกลายเป็นกรดอะมิโนโมเลกุลเล็กในที่สุด โดยกลุ่มที่ผลิตจากคอลลอยด์ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดมีปริมาณโปรตีนคอลลอยด์น้อยจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่ากลุ่มที่มีความเข้มข้นมากกว่า เพราะประกอบด้วยเส้นใยคอลลอยด์น้อยกว่าจึงถูกย่อยสลายได้ง่าย ในขณะที่โครงค้ำยันที่ถูกผลิตโดยเซลล์ที่อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็ว จะย่อยสลายได้ช้ากว่าโครงค้ำยันที่ผลิตโดยเซลล์ที่อุณหภูมิลดลงอย่างช้า ๆ ทั้งนี้เนื่องจาก โครงค้ำยันที่ผลิตโดยใช้อุณหภูมิเซลล์ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้รูพรุนที่ได้มีขนาดเล็ก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโครงค้ำยันที่ผลิตโดยใช้อุณหภูมิเซลล์ที่ลดลงอย่างช้า ๆ พบว่าในปริมาตรที่เท่ากัน โครงค้ำยันชนิดที่ใช้อุณหภูมิเซลล์ที่ลดลงอย่างช้า ๆ จะประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นใยคอลลอยด์น้อยกว่าโครงค้ำยันที่ผลิตโดยใช้อุณหภูมิเซลล์ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นปริมาณเส้นใยที่สัมผัสกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไฮดรอกไซด์ของโครงค้ำยันที่ใช้อุณหภูมิเซลล์ที่ลดลงอย่างช้า ๆ จึงมีปริมาณน้อยกว่าและย่อมจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่า ซึ่งผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Moa และคณะ<sup>[71]</sup> ที่กล่าวว่า อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจะทำให้ขนาดของรูพรุนที่เล็กกว่าจะเกิดการย่อยสลายได้เร็วกว่า นอกจากนี้อาจเนื่องจากลักษณะผิวของโครงค้ำยันเมื่อผลิตโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิลดลงอย่างช้า ๆ มีลักษณะผิวที่ขรุขระที่ผนังรูพรุนมีพื้นที่ในการสัมผัสกับสารละลายได้มากกว่าจึงเกิดการย่อยสลายเร็วกว่าโครงค้ำยันที่ผลิตโดยการแช่แข็งที่ใช้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็วที่มีลักษณะพื้นผิวเรียบ<sup>[72]</sup>



การศึกษาการย่อยสลายของโครงค้ำยันภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 31.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์) เพียงแค่ระยะเวลา 1 วัน โครงค้ำยันย่อยสลายจนหมดเหลือเพียงตะกอนของไฮดรอกซีอะพาไทต์ การย่อยสลายที่เกิดขึ้นเกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิส ร่วมกับการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (enzymatic cleavage) พบว่าเอนไซม์คอลลาจีเนส สามารถย่อยสลายคอลลาเจนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าองค์ประกอบของโครงค้ำยันส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ใช้ในการศึกษานี้ มากกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่พบในไขข้อของผู้ป่วยโรคไขข้อกระดูกอักเสบ (osteoarthritis) ถึง 42 เท่า เพราะจากการศึกษาของ Maede และคณะ<sup>[73]</sup> ศึกษาพบว่าเอนไซม์คอลลาจีเนสในไขข้อของผู้ป่วยโรคไขข้อกระดูกอักเสบ พบได้ประมาณ 2361 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจทำให้เกิดการย่อยสลายคอลลาเจนเป็นไปอย่างรวดเร็ว สำหรับการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์คอลลาจีเนสเท่ากันกับการศึกษาของ Pek และคณะ<sup>[59]</sup> เพื่อศึกษาการสลายตัวเบื้องต้นของโครงค้ำยัน ซึ่งจะต้องทำการศึกษาการสลายของโครงค้ำยันด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นในระดับปกติของร่างกายต่อไป

โครงค้ำยันที่ใช้ในการซ่อมแซมกระดูก มีด้วยกันหลายชนิด สำหรับโครงค้ำยันที่ผลิตจากวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น มักจะเกิดการย่อยสลายช้า คือ ใช้เวลาในการย่อยสลายนานประมาณ 6-12 เดือน บางชนิด เช่น พอลิคาร์โพลแลกโตน (polycaprolactone) ใช้เวลาในการย่อยสลายนานหลายปี<sup>[43]</sup> ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการซ่อมแซมกระดูก เพราะระยะเวลาเริ่มต้นในการซ่อมแซมกระดูกอยู่ที่ประมาณ 1-2 เดือน ถ้าโครงค้ำยันที่ใช้ใส่ในบาดแผลคงอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน จะนับว่ามีสิ่งแปลกปลอมปะปนอยู่ ซึ่งจะทำให้ขัดขวางการหายของบาดแผลได้ การศึกษานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะพัฒนาต่อไป เพื่อใช้สำหรับทดแทนกระดูกที่สูญเสียไป

โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนจากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในการศึกษานี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในงานทางทันตกรรมได้หลายสาขา เช่น ศัลยกรรมปริทันต์ที่มีการทะลุของกระดูก ศัลยกรรมกระดูกในขากรรไกรและใบหน้าจากสาเหตุอุบัติเหตุหรือการตัดเนื้อออก ใช้ทดแทนกระดูกที่สูญเสียไปมากหลังจากการถอนฟันเพื่อคงสภาพของสันเหงือก งานทันตกรรมรากเทียม และงานรักษาคอลงรากฟัน ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นวัสดุอุดปิดรูเปิดปลายรากฟันที่เปิดกว้างในการทำเอเพกซิฟิเคชัน (apexification) ก่อนทำการอุดด้วยมินเอร์ลไตรออกไซด์แอกกรีเกต หรือ เอ็มทีเอ (Mineral Trioxide Aggregate; MTA) ทดแทนการใช้แผ่นเยื่อคอลลาเจนซึ่งมีราคาแพง

### ข้อเสนอแนะ

1. การกระจายตัวของไฮดรอกซีอะพาไทต์บนแผ่นคอลลาเจนไม่ทั่วถึงทุกบริเวณ ควรมีการศึกษาถึงวิธีการที่จะทำให้ผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์กระจายตัวอยู่บนแผ่นคอลลาเจนอย่างทั่วถึง อีกทั้งขนาดของรูพรุนในการศึกษานี้ยังมีขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิแช่แข็งให้คงที่ เพราะจากการศึกษาของ O'Brien และคณะ<sup>[50]</sup> กล่าวว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งในการผลิตโครงค้ำยันที่คงที่จะทำให้ขนาดของรูพรุนที่ได้สม่ำเสมอ
2. โครงค้ำยันที่ผลิตได้นี้ยังเป็นขั้นตอนของการประดิษฐ์ขั้นต้นในห้องปฏิบัติการ จึงควรมีการศึกษาถึงความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ การย่อยสลายของโครงค้ำยันทั้งในห้องทดลองและในสิ่งมีชีวิตก่อนการนำไปใช้จริงในทางคลินิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- (1) Karring, T., Nyman, S., and Lindhe, J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **J Clin Periodontol.** 7 (April 1980): 96-105.
- (2) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., and Rylander, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 9 (July 1982): 290-296.
- (3) Rankow, H. J., and Krasner, P. R. Endodontic applications of guided tissue regeneration in endodontic surgery. **J Endod.** 22 (January 1996): 34-43.
- (4) Langer, R., and Vacanti, J. P. Tissue engineering. **Science.** 260 (May 1993): 920-926.
- (5) Sharma, B., and Elisseeff, J. H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. **Ann Biomed Eng.** 32 (January 2004): 148-159.
- (6) Saber, S. E. Tissue engineering in endodontics. **J Oral Sci.** 51 (December 2009): 495-507.
- (7) Badylak, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. **Biomaterials.** 28 (September 2007): 3587-3593.
- (8) Yunoki, S., Nagai, N., Suzuki, T., and Munekata, M. Novel biomaterial from reinforced salmon collagen gel prepared by fibril formation and cross-linking. **J Biosci Bioeng.** 98 (2004): 40-47.
- (9) Rosso, F., et al. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. **J Cell Physiol.** 203 (June 2005): 465-470.
- (10) Yukna, R. A. Synthetic bone grafts in periodontics. **Periodontol 2000.** 1 (February 1993): 92-99.
- (11) Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B., and Cohen, R. E. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. **J Oral Implantol.** 28 (2002): 220-225.

- (12) Kanungo, B. P., Silva, E., Van Vliet, K., and Gibson, L. J. Characterization of mineralized collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone regeneration. **Acta Biomater.** 4 (May 2008): 490-503.
- (13) Xu, Y., et al. Physicochemical and biological properties of modified collagen sponge from porcine skin. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci Ed.** 24 (2009): 619-626.
- (14) Yannas, I. V., Lee, E., Orgill, D. P., Skrabut, E. M., and Murphy, G. F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 86 (February 1989): 933-937.
- (15) Park, S. N., Lee, H. J., Lee, K. H., and Suh, H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. **Biomaterials.** 24 (April 2003): 1631-1641.
- (16) Delbalso, A. M., and Adrian, J. C. Collagen gel in osseous defects. A preliminary study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 42 (November 1976): 562-569.
- (17) Charulatha, V., and Rajaram, A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. **Biomaterials.** 24 (February 2003): 759-767.
- (18) Weadock, K. S., Miller, E. J., Bellincampi, L. D., Zawadsky, J. P., and Dunn, M. G. Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. **J Biomed Mater Res.** 29 (November 1995): 1373-1379.
- (19) Jayakrishnan, A., and Jameela, S. R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials.** 17 (March 1996): 471-484.
- (20) Geiger, M., Li, R. H., and Friess, W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. **Adv Drug Deliv Rev.** 55 (November 2003): 1613-1629.
- (21) Huang-Lee, L. L., Cheung, D. T., and Nimni, M. E. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. **J Biomed Mater Res.** 24 (September 1990): 1185-1201.

- (22) Pieper, J. S., Oosterhof, A., Dijkstra, P. J., Veerkamp, J. H., and Van Kuppevelt, T. H. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. **Biomaterials**. 20 (May 1999): 847-858.
- (23) Wissink, M. J., et al. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. **Biomaterials**. 22 (Jan 2001): 151-163.
- (24) Lupi, O. Prions in dermatology. **J Am Acad Dermatol**. 46 (May 2002): 790-793.
- (25) Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., and Mann, S. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. **Int J Biol Macromol**. 32 (September 2003): 199-204.
- (26) Angele, P., et al. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomaterials**. 25 (June 2004): 2831-2841.
- (27) Kokubo, T., Kim, H. M., and Kawashita, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**. 24 (June 2003): 2161-2175.
- (28) Serre, C. M., Papillard, M., Chavassieux, P., and Boivin, G. In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. **Biomaterials**. 14 (1993): 97-106.
- (29) Rodrigues, C. V., et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**. 24 (December 2003): 4987-4997.
- (30) Van Der Rest, M., and Garrone, R. Collagen family of proteins. **FASEB J**. 5 (October 1991): 2814-2823.
- (31) Watson, S. P. Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes. **Thromb Haemost**. 82 (August 1999): 365-376.
- (32) Murata, M., et al. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 28 (June 1999): 232-237.

- (33) Fujioka, K., Takada, Y, Sato, S., and Miyata, T. Novel delivery system for proteins using collagen as a carrier material: the minipellet. **J Control Release** 33 (1995): 307-315.
- (34) Lee, C. H., Singla, A., and Lee, Y. Biomedical applications of collagen. **Int J Pharm.** 221 (June 19 2001): 1-22.
- (35) Orgill, D. P., and Yannas, I. V. Design of an artificial skin. IV. Use of island graft to isolate organ regeneration from scar synthesis and other processes leading to skin wound closure. **J Biomed Mater Res.** 39 (March 1998): 531-535.
- (36) Friess, W. Collagen--biomaterial for drug delivery. **Eur J Pharm Biopharm.** 45 (March 1998): 113-136.
- (37) Nalinanon, Sitthipong, Benjakul, Soottawat, Visessanguan, Wonnop, and Kishimura, Hideki. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry.** 104 (2007): 593-601.
- (38) Knapp, T. R., Luck, E., and Daniels, J. R. Behavior of solubilized collagen as a bioimplant. **J Surg Res.** 23 (August 1977): 96-105.
- (39) Chu, T. M., Orton, D. G., Hollister, S. J., Feinberg, S. E., and Halloran, J. W. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. **Biomaterials.** 23 (March 2002): 1283-1293.
- (40) Nakashima, M., and Akamine, A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **J Endod.** 31 (October 2005): 711-718.
- (41) Vacanti, C. A., and Bonassar, L. J. An overview of tissue engineered bone. **Clin Orthop Relat Res.** (October 1999): S375-381.
- (42) Mehlisch, D. R., Leider, A. S., and Roberts, W. E. Histologic evaluation of the bone/graft interface after mandibular augmentation with hydroxylapatite/purified fibrillar collagen composite implants. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 70 (December 1990): 685-692.
- (43) Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., and Boccaccini, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.** 27 (June 2006): 3413-3431.

- (44) Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**. 21 (December 2000): 2529-2543.
- (45) O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., and Gibson, L. J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**. 26 (February 2005): 433-441.
- (46) Itala, A. I., Ylanen, H. O., Ekholm, C., Karlsson, K. H., and Aro, H. T. Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. **J Biomed Mater Res**. 58 (2001): 679-683.
- (47) Lien, S. M., Ko, L. Y., and Huang, T. J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Acta Biomater**. 5 (February 2009): 670-679.
- (48) Powell, H. M., and Boyce, S. T. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. **Biomaterials**. 27 (December 2006): 5821-5827.
- (49) Zhang, W. J., Liu, W., Cui, L., and Cao, Y. Tissue engineering of blood vessel. **J Cell Mol Med**. 11 (September-October 2007): 945-957.
- (50) O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., and Gibson, L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**. 25 (March 2004): 1077-1086.
- (51) Saadeh, P. B., et al. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. **J Craniofac Surg**. 12 (November 2001): 573-579.
- (52) Ishaug-Riley, S. L., Okun, L. E., Prado, G., Applegate, M. A., and Ratcliffe, A. Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. **Biomaterials**. 20 (December 1999): 2245-2256.
- (53) Rowlands, A. S., Lim, S. A., Martin, D., and Cooper-White, J. J. Polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation. **Biomaterials**. 28 (April 2007): 2109-2121.
- (54) Mooney, D. J., Baldwin, D. F., Suh, N. P., Vacanti, J. P., and Langer, R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. **Biomaterials**. 17 (July 1996): 1417-1422.

- (55) Partap, S., Rehman, I., Jones, J. , and Darr, J. . “Supercritical Carbon Dioxide in Water” Emulsion-Templated Synthesis of Porous Calcium Alginate Hydrogels. **Adv Mater.** 18 (2006): 501-504.
- (56) Leong, K. F., Cheah, C. M., and Chua, C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials.** 24 (June 2003): 2363-2378.
- (57) Wahl, D. A., and Czernuszka, J. T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. **Eur Cell Mater.** 11 (2006): 43-56.
- (58) Rousseau, C. F., and Gagnieu, C. H. In vitro cytocompatibility of porcine type I atelocollagen crosslinked by oxidized glycogen. **Biomaterials.** 23 (March 2002): 1503-1510.
- (59) Pek, Y. S., Spector, M., Yannas, I. V., and Gibson, L. J. Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. **Biomaterials.** 25 (February 2004): 473-482.
- (60) Lynn, A. K., Yannas, I. V., and Bonfield, W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 71 (November 2004): 343-354.
- (61) Van Wachem, P. B., et al. Tissue regenerating capacity of carbodiimide-crosslinked dermal sheep collagen during repair of the abdominal wall. **Int J Artif Organs.** 17 (April 1994): 230-239.
- (62) Olde Damink, L. H., et al. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. **Biomaterials.** 17 (April 1996): 765-773.
- (63) Kikuchi, M., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K., and Tanaka, J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. **Biomaterials.** 22 (July 2001): 1705-1711.
- (64) Jung, G. Y., Park, Y. J., and Han, J. S. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. **J Mater Sci Mater Med.** 21 (May 2010): 1649-1654.
- (65) Chang, Y. L., Stanford, C. M., and Keller, J. C. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for



- hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. **J Biomed Mater Res.** 52 (November 2000): 270-278.
- (66) Song, J. H., Kim, H. E., and Kim, H. W. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 83 (October 2007): 248-257.
- (67) Tierney, C. M., et al. The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering. **J Mech Behav Biomed Mater.** 2 (April 2009): 202-209.
- (68) Kang, H. W., Tabata, Y., and Ikada, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials.** 20 (July 1999): 1339-1344.
- (69) Murphy, C. M., Haugh, M. G., and O'brien, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.** 31 (January 2010): 461-466.
- (70) Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Sanchavaakit, N., Banaprasert, T., and Kanokpanont, S. Comparison of gelatin and collagen scaffolds for fibroblast cell culture. **J of Metals Materials and Minerals.** 16 (2006): 31-36.
- (71) Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., and Yao, K. D. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. **Biomaterials.** 24 (March 2003): 1067-1074.
- (72) 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 (May 2005): 2775-2785.
- (73) Maeda, S., et al. Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** 54 (December 1995): 970-975.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก  
การวัดขนาดของรูปทรง

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.1 ข้อมูลดิบขนาดของรพุนเพื่อทดสอบความแม่นยำ

ลำดับของรพุน	ครั้งที่ 1 (ไมโครเมตร)	ครั้งที่ 2 (ไมโครเมตร)
No.1	120.47	120.89
No.2	218.96	218.25
No.3	202.29	203.79
No.4	105.75	104.67
No.5	178.35	176.89
No.6	176.66	175.7
No.7	90.02	91.7
No.8	221.68	222.86
No.9	107.89	106.73
No.10	218.09	216.96
No.11	204.71	206.07
No.12	156.33	158.5
NO.13	232.49	231.76
No.14	114.65	112.43
No.15	345.28	347.49
No.16	128.21	129.39
No.17	108.31	109.31
No.18	520.94	522.51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.2 การวิเคราะห์ความแม่นยำในการวัดขนาดของรูปทรงโดยใช้สถิติเพอร์เทส

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		t1	t2
N		18	18
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	191.7267	191.9944
	Std. Deviation	104.22556	104.68882
Most Extreme Differences	Absolute	.237	.241
	Positive	.237	.241
	Negative	-.165	-.169
Kolmogorov-Smirnov Z		1.004	1.022
Asymp. Sig. (2-tailed)		.265	.247

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	t1	191.7267	18	104.22556	24.56620
	t2	191.9944	18	104.68882	24.67539

**Paired Samples Correlations**

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	t1 & t2	18	.999917	.000

**Paired Samples Test**

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	t1 - t2	-.26778	1.42371	.33557	-.97577	.44021	-.798	17	.436

ก.3 ข้อมูลดิบของขนาดรพูนของกลุ่มตัวอย่าง

เส้นรอบวง (หน่วยเป็น ไมโครเมตร)

กลุ่ม 1.5%

slow	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	fast	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	162	302	437	427	357		263	181	270	239	237
	233	290	434	377	362		324	194	280	248	216
	244	321	445	396	236		241	240	237	341	392
	321	373	419	444	308		341	232	228	286	321
	325	328	383	435	384		272	340	316	299	369
	329	334	442	397	436		285	283	300	248	259
	350	340	470	417	420		302	216	319	272	220
	419	366		358	467		426	323	308	274	494
	488	351		402	512		178	211	418		129
	511	456			517		323	263	316		205
	534	454			591			475	306		285
	602	461						449			470
		462									454
		530									233

กลุ่ม 2.0%

slow	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	fast	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	323	488	136	352	425		279	221	327	406	243
	330	286	281	315	368		194	318	281	319	442
	308	216	420	323	400		242	304	210	214	345
	327	375	393	322	323		358	205	257	222	302
	358	286	506	424	374		306	277	257	227	327
	324	382	326	433	289		376	276	199	207	294
	323	270	578	301	297		331	192	352	258	353
	327	768	422		262		318	323	341	309	281
			431				333	207	278	278	497
			332				309	317	374	244	207
							377	306	250	525	310
							358	259	265	382	397
							269	332	202	224	211
							391	212	258	434	224
							248	447	261		201
							459	229			
							231	209			
								623			

กลุ่ม 2.5%

slow	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	fast	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	407	465	443	496	321		281	327	322	265	356
	475	521	504	343	269		297	447	310	224	369
	434	277	423	559	449		281	210	316	305	384
	600	239	575	378	579		229	211	351	378	343
	491	392	438	316	384		281	216	285	191	320
	329	354	448	317	309		287	219	454	481	397
	441	231	458	224	256		265	334	244		362
	271		509	237	445		284	244	316		
	383		464		450		362	224			
			418					380			
								280			
								217			
								209			

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เส้นผ่านศูนย์กลางกลาง (หน่วยเป็น ไมโครเมตร)

กลุ่ม 1.5%

slow	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	fast	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	153	147	153	156	166		139	126	110	128	136
	151	194	142	198	182		135	139	123	147	142
	140	188	120	156	167		137	79	121	127	114
	153	173	195	138	150		86	106	131	122	137
	203	161	158	189	163		132	122	137	131	112
	153	180	194	195	179		139	128	122	126	129
	152	166	174	172	171		145	108	102	122	134
	143	175		164	185		104	141	133	125	107
	177	172		183	189		135	116	123		103
	193	136			199		104	120	139		107
	148	166			178			150	126		129
	188	161						124			128
		147									136
		149									142

กลุ่ม 2.0%

slow	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	fast	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	149	168	135	142	171		122	119	124	124	113
	188	185	135	167	173		129	104	129	108	136
	117	116	199	164	182		127	109	134	113	100
	138	108	177	169	195		123	119	107	116	112
	198	166	180	195	133		124	108	103	114	127
	112	171	154	128	129		162	126	132	132	112
	193	188	187	126	192		117	123	129	129	129
	166	192	120		193		134	146	158	129	114
			179				115	137	109	115	123
			183				106	119	113	126	113
							121	122	140	130	136
							101	126	132	121	100
							103	105	122	149	112
							122	124	125	135	127
							104	105	123		112
							119	111			
							104	109			
								100			



**กลุ่ม 2.5%**

<b>slow</b>	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	<b>fast</b>	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	149	242	189	195	156		133	126	141	114	115
	201	125	131	158	143		111	144	118	115	108
	307	130	162	154	189		129	125	131	119	118
	237	191	240	174	210		144	134	117	134	107
	192	260	185	156	161		132	116	144	124	129
	170	149	138	174	134		97	128	127	117	116
	166	126	172	156	139		134	102	109		123
	130		171	198	153		153	129	127		
	142		183		199		149	126			
			217					105			
								116			
								125			
								143			

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**พื้นที่ (หน่วยเป็น ตารางไมโครเมตร)**

**กลุ่ม 1.5%**

slow	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	fast	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	6823	7347	9143	8756	10895		11421	5136	3100	3098	5178
	9076	10897	7833	8041	7142		5142	2045	8451	4219	2934
	7355	10896	8401	6861	9360		3181	2425	5167	3025	2843
	8404	12398	15321	17432	9176		2670	6725	3915	6178	6934
	15459	7152	6213	7654	6863		3461	5968	2879	7123	5943
	6231	10976	6730	9436	8404		5188	6882	3712	5136	6931
	6024	14507	16380	8149	7415		3066	7570	5217	3098	7819
	17399	9011		12367	5792		3764	7478	3945	4219	7512
	7833	9144		7172	7490		6173	5807	3859		5814
	8020	6464			9405		3104	2191	6182		2814
	6862	8405			8930			5520	3652		5694
	17467	14109						3943			3965
		5624									3391
		6745									5263

**กลุ่ม 2.0%**

slow	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	fast	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	6126	11078	9837	9412	7291		4298	4037	5992	3219	6135
	10050	10722	6943	6529	9481		5985	3028	7589	4105	7597
	7801	7428	6537	7231	8237		7538	4127	3981	4522	3405
	8088	6822	10301	11073	6870		7601	3256	3246	4446	3157
	10200	7280	8520	10729	9814		6135	4298	4181	6639	3098
	9418	9487	6128	7492	6981		7604	5836	3320	5478	3342
	6191	8249	10043	6891	6819		3403	7134	4298	6435	3527
	7289	6859	7849		10041		2430	7349	5885	3833	4591
			8089				3298	6578	6642	3028	4487
			10021				3343	7603	6135	3553	6681
							3102	3314	7600	3198	5492
							3987	3098	4003	4299	6417
							5522	3341	2430	4893	4163
							5446	3187	3088	6649	4178
							7439	3527	3345		4208
							5853	6091			
							7435	5987			
								6681			

**กลุ่ม 2.5%**

<b>slow</b>	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5	<b>fast</b>	ภาพที่ 1	ภาพที่ 2	ภาพที่ 3	ภาพที่ 4	ภาพที่ 5
	8065	22118	7238	7018	7106		4465	3673	5487	7146	4912
	9852	6905	11520	12417	9118		7724	5156	3976	7904	5271
	8492	6901	13451	8120	12543		4991	5480	7754	3698	5287
	7148	9114	9943	7813	7209		4837	4465	5123	5155	6412
	12518	12585	9226	8278	10438		4412	4843	5072	5831	3686
	7376	7207	7901	8554	7269		6760	5165	3821	4012	6123
	7914	10588	9736	20141	10894		5119	3761	7745		6759
	8250		8067	6903	12942		7198	6801	5114		
	8553		9869		9865		7906	7797			
			8492					3690			
								5834			
								5789			
								3821			

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.4 ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาของขนาดรูปทรงของตัวอย่างการศึกษ

**Descriptive statistics (circumferential line)**

Variables	1.5% slow 1.5% fast	2.0% slow 2.0% fast	2.5% slow 2.5% fast
Mean	403.2 292.4	357.6 298.8	398.4 310
Standard deviation	23.424346 12.198361	24.965977 16.422545	48.242098 35.651087
Standard error of mean	10.475686 5.455273	11.165124 7.344386	21.574522 15.943651
Upper 95% CL of mean	432.285167 307.546265	388.599355 319.191283	458.300476 354.266671
Lower 95% CL of mean	374.114833 277.253735	326.600645 278.408717	338.499524 265.733329
Maximum	433 306	384 316	468 362
Upper quartile	417 300	382 309	426 325
Median	406 296	353 303	385 307
Lower quartile	384 284	342 292	359 285
Minimum	376 276	327 274	354 271
Range	57 30	57 42	114 91

**Descriptive statistics (diameter)**

Variables	1.5% slow 1.5% fast	2.0% slow 2.0% fast	2.5% slow 2.5% fast
Mean	167.641509 124.301887	162.512195 121.037975	175.674419 124.511628
Variance	380.157475 219.407112	788.456098 164.857514	1546.462901 168.589147
Standard deviation	19.497627 14.812397	28.07946 12.839685	39.325093 12.984188
Variance coefficient	0.116305 0.119165	0.172784 0.10608	0.223852 0.104281
Standard error of mean	2.678205 2.034639	4.385275 1.444577	5.99702 1.98007
Upper 95% CL of mean	173.015721 128.384689	171.375166 123.913907	187.776896 128.507571
Lower 95% CL of mean	162.267298 120.219084	153.649224 118.162042	163.571941 120.515685
Maximum	203 150	199 162	307 153
Upper quartile	183 135	187 129	195 133
Median	166 126	169 122	170 125
Lower quartile	153 116	135 112	149 116
Minimum	120 79	108 100	125 97
Range	83 71	91 62	182 56

**Descriptive statistics (area)**

Variables	1.5% slow 1.5% fast	2.0% slow 2.0% fast	2.5% slow 2.5% fast
Mean	9384.698113 4919.867925	8347.487805 4878.493671	9666.44186 5487.790698
Standard deviation	3241.432391 1919.63425	1558.590952 1591.276627	3191.475307 1346.134723
Standard error of mean	445.244981 263.682043	243.411012 179.032608	486.695422 205.283621
Upper 95% CL of mean	10278.147532 5448.984654	8839.439811 5234.920214	10648.632985 5902.069817
Lower 95% CL of mean	8491.248694 4390.751195	7855.535798 4522.067128	8684.250735 5073.511579
Maximum	17467 11421	11078 7604	22118 7906
Upper quartile	10895 6173	9837 6135	10588 6759
Median	8404 5136	8088 4298	8553 5156
Lower quartile	7152 3181	6943 3343	7376 4465
Minimum	5624 2045	6126 2430	6901 3673
Range	11843 9376	4952 5174	15217 4233

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.5 แสดงการวิเคราะห์ขนาดของรูปวงกลมโดยใช้ สถิติครุสคัล-วัลลิส

### **Kruskal-Wallis test (circumferential line)**

Variables: 1.5% slow, 2.0% slow, 2.5% slow, 1.5% fast, 2.0% fast, 2.5% fast

Groups = 6

df = 5

Total observations = 30

T = 21.925161

P = 0.0005

Adjusted for ties:

T = 21.93004

P = 0.0005

At least one of your sample populations tends to yield larger observations than at least one other sample population.

Kruskal-Wallis: all pairwise comparisons (Conover-Inman)

Critical t (24 df) = 2.063899

1.5% slow and 2.0% slow (6.6 > 6.239099)	significant P = 0.039
1.5% slow and 2.5% slow (1.3 > 6.239099)	not significant P = 0.671
1.5% slow and 1.5% fast (18.9 > 6.239099)	significant P < 0.0001
1.5% slow and 2.0% fast (16.9 > 6.239099)	significant P < 0.0001
1.5% slow and 2.5% fast (15.1 > 6.239099)	significant P < 0.0001
2.0% slow and 2.5% slow (5.3 > 6.239099)	not significant P = 0.0923
2.0% slow and 1.5% fast (12.3 > 6.239099)	significant P = 0.0004
2.0% slow and 2.0% fast (10.3 > 6.239099)	significant P = 0.0023
2.0% slow and 2.5% fast (8.5 > 6.239099)	significant P = 0.0097
2.5% slow and 1.5% fast (17.6 > 6.239099)	significant P < 0.0001
2.5% slow and 2.0% fast (15.6 > 6.239099)	significant P < 0.0001
2.5% slow and 2.5% fast (13.8 > 6.239099)	significant P = 0.0001
1.5% fast and 2.0% fast (2 > 6.239099)	not significant P = 0.5145
1.5% fast and 2.5% fast (3.8 > 6.239099)	not significant P = 0.2208
2.0% fast and 2.5% fast (1.8 > 6.239099)	not significant P = 0.5571

**Kruskal-Wallis test (diameter)**

Variables: 1.5%slow/diameter, 2.0%slow/diameter, 2.5%slow/diameter, 1.5%fast/diameter, 2.0%fast/diameter, 2.5%fast/diameter

Groups = 6

df = 5

Total observations = 312

T = 175.634834

P < 0.0001

Adjusted for ties:

T = 175.685125

P < 0.0001

At least one of your sample populations tends to yield larger observations than at least one other sample population.

Kruskal-Wallis: all pairwise comparisons (Conover-Inman)

Critical t (306 df) = 1.967747

1.5%slow/diameter and 2.0%slow/diameter	not significant
(23.447308 > 24.555843)	P = 0.0612
1.5%slow/diameter and 2.5%slow/diameter	not significant
(0.96007 > 24.23172)	P = 0.9379
1.5%slow/diameter and 1.5%fast/diameter	significant
(131.783019 > 22.934953)	P < 0.0001
1.5%slow/diameter and 2.0%fast/diameter	significant
(152.648913 > 20.963137)	P < 0.0001
1.5%slow/diameter and 2.5%fast/diameter	significant
(135.832163 > 24.23172)	P < 0.0001
2.0%slow/diameter and 2.5%slow/diameter	not significant
(22.487238 > 25.771178)	P = 0.087
2.0%slow/diameter and 1.5%fast/diameter	significant
(108.335711 > 24.555843)	P < 0.0001
2.0%slow/diameter and 2.0%fast/diameter	significant
(129.201605 > 22.725107)	P < 0.0001
2.0%slow/diameter and 2.5%fast/diameter	significant
(112.384855 > 25.771178)	P < 0.0001
2.5%slow/diameter and 1.5%fast/diameter	significant
(130.822949 > 24.23172)	P < 0.0001
2.5%slow/diameter and 2.0%fast/diameter	significant
(151.688843 > 22.374479)	P < 0.0001
2.5%slow/diameter and 2.5%fast/diameter	significant
(134.872093 > 25.46253)	P < 0.0001
1.5%fast/diameter and 2.0%fast/diameter	not significant
(20.865894 > 20.963137)	P = 0.0511
1.5%fast/diameter and 2.5%fast/diameter	not significant
(4.049144 > 24.23172)	P = 0.7425
2.0%fast/diameter and 2.5%fast/diameter	not significant
(16.81675 > 22.374479)	P = 0.1402



**Kruskal-Wallis test (area)**

Variables: 1.5% slow, 2.0% slow, 2.5% slow, 1.5% fast, 2.0% fast, 2.5% fast

Groups = 6

df = 5

Total observations = 312

T = 177.561559

P < 0.0001

Adjusted for ties:

T = 177.562331

P < 0.0001

At least one of your sample populations tends to yield larger observations than at least one other sample population.

Kruskal-Wallis: all pairwise comparisons (Conover-Inman)

Critical t (306 df) = 1.967747

1.5% slow and 2.0% slow (8.198803 > 24.380459)	not significant P = 0.5086
1.5% slow and 2.5% slow (15.283896 > 24.058651)	not significant P = 0.2122
1.5% slow and 1.5% fast (139.056604 > 22.771145)	significant P < 0.0001
1.5% slow and 2.0% fast (138.814426 > 20.813413)	significant P < 0.0001
1.5% slow and 2.5% fast (116.669592 > 24.058651)	significant P < 0.0001
2.0% slow and 2.5% slow (23.4827 > 25.587114)	not significant P = 0.0719
2.0% slow and 1.5% fast (130.8578 > 24.380459)	significant P < 0.0001
2.0% slow and 2.0% fast (130.615622 > 22.562798)	significant P < 0.0001
2.0% slow and 2.5% fast (108.470788 > 25.587114)	significant P < 0.0001
2.5% slow and 1.5% fast (154.3405 > 24.058651)	significant P < 0.0001
2.5% slow and 2.0% fast (154.098322 > 22.214674)	significant P < 0.0001
2.5% slow and 2.5% fast (131.953488 > 25.28067)	significant P < 0.0001
1.5% fast and 2.0% fast (0.242178 > 20.813413)	not significant P = 0.9817
1.5% fast and 2.5% fast (22.387012 > 24.058651)	not significant P = 0.0681
2.0% fast and 2.5% fast (22.144834 > 22.214674)	not significant P = 0.0507



ภาคผนวก ข  
การทดสอบการดูหน้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข.1 ข้อมูลดิบค่าการดูดน้ำของตัวอย่างการศึกษา (หน่วย กรัม)

	ขั้นที่ 1				ขั้นที่ 2				ขั้นที่ 3			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% -slow	0.009	0.00888	0.00896		0.00744	0.00737	0.00737		0.00855	0.0086	0.00856	
หลังแช่	0.06057	0.06073	0.0607		0.0566	0.05662	0.05675		0.05861	0.05814	0.05837	
ผลต่าง	0.05157	0.05185	0.05174	0.05172	0.04916	0.04925	0.04938	0.04926	0.05006	0.04954	0.04981	0.04980
1.5% - fast	0.008	0.00801	0.00799		0.00734	0.0074	0.00736		0.00826	0.0083	0.00826	
หลังแช่	0.07216	0.07177	0.07138		0.07325	0.07211	0.07196		0.07646	0.07686	0.07623	
ผลต่าง	0.06416	0.06376	0.06339	0.06377	0.06591	0.06471	0.0646	0.06507	0.0682	0.06856	0.06797	0.06824
2% - slow	0.00698	0.00691	0.00685		0.00681	0.00683	0.00684		0.00671	0.00673	0.00677	
หลังแช่	0.07428	0.07406	0.074		0.07672	0.07361	0.07609		0.07277	0.07595	0.07016	
ผลต่าง	0.0673	0.06715	0.06715	0.06720	0.06991	0.06678	0.06925	0.06865	0.06606	0.06922	0.06339	0.06622
2% - fast	0.00788	0.00778	0.00782		0.0086	0.00859	0.00857		0.00701	0.00696	0.00707	
หลังแช่	0.0828	0.08314	0.08911		0.09953	0.09986	0.09818		0.08483	0.08059	0.07678	
ผลต่าง	0.07492	0.07536	0.08129	0.07719	0.09093	0.09127	0.08961	0.09060	0.07782	0.07363	0.06971	0.07372
2.5% - slow	0.00824	0.00832	0.00825		0.00769	0.00764	0.00762		0.00742	0.00741	0.00738	
หลังแช่	0.09763	0.09753	0.09747		0.0925	0.0934	0.0928		0.0876	0.08781	0.08748	
ผลต่าง	0.08939	0.08921	0.08922	0.08927	0.08481	0.08576	0.08518	0.08525	0.08018	0.0804	0.0801	0.08023
2.5% - fast	0.0061	0.00606	0.00601		0.00518	0.00517	0.00514		0.00551	0.00556	0.0055	
หลังแช่	0.07635	0.07655	0.07692		0.07678	0.07657	0.07661		0.08083	0.08035	0.08112	
ผลต่าง	0.07025	0.07049	0.07091	0.07055	0.0716	0.0714	0.07147	0.07149	0.07532	0.07479	0.07562	0.07524

ข.1 ข้อมูลดิบค่าการดูดน้ำของตัวอย่างการศึกษา (หน่วย กรัม) ต่อ

	ชั้นที่ 4				ชั้นที่ 5			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% -slow	0.0086	0.00851	0.00858		0.00847	0.00851	0.00846	
หลังแช่	0.0676	0.06754	0.06765		0.06009	0.06002	0.06001	
ผลต่าง	0.059	0.05903	0.05907	0.05903	0.05162	0.05151	0.05155	0.05156
1.5% - fast	0.00835	0.00839	0.00839		0.00861	0.00854	0.00862	
หลังแช่	0.07344	0.07436	0.07436		0.07972	0.07947	0.07957	
ผลต่าง	0.06509	0.06597	0.06597	0.06568	0.07111	0.07093	0.07095	0.07100
2% - slow	0.00662	0.00677	0.00676		0.00652	0.00652	0.00658	
หลังแช่	0.07448	0.07432	0.07413		0.07045	0.07061	0.07807	
ผลต่าง	0.06786	0.06755	0.06737	0.06759	0.06393	0.06409	0.07149	0.06650
2% - fast	0.00788	0.00791	0.00794		0.0084	0.00844	0.00844	
หลังแช่	0.09216	0.08281	0.09087		0.09673	0.09886	0.09671	
ผลต่าง	0.08428	0.0749	0.08293	0.08070	0.08833	0.09042	0.08827	0.08901
2.5% - slow	0.00846	0.00842	0.00849		0.00822	0.00893	0.0082	
หลังแช่	0.09969	0.09958	0.09851		0.09931	0.09951	0.09979	
ผลต่าง	0.09123	0.09116	0.09002	0.09080	0.09109	0.09058	0.09159	0.09109
2.5% - fast	0.00518	0.00507	0.00516		0.00523	0.00529	0.00529	
หลังแช่	0.06746	0.06776	0.06749		0.06748	0.06773	0.06725	
ผลต่าง	0.06228	0.06269	0.06233	0.06243	0.06225	0.06244	0.06196	0.06222

ข.2 ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาร้อยละของการดูหน้าของตัวอย่างการศึกษ

Descriptive statistics

Variables	WA1.5%-slow WA1.5%-fast	WA2.0%-slow WA2.0%-fast	WA2.5%-slow WA2.5%-fast
Valid data	5 5	5 5	5 5
Missing data	0 0	0 0	0 0
Mean	624.85 823.176	996.78 1033.812	1085.844 1261.54
Standard deviation	50.548302 38.225697	18.540777 30.438222	16.341311 104.064264
Standard error of mean	22.605888 17.095052	8.291687 13.612387	7.308056 46.538954
Upper 95% CL of mean	687.614007 870.639472	1019.801415 1071.606045	1106.134417 1390.75285
Lower 95% CL of mean	562.085993 775.712528	973.758585 996.017955	1065.553583 1132.32715
Maximum	689.37 883.35	1016.87 1056.25	1114.38 1384.57
Upper quartile	666.32 826.5	1006.4 1055.16	1083.66 1362.28
Median	609.33 824.86	1005.57 1051.14	1079.48 1215.44
Lower quartile	581.14 797.13	983.03 1020.27	1077.95 1180.58
Minimum	578.09 784.04	972.03 986.24	1073.75 1164.83
Range	111.28 99.31	44.84 70.01	40.63 219.74

๗.3 แสดงการวิเคราะห์ค่าการดูดน้ำ โดยใช้สถิติ ครุสคัล-วัลลิส

**Kruskal-Wallis test**

**Variables: WA1.5%-slow, WA2.0%-slow, WA2.5%-slow, WA1.5%-fast, WA2.0%-fast, WA2.5%-fast**

Groups = 6

df = 5

Total observations = 30

T = 27.885161

P < 0.0001

At least one of your sample populations tends to yield larger observations than at least one other sample population.

Kruskal-Wallis: all pairwise comparisons (Conover-Inman)

Critical t (24 df) = 2.063899

wa1.5%-slow and WA2.0%-slow (10.6 > 2.476678)	significant P < 0.0001
wa1.5%-slow and WA2.5%-slow (20 > 2.476678)	significant P < 0.0001
wa1.5%-slow and WA1.5%-fast (5 > 2.476678)	significant P = 0.0003
wa1.5%-slow and WA2.0%-fast (14.4 > 2.476678)	significant P < 0.0001
wa1.5%-slow and WA2.5%-fast (25 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA2.0%-slow and WA2.5%-fast (9.4 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA2.0%-slow and WA1.5%-fast (5.6 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA2.0%-slow and WA2.0%-fast (3.8 > 2.476678)	significant P = 0.0042
WA2.0%-slow and WA2.5%-fast (14.4 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA2.5%-slow and WA1.5%-fast (15 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA2.5%-20 and WA2.0%-80 (5.6 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA2.5%-slow and WA2.5%-fast (5 > 2.476678)	significant P = 0.0003
WA1.5%-fast and WA2.0%-fast (9.4 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA1.5%-fast and WA2.5%-fast (20 > 2.476678)	significant P < 0.0001
WA2.0%-fast and WA2.5%-fast (10.6 > 2.476678)	significant P < 0.0001



ภาคผนวก ค  
การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.1 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์

	ขั้นที่ 1				ขั้นที่ 2				ขั้นที่ 3			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00623	0.0062	0.00615		0.00662	0.00668	0.00664		0.00664	0.00645	0.00645	
หลังแช่	0.00376	0.00384	0.00381		0.004	0.00398	0.00399		0.0039	0.00387	0.00393	
ผลต่าง	0.00247	0.00236	0.00234	0.00239	0.00262	0.0027	0.00265	0.00266	0.00274	0.00258	0.00252	0.00261
1.5% - fast	0.00654	0.00651	0.00649		0.00646	0.00649	0.00642		0.00679	0.00674	0.00679	
หลังแช่	0.00518	0.00525	0.00523		0.00511	0.00517	0.00513		0.00541	0.00539	0.00542	
ผลต่าง	0.00136	0.00126	0.00126	0.00129	0.00135	0.00132	0.00129	0.00132	0.00138	0.00135	0.00137	0.00137
2% - slow	0.00598	0.00591	0.00595		0.00584	0.00576	0.00573		0.00593	0.00594	0.00593	
หลังแช่	0.00471	0.00477	0.00473		0.00463	0.00462	0.00461		0.00476	0.0047	0.00469	
ผลต่าง	0.00127	0.00114	0.00122	0.00121	0.00121	0.00114	0.00112	0.00116	0.00117	0.00124	0.00124	0.00122
2% - fast	0.00678	0.00679	0.00676		0.00605	0.00599	0.00602		0.00674	0.00671	0.00666	
หลังแช่	0.00557	0.00558	0.00559		0.00475	0.00478	0.0048		0.00536	0.00539	0.00532	
ผลต่าง	0.00121	0.00121	0.00117	0.00120	0.0013	0.00121	0.00122	0.00124	0.00138	0.00132	0.00134	0.00135
2.5% - slow	0.00651	0.00658	0.00657		0.00676	0.00674	0.00672		0.00626	0.00625	0.00619	
หลังแช่	0.0059	0.00592	0.00589		0.00605	0.00606	0.00607		0.00558	0.00556	0.00557	
ผลต่าง	0.00061	0.00066	0.00068	0.00065	0.00071	0.00068	0.00065	0.00068	0.00068	0.00065	0.00062	0.00065
2.5% - fast	0.0063	0.0063	0.00633		0.00674	0.00679	0.00674		0.00584	0.00579	0.0058	
หลังแช่	0.00567	0.00568	0.00565		0.00604	0.00603	0.00605		0.00522	0.00523	0.00525	
ผลต่าง	0.00063	0.00062	0.00068	0.00064	0.0007	0.00076	0.00069	0.00072	0.00062	0.00056	0.00055	0.00058

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ค.1 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ต่อ)

	ชั้นที่ 4				ชั้นที่ 5			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00686	0.00685	0.00658		0.00621	0.00619	0.00621	
หลังแช่	0.00423	0.00429	0.00424		0.0037	0.00372	0.00378	
ผลต่าง	0.00263	0.00256	0.00234	0.00251	0.00251	0.00247	0.00243	0.00247
1.5% - fast	0.00653	0.00653	0.00655		0.00661	0.00664	0.00662	
หลังแช่	0.00519	0.00521	0.00526		0.0053	0.00539	0.00538	
ผลต่าง	0.00134	0.00132	0.00129	0.00132	0.00131	0.00125	0.00124	0.00127
2% - slow	0.00567	0.00577	0.00576		0.00575	0.00572	0.00578	
หลังแช่	0.00448	0.00445	0.00449		0.00458	0.00456	0.00459	
ผลต่าง	0.00119	0.00132	0.00127	0.00126	0.00117	0.00116	0.00119	0.00117
2% - fast	0.00578	0.00578	0.00579		0.00568	0.00566	0.00565	
หลังแช่	0.00453	0.00458	0.00459		0.00458	0.00453	0.00455	
ผลต่าง	0.00125	0.0012	0.0012	0.00122	0.0011	0.00113	0.0011	0.00111
2.5% - slow	0.00671	0.00666	0.0067		0.00589	0.00593	0.00597	
หลังแช่	0.00599	0.00602	0.00597		0.00531	0.00529	0.00533	
ผลต่าง	0.00072	0.00064	0.00073	0.00070	0.00058	0.00064	0.00064	0.00062
2.5% - fast	0.00574	0.00584	0.00574		0.00593	0.00598	0.00596	
หลังแช่	0.00519	0.0052	0.00521		0.00531	0.00529	0.00536	
ผลต่าง	0.00055	0.00064	0.00053	0.00057	0.00062	0.00069	0.0006	0.00064

ค.2 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์

	ชั้นที่ 1				ชั้นที่ 2				ชั้นที่ 3			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00651	0.00651	0.0065		0.00696	0.00692	0.00693		0.00691	0.00691	0.00687	
หลังแช่	0.00396	0.00395	0.00389		0.00417	0.00418	0.00415		0.00416	0.00417	0.00415	
ผลต่าง	0.0026	0.0026	0.0026	0.00257	0.0028	0.0027	0.0028	0.00277	0.0028	0.0027	0.0027	0.00274
1.5% - fast	0.00587	0.00587	0.00584		0.00604	0.00605	0.00607		0.00595	0.00598	0.00597	
หลังแช่	0.00348	0.00347	0.00346		0.00361	0.00363	0.00367		0.00357	0.00354	0.00358	
ผลต่าง	0.0024	0.0024	0.0024	0.00239	0.0024	0.0024	0.0024	0.00242	0.0024	0.0024	0.0024	0.00240
2% - slow	0.00584	0.00578	0.00577		0.00638	0.00635	0.00629		0.00611	0.00619	0.00613	
หลังแช่	0.00428	0.00422	0.00429		0.00481	0.00482	0.00483		0.00467	0.00465	0.00461	
ผลต่าง	0.0016	0.0016	0.0015	0.00153	0.0016	0.0015	0.0015	0.00152	0.0014	0.0015	0.0015	0.00150
2% - fast	0.00635	0.00641	0.00639		0.00608	0.00606	0.00605		0.00637	0.00637	0.00636	
หลังแช่	0.00498	0.00499	0.00496		0.00477	0.00473	0.00472		0.00493	0.00495	0.00498	
ผลต่าง	0.0014	0.0014	0.0014	0.00141	0.0013	0.0013	0.0013	0.00132	0.0014	0.0014	0.0014	0.00141
2.5% - slow	0.00664	0.00662	0.00658		0.00595	0.00594	0.00599		0.00673	0.00671	0.00674	
หลังแช่	0.00543	0.00544	0.00541		0.00489	0.00483	0.00485		0.00546	0.00549	0.00547	
ผลต่าง	0.0012	0.0012	0.0012	0.00119	0.0011	0.0011	0.0011	0.00110	0.0013	0.0012	0.0013	0.00125
2.5% - fast	0.00594	0.00601	0.00596		0.00584	0.00581	0.00588		0.00595	0.00594	0.006	
หลังแช่	0.00509	0.00503	0.00503		0.00493	0.00492	0.00496		0.00506	0.00507	0.00504	
ผลต่าง	0.0009	0.001	0.0009	0.00092	0.0009	0.0009	0.0009	0.00091	0.0009	0.0009	0.001	0.00091

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.2 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ต่อ)

	ขั้นที่ 4				ขั้นที่ 5			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00663	0.00666	0.0067		0.00696	0.00697	0.0069	
หลังแช่	0.00392	0.00391	0.00389		0.00413	0.00416	0.00418	
ผลต่าง	0.0027	0.0028	0.0028	0.00276	0.0028	0.0028	0.0027	0.00279
1.5% - fast	0.0059	0.00587	0.00594		0.00592	0.00594	0.00593	
หลังแช่	0.00349	0.00348	0.00346		0.00356	0.00359	0.00355	
ผลต่าง	0.0024	0.0024	0.0025	0.00243	0.0024	0.0024	0.0024	0.00236
2% - slow	0.00661	0.00662	0.00656		0.0066	0.00663	0.00663	
หลังแช่	0.00501	0.00499	0.00504		0.00517	0.00518	0.00514	
ผลต่าง	0.0016	0.0016	0.0015	0.00158	0.0014	0.0015	0.0015	0.00146
2% - fast	0.00598	0.00594	0.00593		0.00507	0.005	0.00507	
หลังแช่	0.00468	0.00463	0.00465		0.00367	0.00365	0.00369	
ผลต่าง	0.0013	0.0013	0.0013	0.00130	0.0014	0.0014	0.0014	0.00138
2.5% - slow	0.00648	0.00649	0.00644		0.0062	0.00612	0.00615	
หลังแช่	0.00526	0.00529	0.00524		0.00492	0.00498	0.00499	
ผลต่าง	0.0012	0.0012	0.0012	0.00121	0.0013	0.0011	0.0012	0.00119
2.5% - fast	0.00659	0.00659	0.00658		0.00603	0.00596	0.006	
หลังแช่	0.00569	0.00564	0.00563		0.00506	0.00502	0.00501	
ผลต่าง	0.0009	0.001	0.001	0.00093	0.001	0.0009	0.001	0.00097

ค.3 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์

	ขั้นที่ 1				ขั้นที่ 2				ขั้นที่ 3			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00652	0.00667	0.00663		0.00609	0.00598	0.00601		0.00620	0.00626	0.00631	
หลังแช่	0.00186	0.00189	0.00187		0.00180	0.00176	0.00178		0.00186	0.00183	0.00187	
ผลต่าง	0.00466	0.00478	0.00476	0.00473	0.00429	0.00422	0.00423	0.00425	0.00434	0.00443	0.00444	0.00440
1.5% - fast	0.00627	0.00628	0.00625		0.00676	0.00678	0.00681		0.00622	0.00612	0.00617	
หลังแช่	0.00255	0.00253	0.00249		0.00282	0.00286	0.00281		0.00243	0.00249	0.00246	
ผลต่าง	0.00372	0.00375	0.00376	0.00374	0.00394	0.00392	0.00400	0.00395	0.00379	0.00363	0.00371	0.00371
2% - slow	0.00677	0.00671	0.00680		0.00630	0.00633	0.00633		0.00666	0.00660	0.00670	
หลังแช่	0.00405	0.00408	0.00403		0.00379	0.00375	0.00373		0.00396	0.00394	0.00399	
ผลต่าง	0.00272	0.00263	0.00277	0.00271	0.00251	0.00258	0.00260	0.00256	0.00270	0.00266	0.00271	0.00269
2% - fast	0.00613	0.00619	0.00612		0.00601	0.00610	0.00600		0.00641	0.00643	0.00641	
หลังแช่	0.00456	0.00453	0.00450		0.00428	0.00423	0.00424		0.00447	0.00449	0.00446	
ผลต่าง	0.00157	0.00166	0.00162	0.00162	0.00173	0.00187	0.00176	0.00179	0.00194	0.00194	0.00195	0.00194
2.5% - slow	0.00684	0.00698	0.00683		0.00685	0.00690	0.00687		0.00691	0.00690	0.00694	
หลังแช่	0.00552	0.00551	0.00556		0.00549	0.00542	0.00546		0.00552	0.00551	0.00552	
ผลต่าง	0.00132	0.00147	0.00127	0.00135	0.00136	0.00148	0.00141	0.00142	0.00139	0.00139	0.00142	0.00140
2.5% - fast	0.00629	0.00630	0.00634		0.00620	0.00617	0.00618		0.00673	0.00670	0.00671	
หลังแช่	0.00504	0.00503	0.00506		0.00484	0.00489	0.00483		0.00552	0.00550	0.00551	
ผลต่าง	0.00125	0.00127	0.00128	0.00127	0.00136	0.00128	0.00135	0.00133	0.00121	0.00120	0.00120	0.00120

ค.3 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ (ต่อ)

	ขั้นที่ 4				ขั้นที่ 5			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00685	0.00686	0.00689		0.00618	0.00610	0.00617	
หลังแช่	0.00208	0.00210	0.00205		0.00187	0.00184	0.00183	
ผลต่าง	0.00477	0.00476	0.00484	0.00479	0.00431	0.00426	0.00434	0.00430
1.5% - fast	0.00616	0.00618	0.00623		0.00592	0.00594	0.00593	
หลังแช่	0.00247	0.00243	0.00244		0.00231	0.00232	0.00235	
ผลต่าง	0.00369	0.00375	0.00379	0.00374	0.00361	0.00362	0.00358	0.00360
2% - slow	0.00585	0.00588	0.00589		0.00709	0.00702	0.00705	
หลังแช่	0.00344	0.00342	0.00343		0.00433	0.00435	0.00433	
ผลต่าง	0.00241	0.00246	0.00246	0.00244	0.00276	0.00267	0.00272	0.00272
2% - fast	0.00651	0.00659	0.00673		0.00662	0.00657	0.00663	
หลังแช่	0.00463	0.00465	0.00462		0.00465	0.00462	0.00465	
ผลต่าง	0.00188	0.00194	0.00211	0.00198	0.00197	0.00195	0.00198	0.00197
2.5% - slow	0.00623	0.00623	0.00624		0.00653	0.00653	0.00655	
หลังแช่	0.00495	0.00496	0.00498		0.00521	0.00523	0.00522	
ผลต่าง	0.00128	0.00127	0.00126	0.00127	0.00132	0.00130	0.00133	0.00132
2.5% - fast	0.00679	0.00673	0.00675		0.00621	0.00617	0.00625	
หลังแช่	0.00547	0.00543	0.00542		0.00499	0.00497	0.00495	
ผลต่าง	0.00132	0.00130	0.00133	0.00132	0.00122	0.00120	0.00130	0.00124

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.4 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

	ชั้นที่ 1				ชั้นที่ 2				ชั้นที่ 3			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00688	0.00695	0.00692		0.00634	0.00637	0.00628		0.00676	0.00672	0.00677	
หลังแช่	0.00132	0.00136	0.00139		0.00158	0.00156	0.00158		0.00156	0.00153	0.00152	
ผลต่าง	0.00556	0.00559	0.00553	0.00556	0.00476	0.00481	0.00470	0.00476	0.00520	0.00519	0.00525	0.00521
1.5% - fast	0.00625	0.00631	0.00624		0.00673	0.00670	0.00670		0.00655	0.00652	0.00650	
หลังแช่	0.00167	0.00163	0.00168		0.00164	0.00163	0.00161		0.00157	0.00154	0.00156	
ผลต่าง	0.00458	0.00468	0.00456	0.00461	0.00509	0.00507	0.00509	0.00508	0.00498	0.00498	0.00494	0.00497
2% - slow	0.00672	0.00671	0.00663		0.00624	0.00523	0.00629		0.00607	0.00598	0.00601	
หลังแช่	0.00307	0.00305	0.00303		0.00298	0.00291	0.00296		0.00298	0.00303	0.00307	
ผลต่าง	0.00365	0.00366	0.00360	0.00364	0.00326	0.00232	0.00333	0.00297	0.00309	0.00295	0.00294	0.00299
2% - fast	0.00625	0.00628	0.00621		0.00567	0.00566	0.00562		0.00690	0.00689	0.00688	
หลังแช่	0.00381	0.00385	0.00384		0.00336	0.00339	0.00334		0.00407	0.00413	0.00409	
ผลต่าง	0.00244	0.00243	0.00237	0.00241	0.00231	0.00227	0.00228	0.00229	0.00283	0.00276	0.00279	0.00279
2.5% - slow	0.00627	0.00634	0.00631		0.00586	0.00583	0.00582		0.00603	0.00595	0.00594	
หลังแช่	0.00446	0.00441	0.00443		0.00416	0.00412	0.00418		0.00425	0.00423	0.00428	
ผลต่าง	0.00181	0.00193	0.00188	0.00187	0.00170	0.00171	0.00164	0.00168	0.00178	0.00172	0.00166	0.00172
2.5% - fast	0.00626	0.00626	0.00627		0.00592	0.00595	0.00591		0.00619	0.00619	0.00614	
หลังแช่	0.00502	0.00507	0.00504		0.00498	0.00494	0.00495		0.00500	0.00501	0.00503	
ผลต่าง	0.00124	0.00119	0.00123	0.00122	0.00094	0.00101	0.00096	0.00097	0.00119	0.00118	0.00111	0.00116

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.4 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ต่อ)

	ชั้นที่ 4				ชั้นที่ 5			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00612	0.00606	0.00613		0.00650	0.00652	0.00658	
หลังแช่	0.00145	0.00148	0.00145		0.00138	0.00134	0.00133	
ผลต่าง	0.00467	0.00458	0.00468	0.00464	0.00512	0.00518	0.00525	0.00518
1.5% - fast	0.00654	0.00656	0.00658		0.00633	0.00634	0.00625	
หลังแช่	0.00169	0.00173	0.00171		0.00156	0.00157	0.00157	
ผลต่าง	0.00485	0.00483	0.00487	0.00485	0.00477	0.00477	0.00468	0.00474
2% - slow	0.00634	0.00635	0.00639		0.00631	0.00630	0.00630	
หลังแช่	0.00321	0.00318	0.00319		0.00319	0.00315	0.00316	
ผลต่าง	0.00313	0.00317	0.00320	0.00317	0.00312	0.00315	0.00314	0.00314
2% - fast	0.00644	0.00647	0.00646		0.00653	0.00655	0.00648	
หลังแช่	0.00385	0.00381	0.00381		0.00398	0.00397	0.00399	
ผลต่าง	0.00259	0.00266	0.00265	0.00263	0.00255	0.00258	0.00249	0.00254
2.5% - slow	0.00616	0.00612	0.00610		0.00627	0.00629	0.00629	
หลังแช่	0.00426	0.00429	0.00426		0.00452	0.00449	0.00410	
ผลต่าง	0.00190	0.00183	0.00184	0.00186	0.00175	0.00180	0.00219	0.00191
2.5% - fast	0.00659	0.00658	0.00652		0.00653	0.00646	0.00648	
หลังแช่	0.00533	0.00532	0.00536		0.00524	0.00525	0.00522	
ผลต่าง	0.00126	0.00126	0.00116	0.00123	0.00129	0.00121	0.00126	0.00125

ค.5 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์

	ชั้นที่ 1				ชั้นที่ 2				ชั้นที่ 3			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00733	0.00730	0.00726		0.00716	0.00726	0.00727		0.00635	0.00644	0.00637	
หลังแช่	0.00154	0.00153	0.00155		0.00162	0.00159	0.00158		0.00132	0.00134	0.00137	
ผลต่าง	0.00579	0.00577	0.00571	0.00576	0.00554	0.00567	0.00569	0.00563	0.00503	0.00510	0.00500	0.00504
1.5% - fast	0.00630	0.00628	0.00629		0.00671	0.00667	0.00671		0.00655	0.00657	0.00654	
หลังแช่	0.00120	0.00118	0.00119		0.00124	0.00126	0.00125		0.00125	0.00128	0.00126	
ผลต่าง	0.00510	0.00510	0.00510	0.00510	0.00547	0.00541	0.00546	0.00545	0.00530	0.00529	0.00528	0.00529
2% - slow	0.00664	0.00670	0.00671		0.00681	0.00689	0.00684		0.00652	0.00658	0.00655	
หลังแช่	0.00332	0.00326	0.00328		0.00348	0.00350	0.00349		0.00341	0.00340	0.00349	
ผลต่าง	0.00332	0.00344	0.00343	0.00340	0.00333	0.00339	0.00335	0.00336	0.00311	0.00318	0.00306	0.00312
2% - fast	0.00630	0.00636	0.00631		0.00680	0.00579	0.00589		0.00627	0.00625	0.00619	
หลังแช่	0.00367	0.00366	0.00464		0.00375	0.00376	0.00372		0.00387	0.00386	0.00385	
ผลต่าง	0.00263	0.00270	0.00167	0.00233	0.00305	0.00203	0.00217	0.00242	0.00240	0.00239	0.00234	0.00238
2.5% - slow	0.00688	0.00689	0.00688		0.00663	0.00653	0.00654		0.00695	0.00611	0.00696	
หลังแช่	0.00483	0.00486	0.00488		0.00475	0.00473	0.00478		0.00481	0.00480	0.00439	
ผลต่าง	0.00205	0.00203	0.00200	0.00203	0.00188	0.00180	0.00176	0.00181	0.00214	0.00131	-0.00257	0.00201
2.5% - fast	0.00672	0.00668	0.00663		0.00638	0.00637	0.00622		0.00647	0.00649	0.00645	
หลังแช่	0.00460	0.00461	0.00462		0.00435	0.00438	0.00437		0.00459	0.00460	0.00458	
ผลต่าง	0.00212	0.00207	0.00201	0.00207	0.00203	0.00199	0.00185	0.00196	0.00188	0.00189	0.00187	0.00188



ค.5 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์ (ต่อ)

	ชั้นที่ 4				ชั้นที่ 5			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00661	0.00669	0.00669		0.00673	0.00678	0.00670	
หลังแช่	0.00139	0.00135	0.00136		0.00131	0.00132	0.00133	
ผลต่าง	0.00522	0.00534	0.00533	0.00530	0.00542	0.00546	0.00537	0.00542
1.5% - fast	0.00660	0.00665	0.00660		0.00659	0.00666	0.00656	
หลังแช่	0.00132	0.00133	0.00136		0.00119	0.00120	0.00117	
ผลต่าง	0.00528	0.00532	0.00524	0.00528	0.00540	0.00546	0.00539	0.00542
2% - slow	0.00672	0.00673	0.00672		0.00648	0.00650	0.00644	
หลังแช่	0.00329	0.00331	0.00332		0.00335	0.00337	0.00335	
ผลต่าง	0.00343	0.00342	0.00340	0.00342	0.00313	0.00313	0.00309	0.00312
2% - fast	0.00623	0.00630	0.00612		0.00690	0.00691	0.00710	
หลังแช่	0.00366	0.00369	0.00368		0.00411	0.00412	0.00417	
ผลต่าง	0.00257	0.00261	0.00244	0.00254	0.00279	0.00279	0.00293	0.00284
2.5% - slow	0.00658	0.00655	0.00658		0.00667	0.00673	0.00670	
หลังแช่	0.00466	0.00467	0.00463		0.00482	0.00481	0.00480	
ผลต่าง	0.00192	0.00188	0.00195	0.00192	0.00185	0.00192	0.00190	0.00189
2.5% - fast	0.00613	0.00603	0.00612		0.00641	0.00650	0.00643	
หลังแช่	0.00444	0.00448	0.00447		0.00463	0.00464	0.00469	
ผลต่าง	0.00169	0.00155	0.00165	0.00163	0.00178	0.00186	0.00174	0.00179

ค.6 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไฮดรอกไซด์  
ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

	ชั้นที่ 1				ชั้นที่ 2				ชั้นที่ 3			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00633	0.00630	0.00626		0.00647	0.00645	0.00641		0.00689	0.00692	0.00700	
หลังแช่	0.00122	0.00123	0.00122		0.00103	0.00109	0.00107		0.00125	0.00124	0.00122	
ผลต่าง	0.00511	0.00507	0.00504	0.00507	0.00544	0.00536	0.00534	0.00538	0.00564	0.00568	0.00578	0.00570
1.5% - fast	0.00661	0.00658	0.00643		0.00689	0.00693	0.00684		0.00711	0.00701	0.00703	
หลังแช่	0.00146	0.00149	0.00151		0.00158	0.00154	0.00155		0.00158	0.00159	0.00153	
ผลต่าง	0.00515	0.00509	0.00492	0.00505	0.00531	0.00539	0.00529	0.00533	0.00553	0.00542	0.00550	0.00548
2% - slow	0.00680	0.00670	0.00675		0.00661	0.00662	0.00662		0.00720	0.00721	0.00723	
หลังแช่	0.00302	0.00303	0.00306		0.00304	0.00306	0.00309		0.00345	0.00342	0.00348	
ผลต่าง	0.00378	0.00367	0.00369	0.00371	0.00357	0.00356	0.00353	0.00355	0.00375	0.00379	0.00375	0.00376
2% - fast	0.00657	0.00654	0.00656		0.00687	0.00678	0.00684		0.00663	0.00671	0.00673	
หลังแช่	0.00407	0.00406	0.00403		0.00416	0.00417	0.00418		0.00394	0.00392	0.00396	
ผลต่าง	0.00250	0.00248	0.00253	0.00250	0.00271	0.00261	0.00266	0.00266	0.00269	0.00279	0.00277	0.00275
2.5% - slow	0.00654	0.00658	0.00653		0.00623	0.00618	0.00626		0.00673	0.00670	0.00673	
หลังแช่	0.00451	0.00452	0.00453		0.00425	0.00423	0.00429		0.00452	0.00459	0.00453	
ผลต่าง	0.00203	0.00206	0.00200	0.00203	0.00198	0.00195	0.00197	0.00197	0.00221	0.00211	0.00220	0.00217
2.5% - fast	0.00693	0.00694	0.00688		0.00665	0.00666	0.00662		0.00633	0.00631	0.00635	
หลังแช่	0.00477	0.00476	0.00479		0.00455	0.00458	0.00453		0.00442	0.00445	0.00430	
ผลต่าง	0.00216	0.00218	0.00209	0.00214	0.00210	0.00208	0.00209	0.00209	0.00191	0.00186	0.00205	0.00194

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.6 ข้อมูลดิบน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างการศึกษา เมื่อใช้ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เซไลน์  
ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ (ต่อ)

	ชั้นที่ 4				ชั้นที่ 5			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
1.5% - slow	0.00678	0.00674	0.00674		0.00692	0.00698	0.00689	
หลังแช่	0.00128	0.00125	0.00123		0.00118	0.00117	0.00115	
ผลต่าง	0.00550	0.00549	0.00551	0.00550	0.00574	0.00581	0.00574	0.00576
1.5% - fast	0.00693	0.00691	0.00695		0.00814	0.00813	0.00814	
หลังแช่	0.00149	0.00148	0.00145		0.00160	0.00162	0.00163	
ผลต่าง	0.00544	0.00543	0.00550	0.00546	0.00654	0.00651	0.00651	0.00652
2% - slow	0.00606	0.00610	0.00618		0.00679	0.00670	0.00669	
หลังแช่	0.00306	0.00304	0.00305		0.00329	0.00325	0.00326	
ผลต่าง	0.00300	0.00306	0.00313	0.00306	0.00350	0.00345	0.00343	0.00346
2% - fast	0.00687	0.00689	0.00686		0.00636	0.00639	0.00631	
หลังแช่	0.00432	0.00433	0.00431		0.00372	0.00375	0.00374	
ผลต่าง	0.00255	0.00256	0.00255	0.00255	0.00264	0.00264	0.00257	0.00262
2.5% - slow	0.00650	0.00652	0.00651		0.00649	0.00647	0.00648	
หลังแช่	0.00449	0.00446	0.00447		0.00434	0.00436	0.00432	
ผลต่าง	0.00201	0.00206	0.00204	0.00204	0.00215	0.00211	0.00216	0.00214
2.5% - fast	0.00708	0.00703	0.00702		0.00625	0.00623	0.00626	
หลังแช่	0.00482	0.00485	0.00486		0.00438	0.00437	0.00437	
ผลต่าง	0.00226	0.00218	0.00216	0.00220	0.00187	0.00186	0.00189	0.00187

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ทันตแพทย์หญิง สุคันธา เผือกนาโพธิ์ เกิดที่จังหวัดระนอง ในวันที่ 7 สิงหาคม พ.ศ.2524 จบการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนสหทัยวิทย์ ระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียน นวมินทราชินูทิศ สตรีวิทยา พุทธมณฑล ในปี พ.ศ.2542 และเข้าศึกษาต่อในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีเดียวกัน โดยจบการศึกษาทันตแพทยศาสตรบัณฑิตในปี พ.ศ. 2548

หลังจบการศึกษาเป็นทันตแพทย์ ได้เข้ารับราชการเป็นทันตแพทย์ระดับ 4 ที่โรงพยาบาล ระนอง จังหวัดระนอง ในปี พ.ศ.2548 ถึง 2550 และย้ายไปปฏิบัติงานที่โรงพยาบาลชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพรในปี พ.ศ.2550 และ 2551 ก่อนเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ.2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย