

การพัฒนากระดุกมนุษย์ที่มีสมบัติส่งเสริมความเข้ากันได้ทางชีวภาพ  
ด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

นางสาวรุ่งนภา วรรณศักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2554  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

DEVELOPMENT OF HUMAN BIOACTIVE BONE EXPLANTS

USING THAI SILK FIBROIN AND GELATIN

Miss Rungnapa Vorrapakdee

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

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนากระดุกมนุษย์ที่มีสมบัติส่งเสริมความเข้ากันได้  
ทางชีวภาพด้วย ไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

โดย

นางสาวรุ่งนภา วรรณคดี

สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

นายแพทย์กฤษณ์ เจริญลาภ

---

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศธีรวัฒน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงค์นาฏ สมหวังธนโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(นายแพทย์กฤษณ์ เจริญลาภ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สารเนตร์ ไวคกุล)

รૂงนภา วรภักดี : การพัฒนากระดูกมนุษย์ที่มีสมบัติส่งเสริมความเข้ากันได้ทางชีวภาพด้วยไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน. (DEVELOPMENT OF HUMAN BIOACTIVE BONE EXPLANTS USING THAI SILK FIBROIN AND GELATIN)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล,

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: นพ.กฤษณ์ เจริญลาภ, 107 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชีววัสดุผสมของไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาตินที่นำมาใช้ดัดแปรพื้นผิวของกระดูกมนุษย์โดยการเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวางประเภท EDC/NHS ร่วมกับกระบวนการทำแห้งแข็งด้วยความเย็น โดยทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักระหว่างไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาติน รวมทั้งความเข้มข้นของสารละลายผสม ผลการทดลองพบว่า กระดูกมนุษย์ที่ถูกดัดแปรด้วยไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาตินมีชีววัสดุผสมเข้าไปเชื่อมขวางอยู่ในรูพรุนขนาดใหญ่ของกระดูกมนุษย์เกิดเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนขนาดเล็กลง นอกจากนี้ยังพบว่า การดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาติน ส่งผลทำให้ความพรุนของกระดูกมนุษย์มีค่าลดน้อยลง ค่ามอดูลัสของการกดกระดูกมนุษย์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการดัดแปร ผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู พบว่า กระดูกมนุษย์ที่ถูกดัดแปรด้วยไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาติน ด้วยอัตราส่วนผสม 50/50 ที่ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก (4%SF50G50) มีความสามารถในการส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะ การเจริญเติบโต และการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดีที่สุด ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณแคลเซียม และลักษณะสัณฐานของเซลล์บนกระดูกมนุษย์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากผลการศึกษา สรุปได้ว่าการดัดแปรพื้นผิวของกระดูกมนุษย์โดยการเชื่อมขวางด้วยไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาติน ช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้ามายึดเกาะ และเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Osteoconduction) และช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดี (Osteoinduction) แสดงถึงศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นกระดูกปลูก (human bone graft) ที่มีประสิทธิภาพ ต่อไป

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....

ปีการศึกษา.....2554.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5270467521 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : THAI SILK FIBROIN / GELATIN / HUMAN BONE

RUNGNAPA VORRAPAKDEE : DEVELOPMENT OF HUMAN BIOACTIVE  
BONE EXPLANTS USING THAI SILK FIBROIN AND GELATIN.

THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D.,

THESIS CO-ADVISOR : CHRIS CHAROENLAP, MD., 107 pp.

The aim of this research is to study the effects of the Thai silk fibroin/gelatin blends that used to modify the surface of human bone. The Thai silk fibroin/gelatin were crosslinked using EDC/NHS and freeze-drying into the human bone. The effects of the weight blending ratios of Thai silk fibroin/gelatin and the concentration of blend solution were investigated. The results showed that the porous structure of human bone was filled with Thai silk fibroin/gelatin blend, resulting in smaller pore size and lower bone porosity. The compressive modulus of the human bone before and after modification was not statistically different. The results of *in vitro* cell culture using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells indicated that the modified human bone with Thai silk fibroin/gelatin at the weight blending ratio of 50/50 and the solution concentration of 4wt% (4%SF50G50) could best enhance the attachment, proliferation and osteogenic differentiation as evaluated from alkaline phosphatase activity, calcium content and cell morphology. It could be concluded from this study that the modified human bone with crosslinked Thai silk fibroin and gelatin had great osteoconduction and osteoinduction. It could be potentially used as an effective human bone graft.

Department : .....Chemical Engineering..... Student's Signature .....

Field of Study : ..Chemical Engineering..... Advisor's Signature .....

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

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษานายแพทย์กฤษณ์ เจริญลาภ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมทั้งประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงค์นาฏ สมหวังธนโรจน์ และอาจารย์คณะกรรมการทุกท่านซึ่งได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ และศาสตราจารย์ นายแพทย์สารเนตร์ ไวกกุล เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษา และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพ ในพระอุปถัมภ์ฯ ภาควิชาศัลยศาสตร์ ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุเคราะห์กระดุกมนุษย์ และคุณจิราภา พลายเล็ก คุณสายสุรีย์ สำราญเรืองจิตต์ คุณสหชาติ นามะดิลก ผู้ช่วยคอยประสานงาน และจัดเตรียมกระดุกมนุษย์ให้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทุนแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ และทุนพัฒนาวิชาการวิศวกรรมชีวเวชในแผนพัฒนาฯ 100 ปี ที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยวัสดุทางการแพทย์ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ห้องปฏิบัติการ i-Tissue Lab คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณ ดร.จุฑามาศ รัตนาวรรณ สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือด้านความรู้พื้นฐานของเซลล์ และเทคนิคในการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ และคุณพนิดา เจตบ่าเพ็ญกุล สำหรับข้อแนะนำ และความช่วยเหลือในการทำวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยวัสดุทางการแพทย์ ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์ และห้องปฏิบัติการ i-Tissue Lab ที่ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ญ
สารบัญรูป .....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ .....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 กระจก.....	5
2.1.1 ลักษณะโครงสร้างกระจก.....	5
2.1.2 องค์ประกอบของกระจก.....	7
2.1.3 การสร้างกระจก.....	9
2.1.4 การสमानกระจก.....	10
2.1.5 ระยะเวลาการรักษาบาดแผล.....	11
2.1.6 กระจกปลุก.....	11
2.1.7 วัสดุแทนกระจก.....	13
2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ.....	15
2.3 โครงเลี้ยงเซลล์.....	16
2.4 ชีววัสดุ.....	17
2.4.1 ไพโบรินใหม่ไทย.....	17
2.4.2 เจลาติน.....	19
2.5 เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก.....	22
2.6 การเชื่อมขวาง.....	25

2.6.1 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพ.....	26
2.6.2 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางเคมี.....	27
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	31
3 วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	36
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	36
3.2 อุปกรณ์.....	37
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	38
3.3.1 กระดูกมนุษย์ประเภท cancellous.....	39
3.3.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติของกระดูกมนุษย์.....	40
3.3.3 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน.....	42
3.3.4 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติของกระดูกมนุษย์ภายหลังการตัดแปร....	43
3.3.5 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก.....	44
3.3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนกระดูกทดสอบ.....	45
3.3.7 ทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก .....	45
3.3.8 ทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก .....	45
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	48
4.1 สมบัติของกระดูกมนุษย์และภายหลังการตัดแปร.....	52
4.2 สมบัติทางชีวภาพ.....	60
4.2.1 การทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์.....	60
4.2.2 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ .....	66
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	77
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	77
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง .....	79



ภาคผนวก .....	85
ภาคผนวก ก .....	86
ภาคผนวก ข .....	87
ภาคผนวก ค .....	90
ภาคผนวก ง .....	91
ภาคผนวก จ .....	92
ภาคผนวก ฉ .....	93
ภาคผนวก ช .....	94
ภาคผนวก ซ .....	95
ภาคผนวก ฌ .....	99
ภาคผนวก ฎ .....	103
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	107

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของกระดูกมนุษย์และกระดูกของวัว.....	9
2.2	สมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B .....	20
2.3	องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาติน.....	21
4.1	ประเภทของกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกดัดแปรพื้นผิวและกระดูกมนุษย์ที่ได้รับดัดแปรพื้นผิวที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาตินและความเข้มข้นของสารละลายผสมต่างๆ.....	48
4.2	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) และค่าเวลาการแบ่งตัวที่คูณ (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ที่เพาะเลี้ยงบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ.....	65
4.3	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) และค่าเวลาการแบ่งตัวที่คูณ (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ที่เพาะเลี้ยงบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก.....	69
4.4	ปริมาณธาตุจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) ของกระดูกมนุษย์ และกระดูกที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินก่อน และหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูเป็นเวลา 28 วัน.....	76
ก.1	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกระดูกมนุษย์ ภายหลังจากดัดแปรด้วยชีววัสดุผสมของไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน.....	86
ก.2	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความพรุน.....	86
ข.1	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่ามอดูลัสของกระดูกมนุษย์ของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (ในสภาวะแห้ง).....	88
ข.2	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่ามอดูลัสของกระดูกมนุษย์ของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (ในสภาวะเปียก).....	89

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ภาคตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก..... 7
2.2	ขั้นตอนการเจริญพัฒนาของกระดูก แบบ Endochondral ossification ..... 10
2.3	หลักการเบื้องต้นของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก..... 15
2.4	โครงสร้างของเส้นใยไหม ..... 17
2.5	โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน ..... 18
2.6	แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin ..... 19
2.7	โครงสร้างของเจลาติน ..... 20
2.8	ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ..... 22
2.9	สารที่ใช้ในการเหนี่ยวนำกระบวนการเกิด Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ..... 23
2.10	การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก..... 24
2.11	สารที่หลังออกมาระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก..... 25
2.12	ภาพแสดงการเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางโดยการให้ UV irradiation.....27
2.13	แสดงการเชื่อมขวางของคอลลาเจนกับ GA .....27
2.14	โครงสร้างของโคโตซานถูกเชื่อมโยงพันธะด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ ..... 28
2.15	การเชื่อมขวางด้วย EDC..... 29
3.1	แผนผังดำเนินงานวิจัย..... 38
3.2	กระดูกที่ผ่านการมาทำแห้งด้วยความเย็น (freeze-drying) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยรังสีแกมมา ขนาด 1x1x0.2 ซม <sup>3</sup> (กว้างxยาวxหนา)..... 39
4.1	ลักษณะภายนอกของกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกตัดแปรพื้นผิว (hBONE) และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรพื้นผิวด้วยชีววัสดุผสมที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 80/20, 50/50 และความเข้มข้นของสารละลายผสม 1%-4% (a) 1%SF80G20, (b) 2%SF80G20, (c) 4%SF80G20, (d) 1%SF50G50, (e) 2%SF50G50, (f) 4%SF50G50.....49

รูปที่

4.2	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกระดูกมนุษย์ภายหลังการตัดแปรด้วยชีววัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนผสมและความเข้มข้นของสารละลายผสม.....	51
4.3	ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยชีววัสดุผสมที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 80/20, 50/50 และความเข้มข้นของสารละลายผสม 1%-4%.....	53
4.4	ความพรุนของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยชีววัสดุผสมที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน 80/20, 50/50 และความเข้มข้นของสารละลายผสม 1%-4%.....	55
4.5	ค่ามอดุลัสของการกดในสภาวะแห้งและสภาวะเปียกของกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน.....	57
4.6	ร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่ภายหลังแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร ในสภาวะ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	59
4.7	จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูที่ยึดเกาะ (6 ชั่วโมง) บนกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์.....	62
4.8	จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูที่เจริญเติบโต (1, 4, 7 และ 14 วัน) บนกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์.....	64
4.9	จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูที่เจริญเติบโต (3, 7, 14, 21 และ 28 วัน) บนกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์.....	66
4.10	กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เกิดขึ้นบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิว ที่ระยะเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์.....	67

รูปที่

4.11	ปริมาณแคลเซียมที่เกิดขึ้นบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปร พื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ของการเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์ .....	68
4.12	ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู บนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ ได้รับการดัดแปรพื้นผิวที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 50/50 และ ความเข้มข้นของสารละลายผสม 1%-4%.....	73
ค	กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกโดยวิธี DNA Assay.....	90
ง	กราฟมาตรฐานการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) .....	91
จ	กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม.....	92
ช.1	กระดูกมนุษย์ (hBONE) .....	95
ช.2	กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 1% โดยน้ำหนัก (1%SF50G50).....	96
ช.3	กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 2% โดยน้ำหนัก (2%SF50G50) .....	97
ช.4	กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก (4%SF50G50) .....	98
ฉ.1	กระดูกมนุษย์ (hBONE) .....	99
ฉ.2	กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 1% โดยน้ำหนัก (1%SF50G50).....	100
ฉ.3	กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 2% โดยน้ำหนัก (2%SF50G50) .....	101
ฉ.4	กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก (4%SF50G50) .....	102
ญ.1	กระดูกมนุษย์ (hBONE) .....	103
ญ.2	กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 1% โดยน้ำหนัก (1%SF50G50).....	104

รูปที่

ญ.3	กระดุกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพันธุด้วยไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 2% โดยน้ำหนัก (2%SF50G50) .....105
ญ.4	กระดุกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพันธุด้วยไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก (4%SF50G50) .....106

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาของงานวิจัย

ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน กระดูกหัก (bone fracture) เป็นภาวะที่พบได้บ่อยทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ส่วนมากมักเกิดจากการได้รับบาดเจ็บ เช่น หกล้ม อุบัติเหตุทางรถยนต์ การเล่นกีฬา และงานทางทันตกรรม เป็นต้น ในผู้สูงอายุ กระดูกเสื่อม ผุ และเปราะ มักมีโอกาสหักง่ายเมื่อได้รับแรงกระทบเพียงเล็กน้อย พบได้บ่อยที่บริเวณกระดูกต้นขาหรือสะโพก รักษาได้โดยการใส่เฝือกหรือตามกระดูกส่วนที่หักไว้ ถ้าหากกระดูกหักแหลกละเอียดหรือมีบาดแผลเหวอะหวะ ซึ่งอาจเสี่ยงต่อการติดเชื้อรุนแรง อาจต้องรักษาด้วยการตัดอวัยวะส่วนนั้นทิ้ง ทำให้กระดูกส่วนที่หักบางส่วนหลุดหายไปเกิดเป็นช่องว่างระหว่างกระดูก ดังนั้นในการรักษาจึงจำเป็นต้องใส่กระดูกทดแทนในบริเวณที่สูญหายไป ซึ่งวิธีการที่ดีที่สุด คือใช้กระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง (Autograft) มาทดแทน เนื่องจากกระดูกจะสามารถเชื่อมต่อกันได้ง่ายและไม่เกิดปฏิกิริยาต่อต้าน แต่การใช้กระดูกจากตัวผู้ป่วยเองมีข้อเสีย คือ มีการผ่าตัดที่ซ้ำซ้อน เสี่ยงต่อการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยสูงอายุและเด็กที่ไม่สามารถนำกระดูกตนเองมาใช้ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาที่จะนำกระดูกผู้เสียชีวิต (Allograft) จากศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ในพระอุปถัมภ์ฯ มาใช้ทดแทนเพื่อลดปัญหาดังกล่าว แต่กระดูกผู้เสียชีวิต (Allograft) ที่ได้รับบริจาคคนนั้นผ่านกระบวนการทำแห้งแข็งด้วยความเย็น (freeze-drying) จึงทำให้เกิด Microcrack ขึ้น ซึ่งส่งผลให้เซลล์เกาะติดและเจริญเติบโตได้ไม่ดีนัก ดังนั้นงานวิจัยจึงมุ่งเน้นการดัดแปรพื้นผิวของกระดูกจากผู้เสียชีวิตให้เหมาะสมกับการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

จากรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์จากชีวะวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยใช้ไฟโบรอินไหมไทย และเจลาติน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากโปรตีนไหมไทยเป็นหลักมีศักยภาพในการพัฒนาในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และมีอัตราการย่อยสลายที่ช้า ทั้งนี้เมื่อมีการดัดแปรโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยโดยการเชื่อมขวางด้วยเจลาตินโดยใช้สาร 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) จะช่วยส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก และเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกได้เป็นอย่างดี [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008, Vachiraroj, N.

และคณะ 2009] และจากรายงานของเจตน์บำเพ็ญกุล [Jetbumpenkul, 2009] เกี่ยวกับการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน ด้วยวิธีการเชื่อมขวางโดยการเติมสาร EDC/NHS โดยตรงในสารละลายผสมของไฟโบรอินและเจลาติน แล้วขึ้นรูปโดยวิธีการทำแห้งแข็งด้วยความเย็น ผลการศึกษาการเชื่อมขวางทางเคมีที่มีต่อสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาตินทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวางนั้นมีรูพรุนอย่างสม่ำเสมอ และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสาร EDC/NHS ยังส่งผลให้ค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง

ดังนั้นจากรายงานที่ผ่านมาในการพัฒนาคุณสมบัติของชีววัสดุไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาตินที่มีสมบัติในการช่วยส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำชีววัสดุผสมดังกล่าวมาใช้ดัดแปรพื้นผิวของกระดูกมนุษย์ที่บริจาคให้กับศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ในพระอุปถัมภ์ฯ สมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนากรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ โดยวิธีการดัดแปรพื้นผิวกระดูกมนุษย์ด้วยการเชื่อมขวาง จากนั้นทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพและสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการของกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรด้วยชีววัสดุเปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการดัดแปรโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากหนู ผลจากการศึกษาวิจัยนี้คาดว่าจะสามารถปรับปรุงกระดูกมนุษย์ให้มีสมบัติในการส่งเสริม และกระตุ้นกระบวนการสร้างกระดูกตามธรรมชาติให้เร็วขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้การรักษาการสูญเสียมวลกระดูกมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อปรับปรุงกราฟกระดูกมนุษย์ (human bone graft) ให้มีความสามารถในการส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูก รวมถึงเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้ามายึดเกาะในกระดูกใหม่ได้ดีขึ้น (Osteoconduction) โดยการดัดแปรพื้นผิวกระดูกมนุษย์ด้วยชีววัสดุผสมของไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน



### 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 พัฒนาวิธีการดัดแปรพื้นผิวของกระดูกมนุษย์ด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวาง (crosslinking) ด้วย EDC/NHS โดยมีตัวแปรที่ศึกษา คือ

- ความเข้มข้นของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ได้แก่ 1%, 2% และ 4% โดยน้ำหนัก
- อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ได้แก่ 80/20 และ 50/50

1.3.2 วิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติของกระดูกมนุษย์ ประเภท Cancellous ที่ได้จากส่วนหัวข้อสะโพกบริเวณส่วนบนของกระดูกต้นขามนุษย์ (Femoral head) ที่บริจาคให้กับศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ในพระอุปถัมภ์ฯ สมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนา กรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ เปรียบเทียบกับกระดูกที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยวัสดุเคลือบไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน โดยทำการวิเคราะห์ดังนี้

- โครงสร้างพื้นฐาน และขนาดรูพรุน โดยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

- ความพรุน (Porosity)
- สมบัติทางกล โดยทดสอบความสามารถในการทนแรงกด (Compressive modulus)
- ปริมาณธาตุที่เป็นองค์ประกอบของกระดูก โดยใช้เทคนิค Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

- ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* biodegradability) ด้วยสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ที่สภาวะจำลองร่างกายมนุษย์ (pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

### 1.3.3 ทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู (bone marrow-derived stem cell)

-ทดสอบการยึดเกาะ (Attachment) ของเซลล์ ที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง และการเจริญเติบโต (Proliferation) ช่วงเวลา 1, 4, 7 และ 14 วัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA Assay เปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ที่ถูกตัดแปรพื้นผิว

-ทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูบนกระดูกมนุษย์ ช่วงเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA Assay, กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) และปริมาณแคลเซียม เปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ที่ถูกตัดแปรพื้นผิว

-วิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐาน (Morphology) โดยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) และ วิเคราะห์ปริมาณธาตุที่เป็นองค์ประกอบของกระดูก โดยใช้เทคนิค Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ลักษณะสมบัติของต้นแบบกระดูกมนุษย์ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทย และ เจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกมนุษย์

1.4.2 องค์ความรู้ในการตัดแปรพื้นผิวกระดูกมนุษย์เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก สำหรับประยุกต์ใช้ในการตัดแปรวัสดุธรรมชาติอื่นเพื่องานทางการแพทย์

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระดูก (Bone) [Bronzino, J.D. และคณะ 2006, Meinel, L. และคณะ 2004, Takahashi, Y. และคณะ 2005]

#### 2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของกระดูก

กระดูกมีส่วนประกอบพื้นฐานเหมือนเนื้อเยื่ออื่นๆ คือมีเซลล์และเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อของกระดูกนอกจากจะมีส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ คอลลาเจน proteoglycan glycoprotein ฟอสโฟโปรตีน โปรตีโอไลปิด และมิวโคโพลีแซคคาไรด์ สารนี้รวมทั้งหมด เรียก osteoid ซึ่งกลายเป็นกระดูกในเวลาต่อมา ในส่วนเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจะมีคอลลาเจนชนิดที่ 1 อยู่มากที่สุด 95% ของจำนวนปริมาณทั้งหมด ส่วนเนื้อพื้นของกระดูกยังมีส่วนที่เป็นสารอินทรีย์หรือเกลือแร่ คือ ไฮดรอกซีอะปาทาइट ซึ่งเป็นผลึกขนาดใหญ่ไม่ละลายน้ำ ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) สารนี้ในระยะแรกจะฝังตัวอยู่ในส่วนพื้นฐานอินทรีย์ เรียกว่า เกลือแคลเซียมฟอสเฟต ต่อมาภายหลังแปลงสภาพเป็นผลึกของแข็งแคลเซียมฟอสเฟต นอกจากนี้ในกระดูกยังมีจำนวนผลึกของไอออนคาร์บอน แมกนีเซียม โซเดียม ฟลูออไรด์ และซิลิเกต สารดังกล่าวนี้ อยู่ในส่วนกระดูกเปลือกนอก (cortical bone) และโครงกระดูกยึดภายใน (trabecular)

การแบ่งชนิดของกระดูกตามลักษณะรูปร่าง แบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่

- กระดูกทรงกระบอก (Tubular bone) หรือกระดูกยาว (long bone) ส่วนใหญ่ ได้แก่ กระดูกแขนหรือขา
- กระดูกสั้น (Short bone) เช่น กระดูกฝ่ามือ ฝ่าเท้า และกระดูกนิ้ว
- กระดูกแบน (Flat bone) เช่น กะโหลกศีรษะ กระดูกเชิงกราน กระดูกสะบัก
- กระดูกรูปร่างอื่นๆ (Irregular bone) เช่น กระดูกสันหลัง กระดูกข้อมือ และข้อเท้า

ถ้าพิจารณาตามลักษณะเนื้อกระดูกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

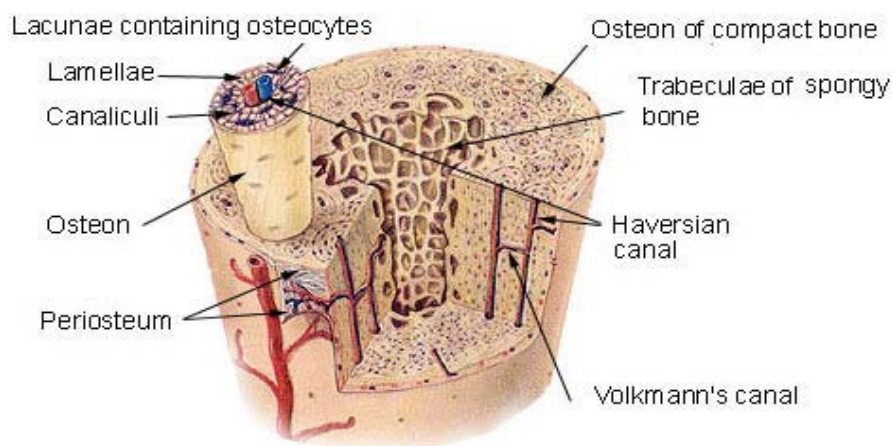
1. กระดูกเนื้อแน่น (Compact Bone) เนื้อกระดูกทั้งหมดในร่างกายจะเป็นมวลกระดูกเนื้อแน่นถึงร้อยละ 80 ที่เหลือจะเป็นกระดูกพรุน กระดูกเนื้อแน่นจะทำหน้าที่เป็นส่วนเลือกของกระดูกเกือบทุกอันโดยเฉพาะที่ diaphysis ของกระดูกยาวจะมีกระดูกเนื้อแน่นค่อนข้างจะหนากว่าที่อื่นๆ จะเห็นเนื้อกระดูกเป็นชั้นบางๆ เรียงตัวเป็นวงซ้อนๆ กันล้อมรอบ central cana ลักษณะโครงสร้างเช่นนี้เรียกว่า Haversian System แต่ละหน่วยของระบบโครงสร้างนี้ เรียกว่า osteon ซึ่งประกอบไปด้วย central canal ที่มี concentric lamellae ล้อมรอบประมาณ 6-15 ชั้น และเซลล์ osteocyte ที่อยู่ใน lacuna เนื้อกระดูกส่วนที่อยู่ระหว่าง osteon แต่ละหน่วยจะมีการเรียงตัวของเนื้อเป็นชั้นๆ เช่นกัน แต่ไม่ได้เป็นวง เรียกว่า Interstitial Lamellae สำหรับเนื้อส่วนที่อยู่ใกล้ผิวเปลือกนอกซึ่งชิดกับเยื่อหุ้มกระดูก และส่วนที่อยู่ใกล้ผิวด้านใน ซึ่งชิดกับเยื่อภายในกระดูกจะมีการเรียงตัวไปตามเส้นรอบวงของผิว

2. กระดูกพรุน (Spongy Bone) โครงสร้างของกระดูกพรุนจะมีลักษณะเป็นชิ้นกระดูกเล็กๆ เรียกว่า trabeculae ประสานต่อกันโดยมีช่องว่างแทรกอยู่ ซึ่งจะเป็นที่อยู่ของไขกระดูก ลักษณะเช่นนี้ทำให้ดูพรุนเหมือนฟองน้ำ การเรียงตัวของ trabeculae ในกระดูกพรุนถึงแม้จะดูไม่เป็นระเบียบแต่ในกระดูกยาวที่ต้องรับน้ำหนักจะสังเกตเห็นว่าการเรียงตัวของ trabeculae จะเป็นไปในแนวที่จะช่วยรับหรือดูดซับน้ำหนักที่จะต้องผ่านกระดูกชิ้นนั้น เนื้อกระดูกในแต่ละ trabeculae จะมีการเรียงตัวเป็น lamellae เช่นเดียวกับในกระดูกเนื้อแน่น แต่เนื่องจาก trabeculae มีขนาดเล็ก การจัดเรียงตัวเป็น lamellae จึงยังดูไม่เป็นระเบียบนัก

เนื้อเยื่อพื้นฐานของกระดูก คือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษ เรียกว่า เนื้อเยื่อกระดูก (osseous tissue) ประกอบขึ้นจากวัสดุคอมโพสิตที่มีความแข็งแรงแต่น้ำหนักน้อย ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกซีอะปาทิต (calcium hydroxyapatite) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความแข็งเกร็ง (rigidity) โดยมีค่าความแข็งแรงในการทนแรงกด 130-180 MPa [Paul, K.C. และคณะ 2008] นอกจากนี้ยังมีคอลลาเจน (collagen) เป็นโปรตีนเส้นใยที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกระดูก เมื่อดูโครงสร้างของกระดูกเนื้อแน่นใต้กล้องจุลทรรศน์ จากรูปที่ 2.1 จะพบว่าเนื้อเยื่อกระดูกมีลักษณะที่เป็นวงซ้อนๆ กัน โดยที่มีศูนย์กลางเป็นช่องขนาดใหญ่

ที่เรียกว่า ช่องฮาเวอร์เซียน (Haversian canal) ซึ่งเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูก และวงรอบๆ จะเป็นที่อยู่ของเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่แล้ว

### Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)



รูปที่ 2.1 ภาคตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก

[<http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>]

### 2.1.2 องค์ประกอบของกระดูก (Organization of bone)

เนื้อกระดูกประกอบด้วยองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ เซลล์กระดูก และเนื้อเยื่อเซลล์ของกระดูก ซึ่งเซลล์กระดูกแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์ (osteoprogenitors) เซลล์ออสติโอ بلاสต์ (osteoblast) เซลล์เซลล์ออสติโอไซต์ (osteocytes) และเซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclast)

#### 2.1.2.1 เซลล์กระดูก

- เซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์ (Osteoprogenitor) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งเจริญมาจาก embryonic mesenchymal cells โดยมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเจริญพัฒนาเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ osteoblasts เซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้พบแทรกอยู่ในโพรงกระดูกชั้น endosteum และผิวนอกกระดูกในชั้น periosteum นอกจากนี้ยังพบอยู่บนง่ากระดูก (trabeculae) บริเวณ metaphysis ของกระดูกที่กำลังเจริญ เซลล์เหล่านี้ถูกกระตุ้นให้เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ osteoblasts

เพื่อสร้างเนื้อกระดูกหรือซ่อมแซมเนื้อกระดูกส่วนที่ถูกทำลายหรือแตกหักให้มาเชื่อมติดกันตรงบริเวณรอยหักเรียกว่า callus

- เซลล์ออสติโอ بلاสท์ (Osteoblast) เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจาก osteoprogenitor cells เซลล์นี้จะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติออยด์ (osteoid) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้มีสารอนินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก นอกจากนี้ ออสติโอ بلاสท์ยังสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การสร้างเนื้อกระดูก รวมทั้งสารนอกเซลล์อื่นๆ อีกด้วย

- เซลล์ออสติโอไซต์ (Osteocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจากออสติโอ بلاสท์ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว รอบๆ เซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลากูนา (lacuna) และแต่ละลากูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็กๆที่เรียกว่า คานาlikuไล (canaliculi) ซึ่งทำให้แต่ละออสติโอไซต์มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาวเวอร์เซียนเข้ามายังแต่ละเซลล์ผ่านทางช่องดังกล่าวนี้ แต่ออสติโอไซต์จะเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่ แต่มันยังมีหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียมและสารนอกเซลล์อื่นๆ ด้วย

- เซลล์ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโมโนไซต์ (monocyte stem cells) เซลล์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการก่อรูปกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) ในการร่อนเนื้อกระดูก และทำให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้กระบวนการดังกล่าวยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย [Netter, F.H. และคณะ 1987]

#### 2.1.2.2 เนื้อเยื่อเซลล์ของกระดูก ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ สารอนินทรีย์ และสารอินทรีย์

- สารอนินทรีย์ มีประมาณ 50% ประกอบด้วยแคลเซียม และฟอสฟอรัสเป็นส่วนใหญ่และยังพบไปคาร์บอนเนต ซิเตรท แมกนีเซียม โปตัสเซียม และโซเดียมด้วย พบว่า แคลเซียมและฟอสฟอรัสอยู่ในรูปของผลึกไฮดรอกซีอะปาทิต

- สารอินทรีย์ ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน 95% ส่วนอีก 5% เป็นพวกสารที่ไม่มีรูปร่าง ซึ่งมีไกลโคซามิโนไกลแคนอยู่รวมกับโปรตีน ซึ่งองค์ประกอบของกระดูกจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายตัว เช่น ตำแหน่งการเก็บสารตัวอย่าง อายุ เพศ และชนิดของเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกระดูกมนุษย์และกระดูกของวัว [Bronzino, J.D. และคณะ 2006]

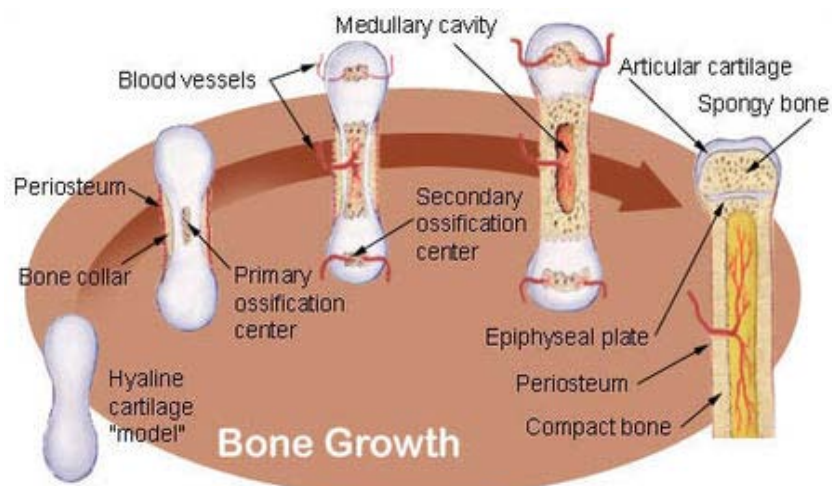
Species	%H <sub>2</sub> O	Apatite	%dry weight collagen	Glycosaminoglycan (GAG)
Bovine	9.1	76.4	21.5	Not determined
Human	7.3	67.2	21.2	0.34

### 2.1.3 การสร้างกระดูก (Bone formation)

การเจริญพัฒนาของกระดูกจะเริ่มโดยกระบวนการสร้างเนื้อกระดูก (ossification) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

- Intramembranous ossification เป็นการสร้างเนื้อกระดูกจากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์ชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดต่างๆ การรวมตัวของเซลล์ดังกล่าวจะทำให้เกิดจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ (primary ossification center) และตามด้วยการสะสมแคลเซียมในบริเวณดังกล่าว การสร้างเนื้อกระดูกในลักษณะนี้มักพบในกระดูกแบบแบน (flat bone)

- Endochondral ossification เป็นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน (cartilage) ที่มีการเจริญมาก่อนแล้ว โดยที่กลุ่ม mesenchymal cells จะเข้าไปแทนที่เซลล์กระดูกอ่อนผ่านทางหลอดเลือดเริ่มจากส่วนกลางของกระดูกซึ่งเป็นจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ เมื่อเซลล์ mesenchymal cells มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูกจึงมีการสะสมของเนื้อกระดูกมากขึ้น นอกจากนี้พบว่าจะมีจุดการสร้างกระดูกทุติยภูมิ (secondary ossification center) การสร้างกระดูกในทั้งสองจุดจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งมาบรรจบกันที่แนวแผ่นอีพิไฟเซียล (epiphysial plate) ซึ่งเป็นแนวของกระดูกอ่อนที่ยังสามารถทำให้เกิดการยืดของกระดูกได้จนกระทั่งเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ ซึ่งจะถูกแทนที่ด้วยกระดูกทั้งหมด ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการเจริญพัฒนาของกระดูก แบบ Endochondral ossification

[<http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>]

#### 2.1.4 การสมานกระดูก (Bone Healing)

กระบวนการที่กระดูกหักและเชื่อมติดกันมีอยู่ 2 วิธี กระบวนการที่เป็นที่ทราบกันดีทั่วไป คือ กระดูกติดแบบทุติยภูมิ (Secondary fracture healing) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดสารแข็งคล้ายกระดูก รอบปลายกระดูกที่แตก (callus formation) การดูดกลืนของชิ้นส่วนกระดูก (resorption of fracture fragments) การเกิดกระดูกใหม่ (new born formation) การปรับสภาพของกระดูก (Remodeling) ส่วนอีกกระบวนการหนึ่ง เรียกว่า กระดูกติดแบบปฐมภูมิ (Primary fracture healing) โดยวิธีการนี้ เกี่ยวข้องกับการผ่าตัดให้ปลายกระดูกที่แตกมาชิดกันแน่น (osteosynthesis) กล่าวคือเมื่อปลายกระดูกหักสองปลายมาชนกันอย่างแน่น จะมีการเกิดการดูดกลืนที่ส่วนปลายกระดูกนั้นน้อยมาก แต่เกิดมีการปรับสภาพของส่วนที่อกกลางและวงชั้นกระดูก (osteons) ที่บริเวณปลายกระดูกนั้น osteons ที่เกิดใหม่นี้จะมีเลือดมาเลี้ยงโดยตรงจากเส้นเลือดภายในกระดูก endosteal & peristeal vessels) โดยวิธีนี้การเชื่อมติดของกระดูกจะไม่มี callus formation คือ osteons จะสร้างกระดูกให้เชื่อมติดกัน โดยตรงระหว่างปลายกระดูกที่ชิดกัน



## 2.1.5 ระยะเวลาการรักษาบาดแผล แบ่งออกเป็น 3 ระยะ [Thompson, J.C. 2002, Yannas, V. I. 2001.]

2.1.5.1 ระยะอักเสบ (Inflammation phase) การอักเสบของบาดแผลแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรกและระยะหลังขึ้นอยู่กับเวลา ช่วงเวลาของการตอบสนอง และชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

การอักเสบระยะแรก (Early inflammatory phase) เกิดขึ้นในช่วงเวลา 1-2 วันแรก เซลล์และอนุภาคแปลกปลอมถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จากเซลล์ Phagocyte และอนุมูลอิสระออกซิเจน เซลล์ endothelium จากขอบของบาดแผลจะเคลื่อนย้าย และเพิ่มจำนวนมาตามชั้นผิวหนังแล้วสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (basemest membrane) ภายใน 24-48 ชั่วโมง

การอักเสบระยะหลัง (Late inflammatory phase) เกิดขึ้นในวันที่ 2-3 เซลล์ macrophage ทำหน้าที่ผลิต growth factor ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน และการผลิต ECM ของเซลล์ fibroblast และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ endothelial ที่มีผลต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) ขึ้นในบริเวณที่จะซ่อมแซม

2.1.5.2 ระยะการเพิ่มจำนวน (Proliferative phase) ระยะการเพิ่มจำนวนเริ่มต้นขึ้นพร้อมๆ กับการอักเสบในวันที่ 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 2-4 หลังจากการเกิดบาดแผล ซึ่งถูกกำหนดโดยการย้ายที่ของเซลล์ fibroblast การสร้าง ECM และการเกิด Granulation tissue ซึ่งมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อเลอะๆ สีชมพูอ่อน กระบวนการที่สำคัญที่เกิดขึ้นในระยะเวลาการเพิ่มจำนวน คือ การแทนที่เมทริกซ์ที่สร้างจาก fibronectin และ fibrinogen ในระยะการเกิดลิ้มเลือดด้วย Granulation tissue ที่สร้างขึ้นใหม่ และเกิดขึ้นหนึ่งกำพำร่า (Epithelialization) ซึ่งเป็นภาวะสุดท้ายของระยะเพิ่มจำนวน

-การย้ายที่ของเซลล์ไฟโบรบลาส (Fibroblast migration) เซลล์ fibroblast ย้ายที่เข้ามาในบาดแผลในวันที่ 2-4 หลังจากเกิดบาดแผล ในขณะที่เซลล์ endothelial ย้ายเข้ามาในบาดแผลในอีก 1 วันต่อมา โดยที่เซลล์ fibroblast ย้ายเข้าสู่บาดแผลด้วยการเหนี่ยวนำของ growth factor คือ PDGF และ TGF- $\beta$  ภายในบาดแผลเซลล์ไฟโบรบลาสจะเพิ่มจำนวน และผลิตเมทริกซ์ใหม่ด้วย fibronectin และ Hyaluronan ต่อมาจึงผลิต collagen และ Proteoglycan ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ทำหน้าที่เสริมสร้าง ECM ใหม่ที่จะช่วยสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ นอกจากนี้การเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซลล์ fibroblast และ ECM จะเป็นตัวช่วยในการควบคุมการสังเคราะห์ ECM และการสร้างแบบจำลองซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลัง

-การเกิด ECM (Formation of the extracellular matrix) ECM เป็นแหล่งให้เซลล์ยึดเกาะ และควบคุมการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ ECM ประกอบไปด้วย โปรตีนที่เป็นเส้นใย (collagen และ Elastin) และ interstitial matrix ซึ่งประกอบไปด้วย ไกลโคโปรตีนที่เป็นตัวยึดเกาะซึ่งฝังตัวอยู่ใน proteoglycan และ glycoaminoglycans

-การเกิด Granulation tissue (Formation of granulation tissue) Granulation tissue ถูกสร้างขึ้นในวันที่ 3-5 มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อและๆสีชมพูอ่อน และเกิดเส้นเลือดใหม่ ซึ่งเกิดจากปัจจัยเหนี่ยวนำของ growth factor หลายชนิด เช่น VEGF (Vascular endothelial growth factor), PDGF, TGF- $\beta$  และ bFGF (basic Fibroblast growth factor)

-การเกิดชั้นหนังกำพร้า (Epithelialization) หลังจากการเกิดบาดแผล เซลล์หนังกำพร้าจะเคลื่อนย้ายจากขอบของบาดแผลเข้าสู่บาดแผลจนกระทั่งปกคลุมทั่วทั้งบาดแผล การเกิดชั้นหนังกำพร้าต้องอาศัยความชื้นจากสิ่งแวดล้อมอาหารที่เพียงพอ และการควบคุมจาก growth factor หลายชนิดคือ KGF (Keratynocyte growth factor), EGF และ bFGF

2.1.5.3 ระยะเวลาปรับแต่ง (Remodeling phase) เป็นระยะสุดท้ายของการรักษาบาดแผล โดยที่แผลเป็นดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากกลุ่มเส้นใย collagen ที่รวมกันจนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ขึ้น ภายใน ECM เกิดการเรียงตัวเป็นเส้นในแนวเดียวกัน (alignment) และกระบวนการจะสิ้นสุดเมื่อ fibroblast หยุดการทำงานสร้างเนื้อเยื่อถาวร รวมทั้งจะถูกปรับแต่งให้กลับสู่สภาพปกติ

## 2.1.6 กระดูกปลูก (Bone Grafting) [Goldberg, V.M. 2003, Doron, I. และ Amy, L. 2003]

วิธีสร้างกระดูกแทนที่กระดูกปลูก (osteoconductive) หมายถึง การที่กระดูกปลูกทำหน้าที่เป็นตัวโครงร่างให้เซลล์กระดูกเข้ามายึดเกาะ ส่วนการที่กระดูกปลูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างกระดูกขึ้นใหม่ (osteoinductive) คือ การที่กระดูกปลูกทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้ส่วนกระดูกของร่างกายที่อยู่บริเวณใกล้เคียงสร้างกระดูกขึ้นโดยรอบกระดูกปลูก ในกระดูกปลูกขนาดใหญ่ๆ หรือเป็นท่อนกระดูกที่ใส่เข้าไปในร่างกายในระยะแรกๆ จะมีการละลายกระดูกจนเกิดภาวะกระดูกโปร่งบาง (osteoporosis) ทำให้กระดูกปลูกในระยะนี้อ่อนแอต้านทานน้ำหนักไม่ได้ กระดูกจะเริ่มมีการละลาย ซึ่งจะกินเวลานานเป็นเดือนหรือหลายเดือน กระดูกใหม่ก็จะเกิดขึ้นตามแนวแรงกดที่กระดูกปลูกได้รับ กระดูกปลูกส่วนผนังกระดูก (cortex) จะติดได้ยากกว่ากระดูกปลูกที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ (cancellous) เพราะว่าลักษณะที่เป็นรูพรุนของกระดูกปลูกลักษณะนี้มีการสร้างหลอดเลือดเข้าไปทดแทนได้เร็วกว่า

การทำงานของกระดูกปลุกที่ใส่เข้าไปในบริเวณของร่างกาย เป็นลักษณะการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างกระดูกขึ้นใหม่โดยรอบบริเวณที่วางกระดูกปลุก หรือมีการงอกเข้าไปแทนที่ในชั้นกระดูกปลุก โดยทำการละลายกระดูกปลุกออกก่อน สรีรวิทยาของกระดูกในภาวะปกติจะมีการละลายกระดูกจากผิวในกระดูก และมีการสร้างกระดูกใหม่ที่ผิวภายนอก โดยวิธีนี้ก็จะทำให้กระดูกมีขนาดใหญ่ขึ้น การที่กระดูกหักกลับเข้าสู่สภาพปกติเป็นการสร้างกระดูกขึ้นใหม่เชื่อมสนิทจนไม่มีรอยแผลตรงส่วนที่หัก ในการละลายกระดูกหักจะมีเซลล์หลายนิวเคลียส เรียกว่า ออสติโอคลาสต์ (osteoclast) จะทำหน้าที่ทำลายเนื้อกระดูกที่ประกอบด้วยเกลือแร่แล้วสลายตัวไป ส่วนการสร้างเนื้อกระดูกใหม่ที่เกิดภายหลังการละลายกระดูกจะมีเซลล์ออสติโอบลาสต์ (osteoblast) ซึ่งเปลี่ยนรูปมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก เซลล์นี้จะสร้างเนื้อกระดูกระยะแรก (osteoid) ขึ้นที่ผิวของกระดูก โดยจะมีแร่ธาตุมาปกคลุมเนื้อกระดูกที่สร้างระยะแรกนี้ และตัวเซลล์ที่สร้างกระดูกก็จะแทรกอยู่ในเนื้อกระดูกที่เซลล์สร้างขึ้นเอง ลักษณะของกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่นี้บางที่ไม่สามารถแยกจากเนื้อกระดูกเดิมได้

ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ในการติดของกระดูกปลุกจะเห็นหลอดเลือดเกิดขึ้นใหม่ในเนื้อกระดูกปลุกที่ใส่เข้าไปในร่างกาย เพื่อเป็นการนำเซลล์เข้าไปสร้างและทำลายเนื้อกระดูกในเวลาเดียวกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าลักษณะที่กระดูกปลุกติดเร็วหรือช้า ขึ้นอยู่กับการเกิดหลอดเลือดในเนื้อกระดูกปลุกที่ใส่เข้าไป และปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่ง คือ สภาพของกระดูกปลุก และกระดูกเดิมที่วางกระดูกปลุกลงไป

## 2.1.7 วัสดุแทนกระดูก (Bone Grafting Materials) [Goldberg, V.M. 2003, Doron, I. และ Amy, L. 2003]

2.1.7.1 Autografts กระดูกจากตัวผู้ป่วยเองยังถือว่าเป็นมาตรฐานสำหรับการทำการปลุกกระดูก และมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้วัสดุแทนกระดูกชนิดอื่น แต่การทำการปลุกกระดูกด้วยเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยเองนั้น ต้องมีการผ่าตัดหลายบริเวณ เพื่อให้ได้ปริมาณของกระดูกของผู้ป่วยเพียงพอที่จะนำมาปลุกในบริเวณที่มีการสูญเสีย ซึ่งสร้างความเจ็บปวดทรมานให้กับผู้ป่วย นอกจากนั้นอาจจะเกิดผลข้างเคียงมากมาย ไม่ว่าจะเป็นการอักเสบจากการติดเชื้อ หรือการกระทบกระเทือนอวัยวะข้างเคียงได้

2.1.7.2 Allografts คือ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแต่ไม่ใช่ของตัวเองคุณสมบัติของ allografts ขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียม คือ การแช่แข็งให้เย็นจัด (fresh frozen) การทำให้แห้ง (freeze dried) และการลดปริมาณแร่ธาตุและแคลเซียม (demineralization) กระดูก

ปลูกชนิดแช่เย็นจัด (fresh frozen allograft) จะมีความแข็งแรงเชิงกลเหมือนกระดูก แต่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันต่อต้าน (immunogenic) ส่วนวิธีการทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dry) จะช่วยลดปฏิกิริยาการต่อต้าน แต่ก็มีส่วนลดความแข็งแรงของกระดูกปลูกมากถึงร้อยละ 50 และสำหรับกระดูกปลูกชนิด mineralized allograft มีคุณสมบัติเป็น osteoconductive ที่ดี แต่เป็น osteoinductive ที่ไม่ดี ซึ่งต้องอาศัยเซลล์และฮอร์โมนในร่างกายของผู้รับในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกต่อไป

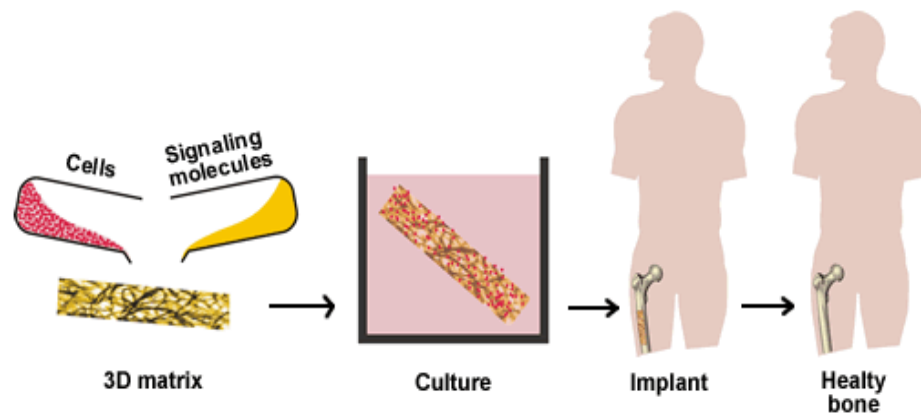
ข้อดีของกระดูกปลูกจากผู้บริจาค (Allografts) คือ หลีกเลี่ยงการบาดเจ็บบริเวณที่ตัดชิ้นส่วนกระดูก (no donor site morbidity) และสามารถให้ได้ปริมาณมากกว่า Autograft ข้อเสียของการใช้ allograft เช่น การติดเชื้อและการแพร่เชื้อโรค (disease transmission) การสมานเชื่อมกันกับกระดูกของผู้ป่วย (host bone) เกิดขึ้นช้า เป็นต้น

2.1.7.3 Xenografts คือ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับมาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน เช่น การปลูกกระดูกในคนโดยใช้กระดูกวัว เป็นต้น การใช้ Xenografts มาทดแทนการสูญเสียของกระดูกถือว่าได้ผลดี ราคาไม่แพง และไม่มีข้อถกเถียงทางศีลธรรมมากนัก แต่อย่างไรก็ตาม Xenografts ยังมีจุดบกพร่องในแง่ของการเกิดโรคติดต่อ และไม่ยอมรับ Xenografts ของร่างกายโดยมีการต่อต้านทางระบบภูมิคุ้มกัน Xenografts ที่มีขายอยู่ในท้องตลาด เช่น Pegggen P-15 ของ Dentsply และ Bio-oss ของ Osteohealth ซึ่งต่างก็มีองค์ประกอบเป็นไฮดรอกซีอะปาทาइट ที่พัฒนามาจาก Bovine Bone

2.1.7.4 Alloplasts คือ วัสดุสังเคราะห์ที่นำมาใช้ทดแทนเนื้อเยื่อและอวัยวะ เช่น เซรามิก, ไตรแคลเซียมฟอสเฟต, พอลิเมอร์ต่างๆ โดยข้อดีของ Alloplasts คือมีปริมาณมาก ราคาไม่แพง ไม่มีปัญหาในแง่ของการติดเชื้อโรคติดต่อจากคน และสัตว์ นอกจากนี้ยังมีระยะเวลาในการสลายตัวที่นานกว่า ทำให้มีเวลาเพียงพอในการรักษา จนเกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาใหม่ แต่ Alloplasts ยังมีข้อเสียในแง่ของการที่ไม่ได้เป็นวัสดุธรรมชาติ ไม่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิด Alloplasts ที่มีขายอยู่ตามท้องตลาด ได้แก่ Osteogen ของ Implants เป็น synthetic bioactive resorbable graft, Cerasorb ของ Curasan ซึ่งเป็นเบต้าไตรแคลเซียมฟอสเฟต มีลักษณะคล้ายไฮดรอกซีอะปาทาइट เป็นต้น

## 2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) [Langer, R. และคณะ 2000]

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์ใหม่ซึ่งผสมผสานความรู้ทั้งวิศวกรรมศาสตร์ วัสดุศาสตร์ ชีววิทยาของเซลล์ ฟิสิกส์ และ เคมี เพื่อการออกแบบโครงสร้างของเนื้อเยื่อและอวัยวะตามโครงสร้างจริงตามธรรมชาติ โดยการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) และเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์จนได้เนื้อเยื่อขึ้นมา ซึ่งวัสดุที่นำมาทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์อาจได้จากวัสดุสังเคราะห์ที่สลายตัวได้ในร่างกาย หรือ อาจได้จากการนำอวัยวะที่บริจาคมาทำการล้างและขจัดเซลล์ออกหมด แต่ยังคงความเป็นโครงสร้างค้ำจุน เพื่อใช้ในการรักษาโรคกระดูก ซึ่งการสูญเสียกระดูกเกิดขึ้นได้เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น โรคทางกระดูก การผ่าตัด และอุบัติเหตุ โดยมีวิธีการรักษาได้หลายรูปแบบด้วยการปลูกถ่ายกระดูกซึ่งโดยทั่วไปมี 3 วิธี คือ การปลูกถ่ายด้วยกระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง (autograft) การปลูกถ่ายด้วยกระดูกจากผู้อื่น (allograft) และการปลูกถ่ายด้วยวัสดุทดแทนทางชีวภาพ (biomimetic materials) [Zhang, Z.Y. และคณะ 2009] แต่ทั้ง 3 วิธีก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายด้าน เช่น ด้านวัสดุ พื้นที่ผิวที่รับการปลูกถ่ายกระดูก ปัญหาการยึดเกาะ และการติดเชื้อ จึงมีการพัฒนาวิธีสังเคราะห์วัสดุเพื่อมาแก้ปัญหาดังกล่าว โดยอาศัยความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เพื่อพัฒนาวัสดุทดแทนและนำไปใช้บริเวณกระดูกที่เสียหายเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกภายในร่างกาย ซึ่งวัสดุทดแทนหรือที่เรียกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) มักถูกผลิตขึ้นจากวัสดุชีวภาพจำพวกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต โดยจะต้องศึกษาพัฒนาองค์ความรู้ที่สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) สารโปรตีนกระตุ้นการเจริญ (growth factors) และเซลล์ (cells) สำหรับสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะทดแทน [Pek, Y.S. และคณะ 2004]



รูปที่ 2.3 หลักการเบื้องต้นของวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

[[http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone\\_tissue\\_engineering/](http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/)]

## 2.3 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold)

โครงเลี้ยงเซลล์เป็นวัสดุทรงสามมิติที่สร้างขึ้นชั่วคราวเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตภายในโครงเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ ซึ่งต้องมีสารอาหารและการควบคุมโมเลกุลที่ต้องแพร่ผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ หลักที่ต้องคำนึงถึงในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ไป คือ

2.3.1 โครงสร้างเป็นสามมิติ เพื่อเป็นโครงสร้างค้ำจุนให้เซลล์สามารถเจริญเติบโต

2.3.2 มีความพรุนสูง โดยมีความพรุนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์และรูพรุนต้องมีขนาดที่เหมาะสม โดยทั่วไปขนาดรูพรุนประมาณ 100-200 ไมโครเมตร และรูพรุนควรเชื่อมต่อกัน (Interconnected pore) เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ สารอาหารและของเสียต่างๆ สามารถส่งผ่านภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างสะดวก

2.3.3 มีโครงสร้างทางกายภาพหรือสมบัติทางเคมีสำหรับให้เซลล์สามารถยึดเกาะ (Attachment) เจริญเติบโต (Proliferation) และเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้

2.3.4 มีความสามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ (biodegradable)

2.3.5 มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และไม่เป็นพิษต่อเซลล์

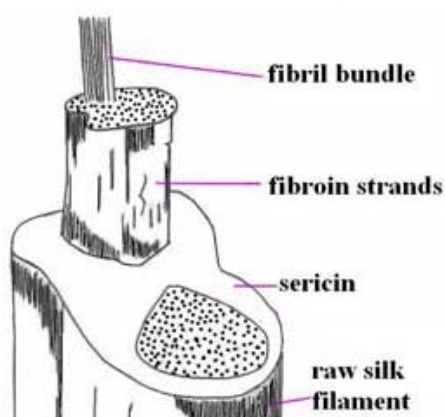
Lannutti J. พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) ที่ดีต้องมีปริมาณขนาดของรูพรุนและลักษณะของพื้นผิวทั้งทางกายภาพและเคมีเอื้ออำนวยต่อการชักนำให้เซลล์มายึดเกาะ (Attachment) เจริญเติบโต (Proliferation) และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ [Lannutti, J. และคณะ 2007] โดยงานวิจัยของ Palsson B. ได้รายงานว่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปร่างโค้งช่วยให้ปฏิกิริยาตอบสนองกับเซลล์และเนื้อเยื่อดี นอกจากนี้โครงสร้างของรูพรุนควรมีความเชื่อมโยงกัน เพื่อให้เส้นเลือดสามารถเข้าไปหล่อเลี้ยงเซลล์ที่เข้าไปภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้ดี [Paul, K.C. และคณะ 2008] จากงานวิจัยของ Chang B.S. ได้รายงานว่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนเชื่อมโยงกันสามารถช่วยให้เกิดการสร้างกระดูกได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนแบบไม่เชื่อมโยง [Chang, B.S. และคณะ 2002]

## 2.4 ชีววัสดุ (Biomaterial)

2.4.1 ไฟโบรอินไหมไทย (Thai Silk Fibroin) [Vepari, C. และคณะ 2007, Lv, Q. และคณะ 2005]

ไหมไทยจัดอยู่ในไหมเลี้ยงสายพันธุ์ *Bombyx mori* แต่ไหมไทยแตกต่างจากไหม *Bombyx mori* อื่นๆ คือ รังไหมไทยจะมีสีเหลือง และมีกาวไหม (Sericin) มากกว่าไหมเลี้ยงชนิดอื่น เส้นใยของไหมมีลักษณะเป็นเส้นใยพอลิเมอร์ของโปรตีน ประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ประเภทคือ ไฟโบรอิน (Fibroin) และเซรีซินหรือกาวไหม (Sericin) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โดยไฟโบรอินจะเป็นแกนของเส้นใยไหม และเซรีซินจะอยู่โดยรอบหุ้มไฟโบรอินไว้ เส้นใยไหมโดยธรรมชาตินั้นมีคุณสมบัติในการต้านแรงดึงได้สูง (High tensile strength) มีความเหนียวและยืดหยุ่นสูง (อาจสูงได้ถึง 35%) และสามารถคงรูปได้ในอุณหภูมิสูงถึง 250 องศาเซลเซียส

ไฟโบรอินจากไหมนั้นถูกนำมาใช้เป็นชีววัสดุในการทำโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้หลากหลายรูปแบบ ทั้งในรูปแบบแผ่นเจล เส้นใยนาโน และโครงสร้างพอร์นคล้ายฟองน้ำ เนื่องจากมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีความแข็งแรง ยืดหยุ่นสูง และมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกายได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ยังมีความเป็นผลึกที่ควบคุมได้ ตลอดจนสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล ส่งผลให้ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากที่จะนำมาใช้ในงานควบคุมการปลดปล่อยสาร (Controlled release) และประยุกต์ใช้กับการนำส่งยา (Drug delivery) ในหลากหลายรูปแบบโครงสร้าง ทั้งเป็นแผ่นฟิล์ม เป็นทรงกลมขนาดไมโคร (Microsphere) เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ และเป็นโครงสร้างหลายชั้นทับซ้อน (Multilayers) [Biman, B. และคณะ 2009]

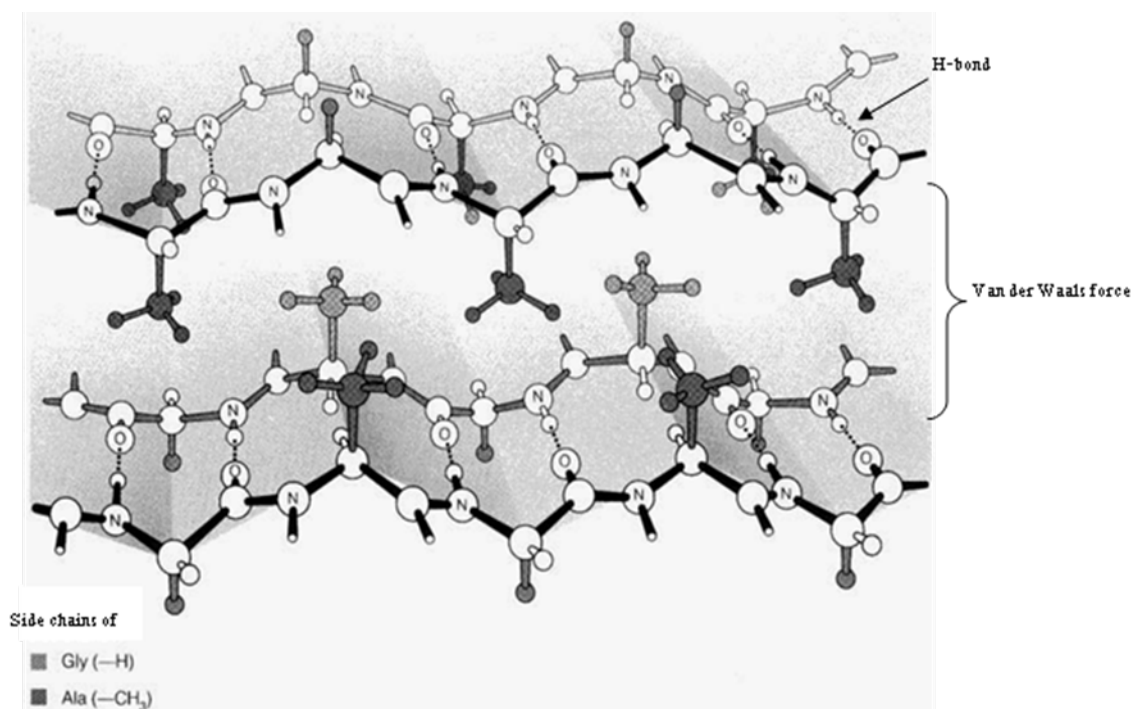


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเส้นใยไหม

[[http://www.en.rmut.ac.th/prd/Journal/Silk\\_with\\_figuresnew.pdf](http://www.en.rmut.ac.th/prd/Journal/Silk_with_figuresnew.pdf)]

## โครงสร้างของไฟโบรอิน

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ มีประมาณ 75-80% ของน้ำหนักไหมดิบ ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 15 ชนิด โดยมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด คือ โกลซีน อะลานีน เซรีน และไทโรซีน ดังแสดงในรูปที่ 2.5 โครงสร้างไฟโบรอินของไหมเลี้ยงส่วนใหญ่จะเป็นแบบ  $(\text{Gly-Ala-Gly-X})_n$  โดย X อาจเป็นเซรีน หรือไทโรซีน ไฟโบรอินที่เป็นเส้นใยไหมเกิดจากปฏิกิริยา condensation ของกรดอะมิโน กลายเป็น polypeptide chains โดยโครงสร้างหลักของไฟโบรอินจะเป็นแผ่นพลิตเบต้า ( $\beta$ -pleated sheet) หลายแผ่นติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน อีกทั้งยังมีแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างแผ่นเสริมความแข็งแรง จึงทำให้ไหมมีความแข็งแรงมาก ยืดได้เหนียวทนทาน และมีความเงางาม



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน

[[http://www.concord.org/silk/silk\\_beta.html](http://www.concord.org/silk/silk_beta.html)]

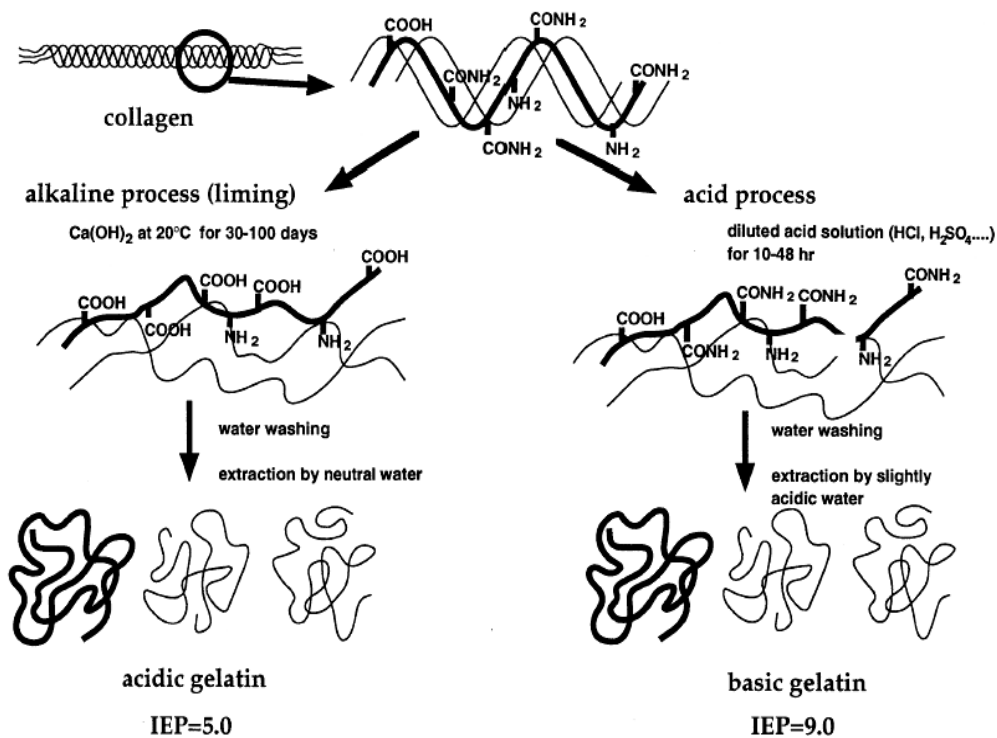
## โครงสร้างของเซรีซิน

เซรีซินเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำมีประมาณ 20-25% เซรีซินจะเคลือบอยู่บนเส้นใยไฟโบรอิน และมีกรดอะมิโนชนิดเซรีน ทรีโอนีน ซึ่งเป็น Oxy-amino acid และอาร์จินีน และไลซีนของ basic amino อยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดอะมิโนอื่นๆ อีกที่คล้ายคลึงกับไฟโบรอิน



2.4.2 เจลาติน (Gelatin) [Yasuhiko, T. และคณะ 2004, Young, S. และคณะ 2005]

เจลาติน คือโปรตีนที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแต่สกัดได้จากคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อ ผิวหนัง กระดูกของมนุษย์และสัตว์ ขั้นตอนในการผลิตเจลาตินเริ่มจากการสกัดเจลาตินจากคอลลาเจนด้วยกระบวนการ acidic หรือ alkaline process แล้วจึงผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (Purification) เพิ่มความเข้มข้นและการทำให้แห้ง โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกายด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ และมีลักษณะที่ดีในการควบคุมการส่งผ่าน



รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin

[Yasuhiko, T. และคณะ 2004]

เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด [รูปที่ 2.6] คือ

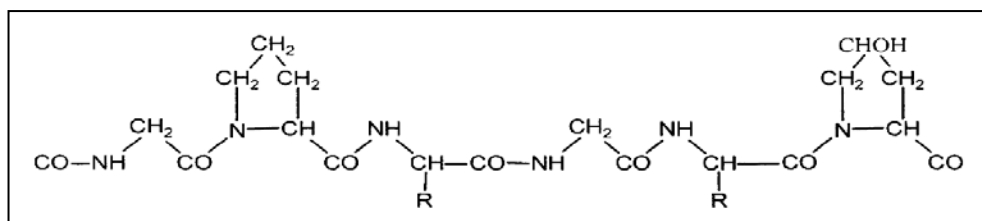
- Basic gelatin (ชนิด A) ได้มาจาก acid process สกัดได้ยากกว่าแบบ alkaline process และเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจนมีน้อย จึงทำให้เจลาตินมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจน และเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

- Acidic gelatin (ชนิด B) ได้มาจาก alkaline process เป็นขบวนการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุลบ และมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส สมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B สรุปดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B [Yasuhiko, T. และคณะ 2004]

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

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด และมีปริมาณของกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ซึ่งโครงสร้างของเจลาตินประกอบไปด้วยหน่วยซ้ำของกรดอะมิโนที่เรียงตัวกัน คือ glycine-X-Y ซึ่ง X และ Y คือ proline และ hydroxyprolin ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2.7 และกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophilic จึงทำให้เจลาตินละลายน้ำได้ดีซึ่งสามารถสรุปปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในเจลาตินดังตารางที่ 2.3



เมื่อ R = glycine-X-Y triplet, X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

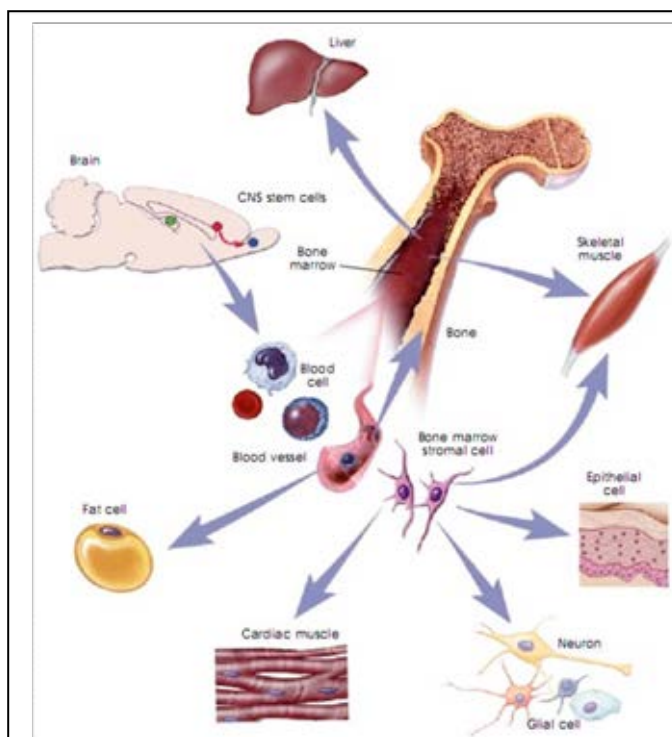
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเจลาติน [Yasuhiko, T. และคณะ 2004]

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาติน [Yasuhiko, T. และคณะ 2004]

กรดอะมิโน	%กรดอะมิโนในเจลาติน
Arginine	7.8
Glutamic acid	10.0
Histidine	0.8
Hydroxyproline	11.9
Leucine	3.3
Methionine	0.7
Proline	12.4
Theronine	2.1
Valine	2.2
Alanine	8.9
Asperic acid	6.0
Glycine	21.4
Hydroxylysine	1.0
Isoleucine	1.5
Lycine	3.5
Phenylanine	2.4
Serine	3.6
Tyrosine	0.5
<b>รวม</b>	<b>100</b>

## 2.5 เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSC)

Mesenchymal stem cell คือ เซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน เนื้อเยื่อไขมัน เส้นเอ็นและกล้ามเนื้อ เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแยกออกมาจากไขกระดูก เนื้อเยื่อไขมันและเลือดสายสะดือ (cord blood) เป็นต้น ในปี 1995 Lennon และคณะ แยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจาก Fisher F-344 rat อายุ 2-4 เดือน [Lennon, D.P. และคณะ 1995] เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเมื่อนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์ยึดเกาะบนจานเลี้ยงเซลล์และเริ่มเจริญเติบโตรวมกันเป็นกลุ่มหรือเรียกว่า fibroblastic-like cell cluster (fibroblast colony forming units: CFU-F) [Sautier, J.M. และคณะ 1993] การควบคุมให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ สามารถทำได้โดยการใส่ growth factor และ cytokines เป็นต้น นอกจากนี้การกำหนดให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับส่วนประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และการเกิดกระดูกต้องการโครงเลี้ยงเซลล์ลักษณะ 3 มิติเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.8 สารที่ใช้ในการเหนี่ยวนำกระบวนการเกิด Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.9

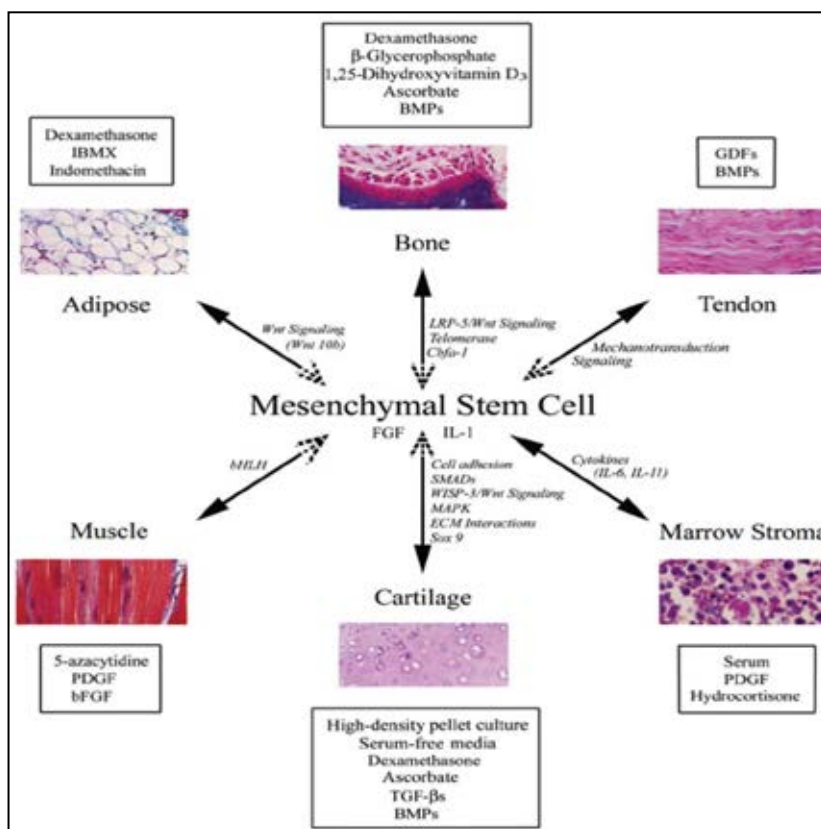


รูปที่ 2.8 ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ

[Ruth, K. และ Lana, R.S. 2001]

สถาบัน The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy ได้กำหนดเกณฑ์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell (MSC) ดังนี้ [Dominici, M. และคณะ 2006]

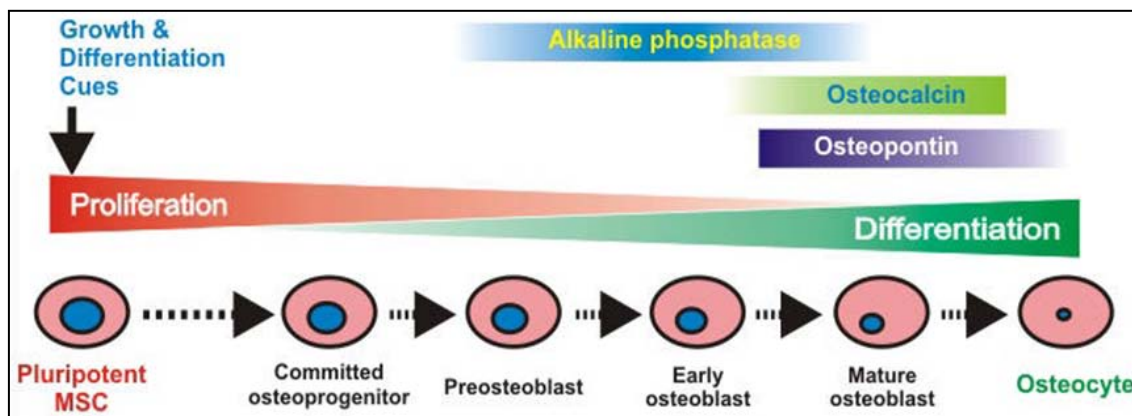
1. เซลล์สามารถเจริญเติบโตเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงพลาสติกภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงมาตรฐานได้
2. เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Flow cytometry ต้องปรากฏเซลล์ที่มีแอนติเจนเหล่านี้มากกว่าร้อยละ 95 ของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ CD73, CD90 และ CD105 และต้องปรากฏเซลล์ที่มีแอนติเจนเหล่านี้ น้อยกว่าร้อยละ 2 ของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ CD45, CD34, CD14 หรือ CD11b, CD79a หรือ CD19 และ HLA class II
3. สามารถเกิด Differentiation ไปเป็นเซลล์ Osteoblasts, Adipocytes และ Chondroblasts ได้ภายใต้สภาวะการชักนำมาตรฐานนอกร่างกายสัตว์ทดลอง



รูปที่ 2.9 สารที่ใช้ในการเหนี่ยวนำกระบวนการเกิด Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิด ไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ [Rocky, S.T. และคณะ 2002]

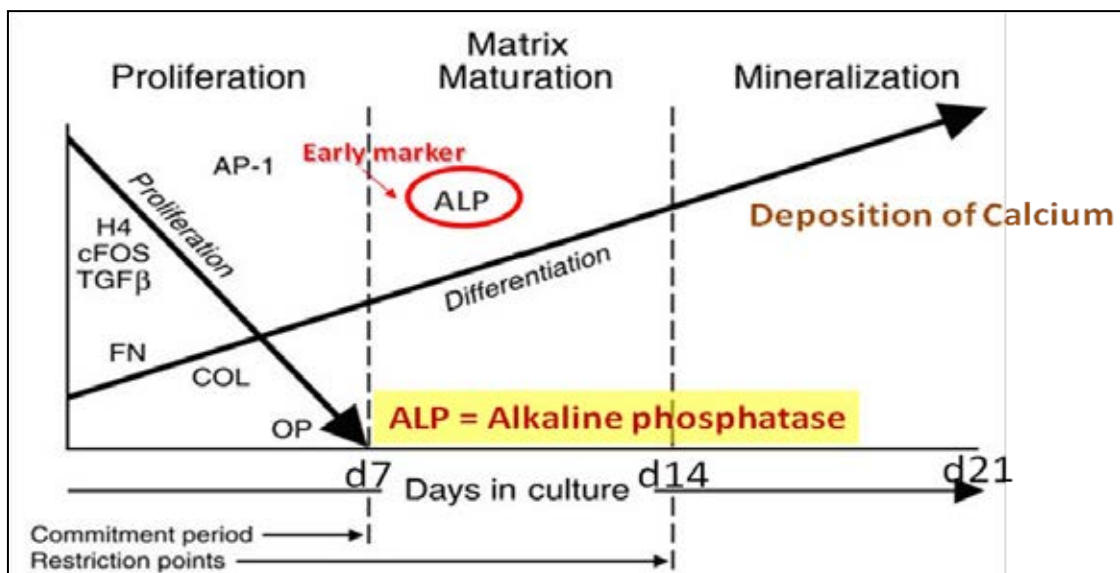
การชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation นิยมใช้ Dexamethasone, L-Ascorbic acid 2-phosphate และ  $\beta$ -Glycerophosphate สำหรับ Dexamethasone เป็นสารกลุ่ม Glucocorticoid ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการเกิด Osteogenic differentiation ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ถ้าใช้ที่ความเข้มข้นต่ำจะมีผลกระตุ้นการเกิด Osteogenic differentiation แต่ถ้าใช้ที่ความเข้มข้นสูง จะเกิดการยับยั้ง และทำให้เกิด Adipogenic differentiation ขึ้นแทน [Nicholas, W.M. และ Jeremy, J. M. 2006] หมู่ฟอสเฟตอิสระจากสารชักนำที่ใช้สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนกำหนดการสร้าง Core binding factor alpha 1 (Cbfa1) ซึ่งสำคัญต่อกระบวนการเกิด Osteogenesis โดยที่ Wnt-3a สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase โดยไม่มีผลต่อระดับปริมาณของ Cbfa1 สำหรับ Ascorbic acid และ 1,25-dihydroxyvitamin D3 ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และกระตุ้นการสร้าง Osteocalcin [Rocky, S.T. และคณะ 2005]

ภายหลังเริ่มชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation จะเกิดการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ภายใน 7-14 วัน และเมื่อชักนำเป็นเวลานานจะเกิดการแสดงออกของ Bone sialoprotein, Osteocalcin, Osteonectin และเกิดการสะสมผลึกแคลเซียม [Nicholas, W. M. และ Jeremy, J. M. 2006] การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก แสดงดังรูปที่ 2.10 และสารที่หลั่งออกมาระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.10 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

[Lian, J.B. และ Stein, G.S. 2000]



รูปที่ 2.11 สารที่หลั่งออกมาระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

[Komori, T. และ Kishimoto, T. 1998]

## 2.6 การเชื่อมขวาง (Crosslinking) [Lee, J.M. และคณะ 1996]

การเชื่อมขวางเป็นวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญมากในการปรับปรุงสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน เนื่องจากการเชื่อมขวางนั้นเป็นการทำให้สมบัติเชิงกล (mechanical properties) อัตราการย่อยสลาย (degradation rate) และความสามารถในการบวมน้ำ (swelling capacity) ของโครงเลี้ยงเซลล์มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น เนื่องจากการเชื่อมขวางสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายและอัตราการสร้างเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ [Ma, L. และคณะ 2003] ซึ่งกระบวนการเชื่อมขวางนั้นมีวิธีการอยู่หลายวิธี โดยจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ การเชื่อมขวางทางกายภาพ และการเชื่อมขวางทางเคมี

การเชื่อมขวางทางกายภาพ ได้แก่ การใช้อุณหภูมิ หรือ dehydrothermal treatment (DHT) การใช้รังสี เช่น UV-irradiation เป็นต้น ส่วนการเชื่อมขวางทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีประเภท aldehyde เช่น glutaraldehyde formaldehyde glyceraldehydes การใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide(EDC) การใช้ polyepoxides และการใช้ isocyanates เป็นต้น [Young, S. และคณะ 2005]

## 2.6.1 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพ

### 2.6.1.1 การเชื่อมขวางโดยการให้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT) [Pek, Y.S.

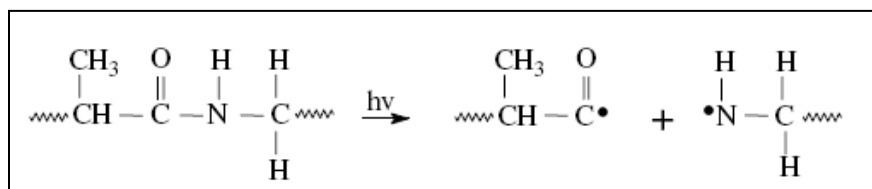
และคณะ 2004, Wess, T. และคณะ 2000, Friess, W. 1998]

การเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าิยมใช้เพื่อหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ใช้เป็นตัวเชื่อมขวาง (cross-linker) โดยอาศัยความร้อนภายใต้สุญญากาศ ซึ่งกระบวนการนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์ (amide) ในสารจำพวกโปรตีนซึ่งมีหมู่เอมีน (amine) เป็นองค์ประกอบจากปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) ด้วยปฏิกิริยา esterification ระหว่างโซ่ของหมู่เอมีนโดยทำการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่แล้วปรับเปลี่ยนระยะเวลาให้เหมาะสม เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสม ตัวอย่างเช่น โครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างมาจากคอลลาเจนถูกปรับปรุงให้มีความแข็งแรงมากขึ้น และมีการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้าลง ด้วยการเชื่อมขวางระหว่างโซ่ (interchain crosslinks) จากปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) ด้วยปฏิกิริยา esterification หรือการสร้างพันธะเอไมด์ตัวใหม่ ระหว่างหมู่เอมีนของโมเลกุลคอลลาเจนที่อยู่ติดกันในโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT แล้วจะทำให้ปริมาณหมู่เอมิโนอิสระลดลงและปริมาณน้ำในโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงด้วย ส่งผลให้ tensile strength เพิ่มขึ้น [Pieper, J. และคณะ 2000] และเมื่อมีการนำการเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT มาใช้กับคอลลาเจนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าวิธีการนี้จะขับน้ำออกมาจากโมเลกุลของคอลลาเจน และจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนภายในโซ่ของคอลลาเจน แต่การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้ก็ยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของคอลลาเจน (denature collagen) และความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ แต่มีรายงานว่าได้มีการนำวิธี DHT ไปใช้ร่วมกับการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี EDC/NHS ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากคอลลาเจนผสมกับ chondroitin-6-sulfate การเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีน (-NH<sub>2</sub>) ของคอลลาเจนกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของ chondroitin-6-sulfate เริ่มต้นจากการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนคอลลาเจน 92% chondroitin-6-sulfate 8% โดยอาศัยเทคนิคการทำแห้งแข็ง (freeze-dried) ก่อนแล้วจึงนำมาเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT ในตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven) ที่สภาวะ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นความร้อนภายใต้สุญญากาศจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์จากโมเลกุลที่อยู่ติดกันจากหมู่-NH<sub>2</sub> และ-COOH ของคอลลาเจน และหมู่-OH ของ chondroitin-6-sulfate ซึ่งสามารถเพิ่มความสามารถในการบวมน้ำสูงขึ้น 1.5 เท่า และเพิ่มความแข็งแรงทางกลสูงขึ้น 3 เท่าให้กับโครงเลี้ยงเซลล์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี EDC/NHS ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว [Pek, Y.S. และคณะ 2004]



### 2.6.1.2 การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสีอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Irradiation, UV)

การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสี UV เกิดจากการป้อนรังสี UV โดยกระบวนการ photodegradation เข้าไปตัดโซ่ระหว่างพันธะภายในโมเลกุลของคอลลาเจนเกิดเป็นหมู่เรดิคัล (free radical) ของหมู่เอมีนอิสระขึ้น ซึ่งหมู่เอมีนอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะไปเชื่อมขวางกับหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนโมเลกุลอื่นทำให้เกิดการเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีนขึ้น [Sionkowska, A. และคณะ 2006] ดังแสดงในรูปที่ 2.12

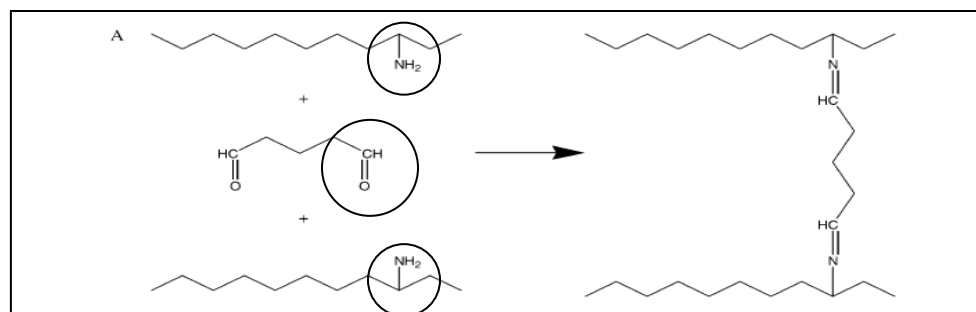


รูปที่ 2.12 ภาพแสดงการเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวาง  
โดยการใช้ UV irradiation [Sionkowska, A. และคณะ 2006]

## 2.6.2 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางเคมี

### 2.6.2.1 การเชื่อมขวางโดยใช้ Glutaraldehyde (GA)

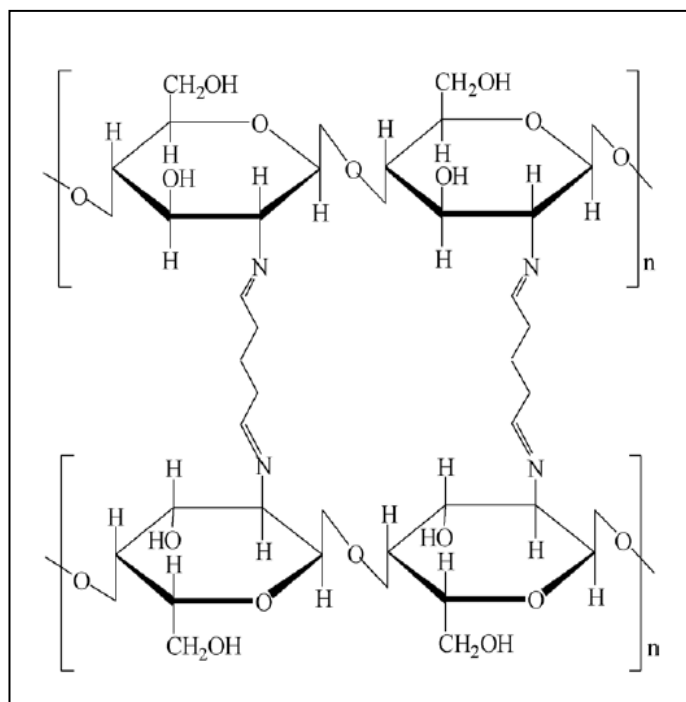
GA เป็นสารเคมี (reagent) ที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านการแพทย์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมขวาง (crosslinking agent) สำหรับโปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์ การเชื่อมขวางของคอลลาเจนจะเกิดระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA กับหมู่เอมีน (-NH<sub>2</sub>) ของคอลลาเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 แสดงการเชื่อมขวางของคอลลาเจนกับ GA

[Zhang, Y. และคณะ 2006]

เมื่อความเข้มข้นของ GA เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง เนื่องจากการเชื่อมขวางเป็นการทำให้สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น จึงทำให้ความชอบน้ำ (hydrophilic) ของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันจะมีระดับของการย่อยสลายทางชีวภาพที่ไม่เท่ากัน พบว่าเมื่อทำการเชื่อมขวางด้วย GA จะช่วยลดระดับของการย่อยสลายทางชีวภาพให้ช้าลง โดยพบว่าถ้าใช้คอลลาเจนเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว จะเกิดการย่อยสลายที่รวดเร็ว จึงมีการทำการศึกษาเพื่อปรับปรุงสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำวัสดุชีวภาพตัวอื่นมาผสมรวมเข้ากับคอลลาเจน ซึ่งไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพตัวหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้เพื่อช่วยต้านทานการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยไคโตซานสามารถใช้หมู่อะมีน ( $-NH_2$ ) ในการเชื่อมขวางกับหมู่แอลดีไฮด์ ( $-CHO$ ) ของ GA ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในรูปที่ 2.14 [Ma, L. และคณะ 2003]



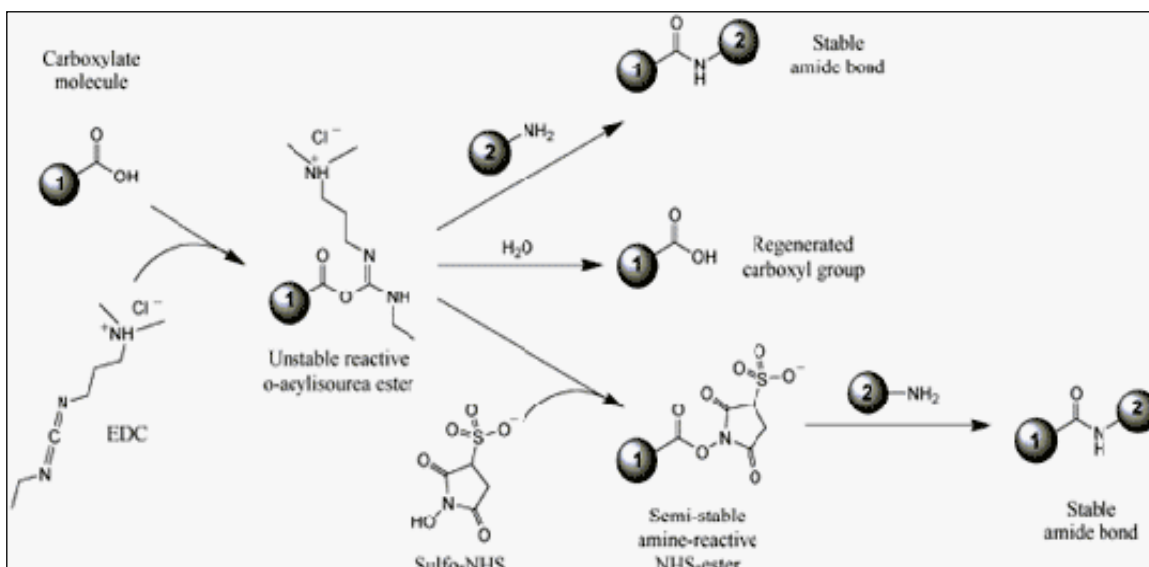
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของไคโตซานถูกเชื่อมโยงพันธะด้วยกลูตารัลดีไฮด์

[Ma, L. และคณะ 2003]

### 2.6.2.2 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

[Pieper, J. และคณะ 2000]

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) เป็นสารที่นิยมใช้กันมากในการเชื่อมขวางเนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีพิษ และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีกับเซลล์และเลือด (bio-compatible) โดยใช้ร่วมกับ N-hydroxysuccinimide (NHS) และบัฟเฟอร์ 2-morpholino-ethane sulfonic acid (MES)



รูปที่ 2.15 การเชื่อมขวางด้วย EDC

[[http://www.piercenet.com/media/edc\\_coupling](http://www.piercenet.com/media/edc_coupling)]

การเชื่อมขวางจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน aspartic หรือ glutamic ดังแสดงในรูปที่ 2.15 ซึ่งแสดงประจวบเป็นลบในคอลลาเจนกับ EDC ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ หมู่ O-acylisourea จากนั้นจะเกิดการเชื่อมขวางต่อโดยหมู่ O-acylisourea จะไปทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน lysine หรือ hydroxylysine ซึ่งแสดงประจวบเป็นบวกได้เป็นกรดอะมิโนของคอลลาเจนที่ต่อกันกับ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)urea และการเติม N-hydroxysuccinimide (NHS) ในระหว่างการเชื่อมขวางจะช่วยเพิ่มจำนวนการเชื่อมขวาง ลดหมู่อะมิโนอิสระ และเพิ่มอัตราของปฏิกิริยาในการเชื่อมขวางโดย NHS จะหยุดปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยา อันดับแรก คือ การเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของหมู่ O-acylisourea กลายเป็น 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-

propyl)urea และกลับไปเริ่มต้นใหม่ที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน และปฏิกิริยาอันดับสองหมู่ O-acylisourea ที่ไม่เสถียร จะจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของหมู่ N-acylurea การทำงานของ NHS จะทำการเปลี่ยนหมู่ O-acylisourea ให้เป็นหมู่ NHS-activated carboxylic ซึ่งจะมีความไวต่อปฏิกิริยา hydrolysis ที่ pH ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับหมู่ O-acylisourea [Pek, Y.S. และคณะ 2004]

ความแตกต่างระหว่างการใช้สารเคมี EDC และ GA คือโมเลกุลของ EDC จะไม่ตกค้างอยู่ที่หมู่ที่ถูกเชื่อมขวาง เนื่องจากผลิตภัณฑ์หลังการเชื่อมขวาง คือ อนุพันธ์ของยูเรีย หรือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea ที่สามารถกำจัดออกได้โดยการละลายน้ำ ทำให้ไม่มีสารตกค้างในโมเลกุลสารพวกโปรตีน ด้วยเหตุนี้โครมเล็งเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย EDC จึงมีความเป็นพิษต่ำ อย่างไรก็ตาม EDC กำลังอยู่ในระหว่างกระบวนการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหาร และยาจากประเทศสหรัฐอเมริกา [Lee, J.M. และคณะ 1996] ส่วนการเชื่อมขวางโดยใช้ GA จะมี GA คงอยู่ที่หมู่ที่ถูกเชื่อมขวาง ซึ่งมักจะมีกระบวนการกำจัดหมู่ aldehyde ที่ตกค้างอยู่ได้โดยการล้างด้วย glycine เพื่อทำปฏิกิริยากับ GA ที่เกินพอและล้างต่อด้วยน้ำหลายๆ รอบ [Carmen, A.C. และคณะ 2003] ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมขวางด้วย GA มีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง เนื่องจาก GA มีการกระจายตัวของพันธะทางเคมีอย่างเป็นระเบียบในโมเลกุล ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีสมบัติทางกลที่สูงขึ้น นอกจากนี้ GA ยังได้รับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาจากประเทศสหรัฐอเมริกา แล้วในปัจจุบัน [U.S. Food and Drug Administration. March 3, 2006]

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Caroline S. และคณะ 2010 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง bone-graft 6 ชนิด ได้แก่ 1. Hydroxyl-apatite (Actifuse ABX) 2. synthetic a-TCP (Biobase) 3. synthetic b-TCP (Vitoss) 4. b-TCP (Chronos) 5. processed human cancellous allograft (Tutoplast) และ 6. processed bovine hydroxyapatite ceramic (Cerabone) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human mesenchymal stem cells (hMSC) จำนวน  $2.5 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อดูการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ในวันที่ 2, 6 และ 10 วัน จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT Assay พบว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตสูงที่สุด เรียงตามลำดับ ได้แก่ 1. Tutoplast 2. Chronos 3. Actifuse ABX 4. Biobase 5. Vitoss และลำดับสุดท้าย คือ Cerabone ซึ่งจากผลการทดลองการยึดเกาะและเจริญเติบโต แสดงให้เห็นว่าเซลล์ hMSC ที่เพาะเลี้ยงใน Tutoplast มี metabolic activity ของเซลล์มาก และ Tutoplast ยังมียีนชนิด cbfa-1 ซึ่งทำให้เซลล์มีการยึดเกาะได้ดี

Chamchongkaset J. และคณะ 2008 ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก โดยใช้รังไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 แล้วทำการศึกษาผลกระทบจากการคอนจุกต์เจลาตินที่มีต่อสมบัติทางกายภาพ และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจุกต์เจลาตินมีการเชื่อมต่อนของโครงสร้างที่แข็งแรง โดยดูจากค่ามอดูลัสของแรงกด ซึ่งมีค่าสูงขึ้น 93% และสามารถส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโตของเซลล์ mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี

Donzelli E. และคณะ 2007 ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน type I จากบริษัท Gingistat เพื่อเลี้ยงเซลล์ MSC ที่แยกออกจากไขกระดูกของ Sprague-Dawley rat เพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์  $1 \times 10^6$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ เปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (CTRL) และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ osteogenic supplement (OS medium) ได้แก่ dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate และ 2-phosphate-ascorbic acid พบว่า การเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium ในวันที่ 7 หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มีการเจริญเติบโตของทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนและเซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่ม (colony) ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดา (CTRL) เซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่มในวันที่ 21 หลังจากการเพาะเซลล์ และขนาดของกลุ่มเซลล์มีขนาดเล็กกว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium ผลการวิเคราะห์ ALP activity assay พบว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม CTRL เมื่อทดสอบย้อมสีด้วย alizarin red พบว่ามี

การสะสมของแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นในการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium ช่วยกระตุ้นให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้

Eun S.G. และคณะ 2007 ได้ศึกษาผลจากการผลิตแผ่นเยื่อโปรตีน (Protein membranes) โดยใช้สารละลายผสมไฟโบรอินและเจลาตินเข้าด้วยกัน แล้วใช้เมทานอลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไฟโบรอินให้เป็นผลึก Crystallization) เมื่อศึกษาด้วย Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy พบว่าปฏิกิริยาการเกิดผลึกของสารละลายไฟโบรอินใหม่ที่ผสมกับเจลาตินไม่แตกต่างกับปฏิกิริยาการเกิดผลึกของสารละลายไฟโบรอิน ทำให้ทราบว่าคุณสมบัติการเกิดผลึกของไฟโบรอินนั้นไม่เปลี่ยนแปลงไปแม้จะผสมกับเจลาตินแล้วก็ตาม

Jetbumpenkul P. 2009 ได้ทำการศึกษาผลของการเชื่อมขวางโดยการเติม EDC/NHS โดยตรงในสารละลายผสมของไฟโบรอินและเจลาติน แล้วนำไปขึ้นรูปโดยวิธีการทำแห้งแข็งด้วยความเย็น ศึกษาอิทธิพลของสัดส่วนผสมโดยน้ำหนักระหว่างไฟโบรอินและเจลาติน พบว่า ลักษณะพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินทุกอัตราส่วนผสม ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวางนั้นล้วนแต่มีรูพรุนสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางจะมีค่าน้ำหนักที่หายไปน้อยกว่าที่ไม่เชื่อมขวาง ค่ามอดูลัสของการกดสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง และมีความสามารถในการทนแรงกดได้ดี โดยมีค่าใกล้เคียงกันทั้งในกรณีที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง ทั้งนี้เนื่องมาจากที่สัดส่วนผสมนี้ทำให้เกิดแรงดึงดูระหว่างประจุของไฟโบรอินและเจลาตินอย่างเหมาะสม การทดสอบการสลายตัวทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่า ไฟโบรอินและการเชื่อมขวางมีส่วนช่วยยืดระยะเวลาการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ให้นานยิ่งขึ้น

Lv Q. และคณะ 2007 ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและคอลลาเจน แบบ hydrogels โดยการเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) ซึ่ง hydrogels จะถูกขึ้นรูปโดยวิธีการทำแห้ง (freeze-drying) พบว่า เมื่อเชื่อมขวางด้วย EDC จะมีค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและคอลลาเจน แบบ hydrogels สูงกว่าที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วย EDC และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและคอลลาเจน แบบ hydrogels สามารถรักษารูปร่างได้ไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและคอลลาเจน แบบ hydrogels มาทดสอบ

การเจริญเติบโตโดยใช้เซลล์ vascular smooth muscle cells (VSMCs) พบว่า การเชื่อมขวางไม่ทำให้สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ hydrogels ลดลง

Mao J. และคณะ 2003 ได้ศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาติน ที่ถูกปรับปรุงโดยการเชื่อมขวางด้วย N,N (3 dimethylamino-propyl)-N'-ethyl carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ใน 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) โคโตซานที่นำมาใช้ในงานนี้มี viscosity average molecular weight เท่ากับ  $2.0 \times 10^5$  และ deacetylation degree เท่ากับ 85% ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ถูกเตรียมโดยวิธีการทำแห้งด้วยความเย็น (freeze drying) จากงานวิจัยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ได้รับการเชื่อมขวาง พื้นผิวจะมีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กและมีลักษณะเป็นเส้นใย ความสามารถในการดูดซับน้ำมากขึ้น ยืดหยุ่นได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ไม่ได้มีการเชื่อมขวาง และโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ได้มีการเชื่อมขวาง มีการสนับสนุนการเจริญเติบโตของ fibroblasts แต่จะทำให้อัตราการย่อยสลายของโครงร่างโคโตซาน/เจลาตินลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ไม่ได้มีการเชื่อมขวาง

Meinel L. และคณะ 2004 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน 3 ชนิด ได้แก่ 1.ไฟโบรอิน 2.ไฟโบรอินที่มีการปรับปรุงด้วยการคอนจูเกตกับลำดับหมู่อะมิโน RGD (silk-RGD) และ 3.โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน ทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร osteogenic medium พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการปรับปรุงด้วยการคอนจูเกตหมู่อะมิโน RGD (silk-RGD) แสดงผลการยึดเกาะของเซลล์ที่ดี อีกทั้งสามารถตรวจวัดสัญญาณการเกิดกระดูกได้อย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน

Ratanavaraporn J. และคณะ 2009 ได้ทำการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะ และการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดไขมัน และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนแผ่นฟิล์ม 3 ชนิด ได้แก่ ฟิล์มเจลาติน ฟิล์มโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (1,000 กิโลดาลตัน) และฟิล์มโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (1.4 กิโลดาลตัน) พบว่าฟิล์มเจลาติน และฟิล์มโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและแบ่งตัวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้อย่างดีเยี่ยม แต่ฟิล์มโคโตซานไม่ส่งเสริมการยึดเกาะและแบ่งตัวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด และยังพบอีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดไขมันสามารถยึด

เกาะและแบ่งตัวได้เร็วกว่าเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก แต่เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดไขมัน

Tomihata K. และคณะ 1996 ทำการเปรียบเทียบโครงสร้างของเจลลาตินแบบ 2 มิติ โดยใช้ carbodiimide 2 ชนิด คือ carbodiimide ที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ 1-ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl) carbodiimide หรือ hydrochloride (EDC) และ carbodiimide ที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ 1,3 dicyclohexyl carbodiimide (DCC) พบว่า carbodiimide ที่ละลายน้ำได้จะเกิดการเชื่อมขวางที่มีประสิทธิภาพมากกว่าชนิดที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งกลไกของการเกิดการเชื่อมขวางของเจลลาตินจะเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาเดี่ยวภายใต้สภาวะ heterogeneous และยังพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมที่ถูกใช้เป็นตัวกลาง เพื่อป้องกันการละลายของโครงสร้างเจลลาตินแบบ 2 มิติ ควรมีค่าประมาณร้อยละ 80 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิสำหรับการเชื่อมขวางควรอยู่ในช่วง 15-25 องศาเซลเซียส ซึ่งการเชื่อมขวางโดยใช้ carbodiimide จะมีประสิทธิภาพคล้ายกับการเชื่อมขวางโดยใช้ glutaraldehyde แต่จะไม่มีสารพิษตกค้าง

Tritanipakul S. และคณะ 2009 ได้ศึกษาผลกระทบจากการคอนจูเกตเจลลาติน และการสะสมสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีต่อสมบัติทางกายภาพ และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกเตรียมด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก จากการศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์แสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์มีพื้นผิวเรียบ และมีรูพรุนเชื่อมต่อกัน ความเข้มข้นของสารละลายเจลลาตินที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย มีผลต่อปริมาณเจลลาตินที่มาคอนจูเกตบนโครงเลี้ยงเซลล์ ลักษณะพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวโดยใช้สารละลายเจลลาตินที่มีความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนัก มีประสิทธิผลในการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดี ส่วนการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่า การมีไฮดรอกซีอะพาไทต์มาสะสมอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีพื้นผิวขรุขระ มีความพรุนลดลง และช่วยในการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดี



Yasuhiko T. และคณะ 2004 ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ( $\beta$ -tricalcium phosphate:  $\beta$ -TCP) ในปริมาณต่างๆ และนำไปทดสอบเลี้ยงเซลล์ mesenchymal stem cells (MSCs) ที่แยกจาก bone marrow ของหนู (Fisher 344 rat เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์) เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูก เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสม  $\beta$ -TCP ที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งมีขนาดรูพรุน 180-200 ไมโครเมตร ความพรุน 96% ทดสอบเลี้ยงเซลล์ MSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 15% FCS พบว่า ที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี  $\beta$ -TCP อัตราส่วนต่างๆ ได้ดีเท่ากัน และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย  $\beta$ -TCP 50% โดยน้ำหนักสามารถส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูกมากที่สุด

## บทที่ 3

### วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 รังไหม *Bombyx mori* cocoon (พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ1 สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ, นครราชสีมา, ไทย)
- 3.1.2 เจลาติน ชนิดเอ (พีไอ 9, บริษัท Nitta Gelatin Inc., Tokyo, ญี่ปุ่น)
- 3.1.3 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , บริษัท Ajax Finechem, Pty'Ltd, ออสเตรเลีย)
- 3.1.4 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr, บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน)
- 3.1.5 สารละลายอีดีซี (EDC, บริษัท Nacalai Tesque, ญี่ปุ่น)
- 3.1.6 สารละลายเอ็นเอสเอส (NHS, บริษัท Nacalai Tesque, ญี่ปุ่น)
- 3.1.7 Dulbecco's phosphate buffer saline without calcium and magnesium (PBS(-) powder, Nissui Pharmaceutical Co. Ltd)
- 3.1.8 โซเดียมอะไซด์ (บริษัท Labchem, APS, ออสเตรเลีย)
- 3.1.9 Collagenase from clostridium histolyticum (2.69 units/ml, บริษัท Fluka, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.10 เททานอล (99.7-100%, บริษัท VWR International, UK)
- 3.1.11 Alpha-modified eagle powder medium ( $\alpha$ -MEM(s), Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.12 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone or Biochrom or ICP)
- 3.1.13 สารละลาย Penicillin-Streptomycin (10,000 units/ml, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.14 แอลกอฮอล์ (200 mM, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.15 Sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$  99%, Fluka, Buchs, เยอรมัน)
- 3.1.16 Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin in EDTA.4Na, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.17 ไดมethylซัลโฟไซด์ (Cell culture tested DMSO, บริษัท Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.18 SDS lysis buffer
- 3.1.19 Hoechst 33258 (1 mg/ml DMSO)
- 3.1.20 สารละลายมาตรฐาน p-Nitrophenol (10 mM, บริษัท Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

3.1.21 p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (pNPP, Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

3.1.22 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.02 N NaOH, บริษัท Analar, อังกฤษ)

3.1.23 1M HCl

3.1.24 CaCO<sub>3</sub> standard

3.1.25 O-cresolphthalein complex substrate (OCPC, มวลโมเลกุล 636.62)

3.1.26 เอทานอลามีน บัฟเฟอร์ (0.88 mol/l, pH 11)

## 3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) (HWS Series 254473, ออสเตรเลีย)

3.2.2 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> incubator) (Series II 3110 Water Jacketed Incubator, Thermo Forma, สหรัฐอเมริกา)

3.2.3 เครื่อง Fluorescence microplate reader (Perkin elmer, 1420 multilabel counter, สหรัฐอเมริกา)

3.2.4 เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (Micropipette) (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, สหรัฐอเมริกา)

3.2.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning, สหรัฐอเมริกา)

3.2.6 เครื่อง Universal Testing Machine (Instron, No. 5567, สหรัฐอเมริกา)

3.2.7 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) (รุ่น JSM-5410LV จากบริษัท JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)

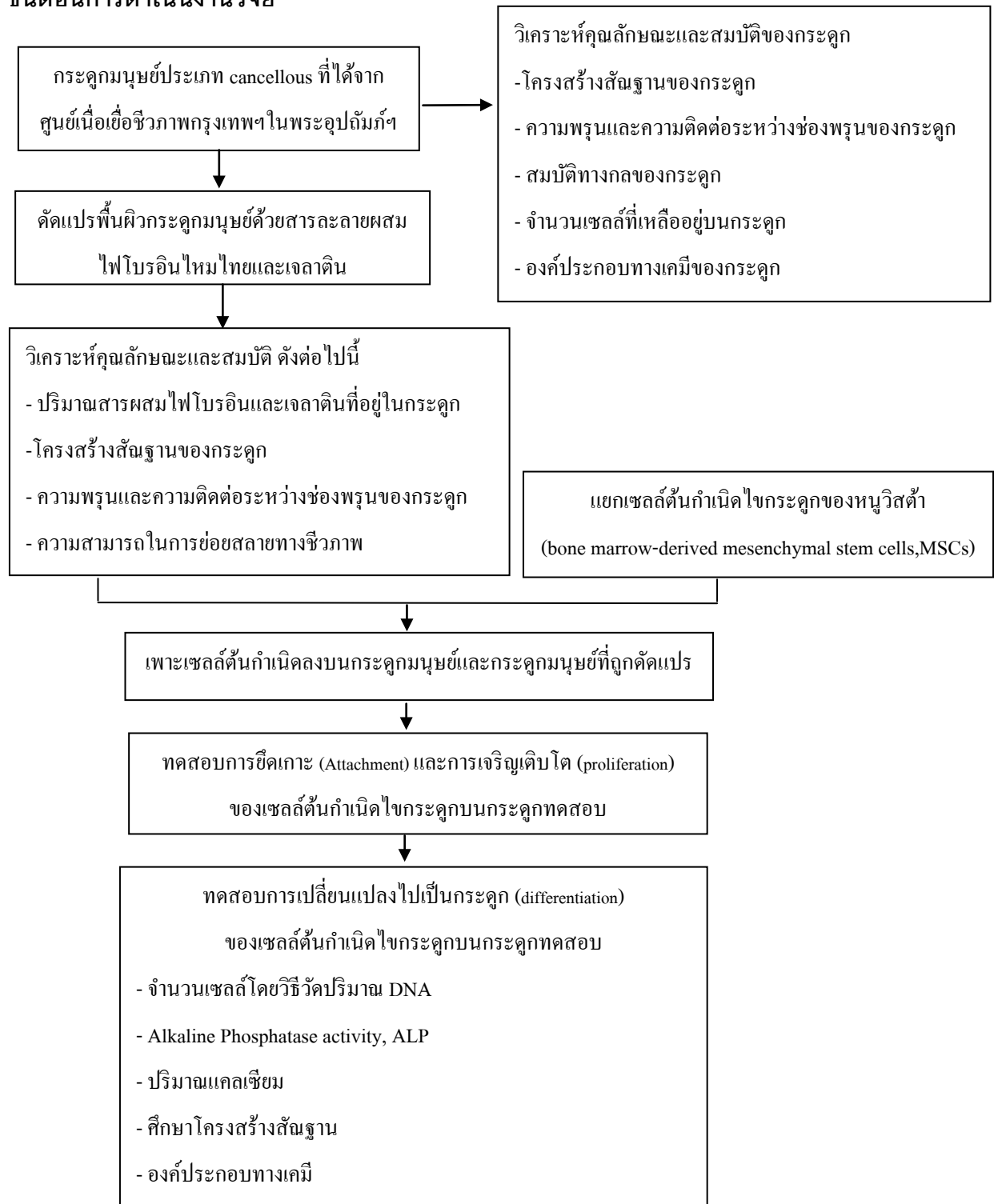
3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) (รุ่น Kubota corporation 6500, ญี่ปุ่น)

3.2.9 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส (ยี่ห้อ Heto, รุ่น PowerDry LL3000, สหรัฐอเมริกา)

3.2.10 เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Lyophilizer) (ยี่ห้อ Christ Loc-1m, รุ่น Alpha 1-4, เยอรมัน)

3.2.11 ตู้อบแห้งแบบสูญญากาศ และปั๊ม (VD23, Binder, เยอรมัน)

### 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

### 3.3.1 กระดูกมนุษย์ประเภท cancellous [ศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ในพระอุปถัมภ์ฯ]

กระดูกส่วนหัวข้อสะโพกบริเวณส่วนบนของกระดูกต้นขาของมนุษย์ (Femoral head) ที่บริจาคให้กับศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ในพระอุปถัมภ์ฯ สมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนา กรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ ถูกนำมาล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ (Sterile) เพื่อขจัดสิ่งสกปรก และแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรอกระบวนการตรวจเลือด แล้วทำการตัดกระดูกด้วยเลื่อยจนมีขนาดประมาณ  $1 \times 1 \times 0.2$  ซม.<sup>3</sup> (กว้าง x ยาว x หนา) บรรจุกระดูกในขวดปลอดเชื้อ เติมน้ำปราศจากประจุ และนำไปเขย่าในเครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic Bath) หรือเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) ที่ 200 rpm เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (หมายเหตุ เปลี่ยนน้ำเรื่อยๆจนกว่าจะใส) เติมน้ำ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  160 mM เพื่อขจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนที่เหลือ ล้าง  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ด้วยเปปซิน (Pepsin) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ในน้ำปราศจากประจุที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแช่กระดูกในเปปซิน ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อขจัดโปรตีน จากนั้นแช่กระดูกใน  $\text{NaOH}$  2 N (pH 8) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการทำงานของเปปซิน เติมน้ำ Chloroform : Methanol 2:1 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ 138 rpm 30 นาที เพื่อขจัดไขมัน ล้างกระดูกด้วยน้ำปราศจากประจุอีก 2 รอบและเทน้ำทิ้งผ่านตะแกรงปลอดเชื้อ ล้างกระดูกด้วย 70% Alcohol 3 รอบ เพื่อไล่น้ำที่ติดค้างในกระดูกออก นำกระดูกที่ได้มาทำแห้งแข็งด้วยความเย็น (freeze-drying) แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยรังสีแกมมา



รูปที่ 3.2 กระดูกที่ผ่านการมาทำแห้งแข็งด้วยความเย็น (freeze-drying) แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยรังสีแกมมา ขนาด  $1 \times 1 \times 0.2$  ซม.<sup>3</sup> (กว้าง x ยาว x หนา)

### 3.3.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติของกระดูกมนุษย์

#### 3.3.2.1 โครงสร้างพื้นฐานของกระดูก (Morphology)

วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของกระดูก cancellous รวมถึงลักษณะรูพรุน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM-JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan) โดยการนำกระดูกมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยคีมตัดกระดูก แล้วนำกระดูกที่ตัดแล้วไปเคลือบทอง ก่อนทำการถ่ายภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า จากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดของรูพรุนโดยการสุ่มวัด 100 รูในแนวราบ และแนวตัดขวางด้วยโปรแกรม Image J ค่าของขนาดรูพรุนที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 3.3.2.2 ความพรุนของกระดูก (Porosity)

วิเคราะห์ความพรุนของกระดูก ด้วยเทคนิคการแทนที่เฮกเซนในช่องว่างของกระดูกมนุษย์ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kim, U.J. [Kim, U.J. และคณะ 2005] โดยนำเฮกเซน 1 มิลลิลิตร (แทนปริมาตรด้วย  $V_1$ ) ใส่ภาชนะ จากนั้นนำกระดูกมาแช่ในเฮกเซนที่ความดันบรรยากาศเป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาตรเฮกเซนที่มีกระดูกแช่อยู่ (แทนปริมาตรด้วย  $V_2$ ) หลังจากนั้นนำกระดูกออกแล้วทำการวัดปริมาตรที่เหลือของเฮกเซน (แทนปริมาตรด้วย  $V_3$ ) คำนวณหาความพรุนของกระดูกจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ความพรุน (\%โดยปริมาตร)} = \frac{(V_1 - V_3)}{(V_2 - V_3)} \times 100$$

#### 3.3.2.3 สมบัติทางกลของกระดูก (Mechanical strength)

วิเคราะห์สมบัติทางกลโดยทดสอบความสามารถในการทนแรงกด (Compressive modulus) ของกระดูกด้วยเครื่อง Universal Testing Machine [Tangsadthakun, C. และคณะ 2007] โดยใช้อัตราการกดคงที่ 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที เพื่อคำนวณหาค่ามอดูลัสของการกด (compressive modulus) จากค่าความชันระหว่างกราฟของความเค้น (compressive stress) และความเครียด (compressive strain) ในช่วง 5-30% แรกของความเครียด โดยทำการทดสอบในสภาวะแบบแห้งและแบบเปียก สำหรับสภาวะแบบเปียก จะนำกระดูกแช่ในสารละลาย phosphate buffer saline

ที่สภาวะ pH 7.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำกระดูกออกมาแช่น้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชูปราศจากขุย ก่อนนำไปทดสอบ โดยทำการทดสอบซ้ำ 6 ครั้ง เพื่อรายงานผลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 3.3.2.4 องค์ประกอบทางเคมีของกระดูก

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) เพื่อตรวจวัดปริมาณธาตุบนกระดูกทดสอบที่ถูกปรับปรุงด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน เปรียบเทียบกับกระดูกที่ไม่ได้ถูกปรับปรุง โดยใช้ความต่างศักย์ 10 กิโลโวลต์ ตัวอย่างละ 3 ตำแหน่ง

#### 3.3.2.5 จำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่บนกระดูก

วิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่บนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับมาจากศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ ในพระอุปถัมภ์ฯ เทียบกับกราฟมาตรฐานของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู โดยวิธี DNA (DNA Assay) [Takahashi, Y. และคณะ 2005]

-เตรียมกราฟมาตรฐานจากเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ ซึ่งนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Hemacytometer เพราะเซลล์ใส่ในงานขนาด 24 หลุม (24-well plate) โดยใช้ Media หรือ SDS lysis buffer เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร และทำการเจือจางด้วย SDS lysis buffer ให้มีความหนาแน่นเป็นครึ่งหนึ่งของความหนาแน่นเดิมตามลำดับ คือ  $5 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $1.2 \times 10^5$ ,  $6.2 \times 10^4$ ,  $3.1 \times 10^4$ ,  $1.5 \times 10^4$ ,  $7.8 \times 10^3$ ,  $3.9 \times 10^3$  เซลล์/1 มิลลิลิตร

-นำตัวอย่างกระดูกบดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยคีมตัดกระดูก และเติม SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมา ก่อนนำมาวัด DNA ต้องนำตัวอย่างมาละลายก่อน จากนั้นเปิดตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานขนาด 96 หลุม (96-well plate) เติมสีย้อม Hoechst 100 ไมโครลิตร เพื่อย้อม DNA แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 355 นาโนเมตร(Excitation) และ 460 นาโนเมตร(Emission)

### 3.3.3 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน

#### 3.3.3.1 เตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทย [Kim, U.J. และคณะ 2005]

นำรังใหม่ไทย สายพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 มาต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.02 M (รังใหม่ 40 กรัมต่อสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1000 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 20 นาที จำนวน 2 รอบ เพื่อละลายเซรีซิน หรือกาวยไหมออก แล้วนำเส้นใยไฟโบรอินที่แห้งแล้วไปละลายด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ 9.3 M ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปไดอะไลซ์ (MWCO 12000-16000, Viskase Companies, Inc., Japan) ด้วยน้ำปราศจากประจุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำทุก 15 นาที ในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนน้ำ 3 ครั้งต่อวัน เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ออก จะได้ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินประมาณร้อยละ 6-6.4 โดยน้ำหนัก วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย ทำโดยการอบแห้งสารละลายไฟโบรอินที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วัดน้ำหนักของสารละลายก่อนอบ และน้ำหนักไฟโบรอินแห้งหลังอบ เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอิน ดังสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอิน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักไฟโบรอินแห้ง}}{\text{น้ำหนักของสารละลาย}} \times 100$$

#### 3.3.3.2 เตรียมสารละลายเจลาติน

นำเจลาตินชนิดเอ มาละลายในน้ำปราศจากประจุ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้ได้สารละลายเจลาตินตามอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินและเจลาติน

#### 3.3.3.3 การตัดแปรพื้นผิวของกระดูกมนุษย์ด้วยไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน โดยวิธีการเชื่อมขวาง [Takahashi, Y. และคณะ 2005]

นำสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยมาเติมสารเชื่อมขวาง EDC/NHS (0.5 มก/0.7 มก ในสารละลายไฟโบรอิน 1 มล) แล้วทำการปั่นกวนเป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม  $\beta$ -mercaptoethanol 70 ไมโครลิตร/มล จากนั้นผสมสารละลายเจลาตินลงไป ในสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยและทำการปั่นกวนต่อเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายผสมไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาตินที่ใช้ปั่น 1%, 2% และ 4% โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน เท่ากับ 80/20 และ 50/50



นำกระดุกมนุษย์มาแช่ในสารละลายผสมที่เตรียมไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะสูญญากาศ จากนั้นนำไปทำแห้งแข็งด้วยความเย็น(freeze-drying) โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งแข็ง(Lyophilization) ที่ความดัน 0.1 Torr อุณหภูมิ -55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.3.4 การวิเคราะห์คุณลักษณะ และสมบัติของกระดุกมนุษย์หลังการตัดแปรพื้นผิว

กระดุกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวแล้ว จะถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณลักษณะ ดังข้อ 3.3.2.1-3.3.2.4 และ

#### 3.3.4.1 ปริมาณสารผสมไฟโบรอินและเจลาตินที่อยู่ในกระดุก

หาได้จากการตรวจวัดน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นขึ้นภายหลังการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทย และเจลาติน โดยการเชื่อมขวางที่ความเข้มข้นของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน เท่ากับ 1%, 2% และ 4% โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน เท่ากับ 80/20 และ 50/50 โดยนำกระดุกมนุษย์มาชั่งน้ำหนักก่อน และหลังการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ซึ่งสามารถคำนวณร้อยละน้ำหนักชีววัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่เข้าไปอยู่ในกระดุก ได้จากสูตร

ร้อยละน้ำหนักชีววัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน เทียบกับน้ำหนักกระดุก

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

เมื่อ  $W_1$  = น้ำหนักของกระดุกมนุษย์ก่อนการตัดแปร

$W_2$  = น้ำหนักของกระดุกมนุษย์หลังการตัดแปร

### 3.3.4.2 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ

ทดสอบอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการของชีววัสดุผสมไฟโบรอิน-ไหมไทยและเจลาตินในกระดุกมนุษย์ที่ถูกตัดแปรพื้นผิว ทำการวิเคราะห์โดยการชั่งน้ำหนักกระดุกมนุษย์ที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยชีววัสดุผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่เหลืออยู่ภายหลังจากในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่สภาวะ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เทียบกับน้ำหนักกระดุกมนุษย์เริ่มต้นก่อนนำไปแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส [Choi, Y. S. และคณะ 1999] โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ (\%)} = \left[1 - \frac{W_3 - W_4}{W_3}\right] \times 100$$

เมื่อ  $W_3$  = น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของกระดุกที่ถูกตัดแปร

$W_4$  = น้ำหนักแห้งของกระดุกที่ถูกตัดแปรหลังจากแช่เอนไซม์คอลลาจีเนสที่ระยะเวลาต่างๆ

### 3.3.5 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSC)

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ใช้ทดสอบถูกสกัดจากส่วนขาหลังจากหนูวิสตา เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์ (จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ตามวิธีของ Hosseinkhani, H. [Hosseinkhani, H. และคณะ 2006] โดยผ่าเอากระดูกต้นขาหลังของหนูตั้งแต่บริเวณสะโพก กำจัดเศษชิ้นเนื้อออกให้สะอาดให้เหลือแต่กระดูก และตัดที่ปลายทั้งสองข้างของกระดูกจะพบช่องไขกระดูก ใช้เข็มฉีดยา (26 gauge needle) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (Alpha-modified eagle medium:  $\alpha$ -MEM ที่มี 15% FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) ชะล้างผ่านช่องไขกระดูกลงหลอดขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งก้อนไขกระดูกหลุดออกหมด ทำสารแขวนลอยเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เข็มฉีดยาหลายๆครั้ง จากนั้นดูดเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ได้ 1 มิลลิลิตรใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงไว้ในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เพื่อกำจัดเซลล์เม็ตเลือดที่ไม่เกาะจานเลี้ยงเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ เพื่อให้ได้เซลล์ passage ที่ 2 สำหรับการนำไปใช้ทดสอบ

### 3.3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนกระดูกทดสอบ

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงบนกระดูกทดสอบซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม การทดลอง ได้แก่ 1.กระดูกที่ถูกดัดแปรด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน 2. กระดูกที่ไม่ได้ถูกดัดแปร โดยเตรียมสารละลายเซลล์  $5 \times 10^5$  เซลล์/100 ไมโครลิตร (สำหรับทดสอบการยึดเกาะและเจริญเติบโต) และ  $1 \times 10^6$  เซลล์/100 ไมโครลิตร (สำหรับทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก) เพาะเลี้ยงลงบนกระดูกตัวอย่าง ที่ฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ ด้วยวิธีการ agitation seeding ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่ม 5 %คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 ชั้น ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

### 3.3.7 ทดสอบสมบัติการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนุบนกระดูกทดสอบ

นำกระดูกตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเซลล์แล้วไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\alpha$ -MEM ที่มี 15% FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well plate) ในตู้บ่ม 5%คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน ตรวจสอบจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เกาะติด (attachment) ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเซลล์ที่เจริญเติบโต (proliferation) ที่เวลา 1, 4, 7 และ 14 วัน ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ DNA (DNA Assay) ที่กล่าวข้างต้นในหัวข้อ 3.3.2.5 และคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate,  $\mu$ ) แสดงดังภาคผนวก ฉ รวมถึงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population doubling time, PDT) แสดงดังภาคผนวก ช

### 3.3.8 ทดสอบสมบัติการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนุบนกระดูกทดสอบ

นำกระดูกตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเซลล์แล้วไปเลี้ยงในอาหาร Osteogenic Media, OM ประกอบด้วย  $\alpha$ -MEM ที่มี 10% FBS, 50 U/ml penicillin streptomycin, 50  $\mu$ g/ml L-ascorbic,  $10^{-6}$  M dexamethasone และ 1 M  $\beta$ -glycerophosphate ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well plate) ในตู้บ่ม 5%คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน ตรวจสอบจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ DNA (DNA Assay) ที่กล่าวข้างต้นในหัวข้อ 3.3.2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) และปริมาณแคลเซียม ช่วงเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน ลักษณะของ

เซลล์และธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัสที่เซลล์ผลิตขึ้นบนกระดูกทดสอบ ด้วยเทคนิค SEM และ EDX ที่เวลา 28 วัน

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) ตามวิธีของ Hofmann, S. [Hofmann, S. และคณะ 2007]

-เตรียมกราฟมาตรฐานจาก p-nitrophenol ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากประจุเป็น 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 มิลลิโมล

-นำตัวอย่างกระดูกบดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยคีมตัดกระดูก และเติม SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตร ลงไป เพื่อให้เซลล์แตก นำไปไว้ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปิดตัวอย่างมา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานขนาด 96 หลุม (96-well plate) แล้วเติมสาร p-Nitrophenyl phosphate 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม นำไปไว้ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80 ไมโครลิตร โดยเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะเปลี่ยน p-Nitrophenyl phosphate ให้เป็น p-nitrophenol และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม ตามวิธีของ Takahashi, Y. [Takahashi, Y. และคณะ 2005]

-เตรียมกราฟมาตรฐานจากแคลเซียมคาร์บอเนต 20 มิลลิกรัมในกรดไฮโดรคลอริก 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางเป็น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 มิลลิกรัมในกรดไฮโดรคลอริก 1 มิลลิลิตร

-นำตัวอย่างกระดูกบดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยคีมตัดกระดูก และเติม SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อให้เซลล์แตก นำไปไว้ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปิดตัวอย่างมา 100 มิลลิตรและเติมกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร นำไปไว้ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทำการเปิดตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตรใส่ลงในจานขนาด 96 หลุม (96-well plate) เติมสารละลาย ethanolamine buffer 1 มิลลิลิตร และสาร O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ซึ่งถ้าตัวอย่างมีแคลเซียมอยู่ สาร O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) จะไปจับกับแคลเซียมของตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

### 3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P\text{-value} < 0.05$ )

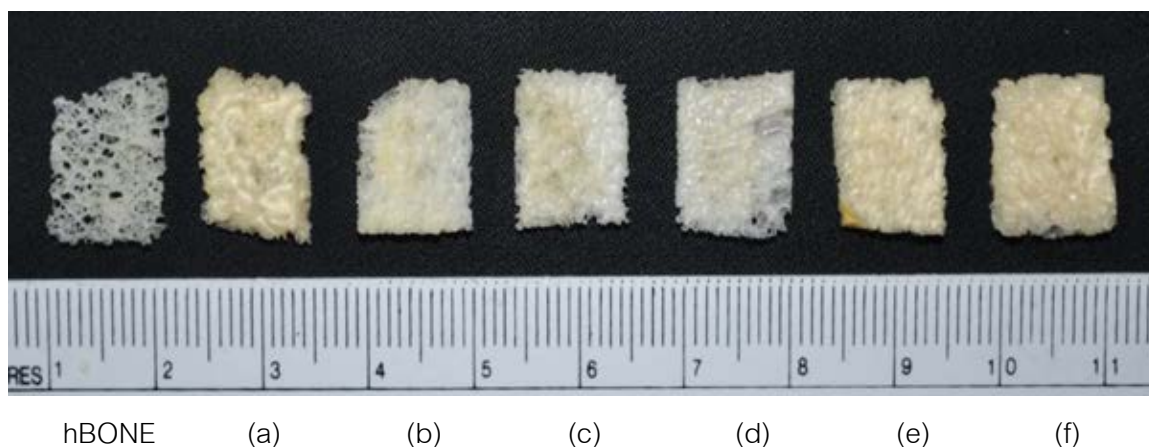
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในการศึกษาผลของชีวิสต์ผสมของไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่นำมาใช้ตัดแปรพื้นผิวของกระดูกมนุษย์โดยการเชื่อมขวาง (Crosslinking) ด้วยการเติม EDC/NHS ร่วมกับกระบวนการทำแห้งแข็งด้วยความเย็น โดยทดสอบสมบัติทางกายภาพและสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการของกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยชีวิสต์ เปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกตัดแปรพื้นผิวโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ตัวอย่างกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกตัดแปรพื้นผิวและกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยชีวิสต์ตามอัตราส่วนที่กำหนดในการศึกษานี้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 และลักษณะภายนอกของตัวอย่างกระดูกทั้งหมดแสดงไว้ในรูปที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** ประเภทของกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกตัดแปรพื้นผิว และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินและความเข้มข้นของสารละลายผสมต่างๆ

ประเภทของตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายผสม	สัญลักษณ์
กระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกตัดแปรพื้นผิว	0%โดยน้ำหนัก	hBONE
กระดูกมนุษย์ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 80/20	1%โดยน้ำหนัก	1%SF80G20
	2%โดยน้ำหนัก	2%SF80G20
	4%โดยน้ำหนัก	4%SF80G20
กระดูกมนุษย์ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 50/50	1%โดยน้ำหนัก	1%SF50G50
	2%โดยน้ำหนัก	2%SF50G50
	4%โดยน้ำหนัก	4%SF50G50



**รูปที่ 4.1** ลักษณะภายนอกของกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกตัดแปรพื้นผิว (hBONE) และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรพื้นผิวด้วยชีววัสดุผสมที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 80/20, 50/50 และความเข้มข้นของสารละลายผสม 1%-4% (a) 1%SF80G20, (b) 2%SF80G20, (c) 4%SF80G20, (d) 1%SF50G50, (e) 2%SF50G50, (f) 4%SF50G50

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.2 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกระดูกมนุษย์ภายหลังการตัดแปรด้วยชีววัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนผสม และความเข้มข้นของสารละลายผสม ซึ่งเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นนี้ คือเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชีววัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางเข้าไปอยู่ภายในรูพรุนของกระดูกมนุษย์ โดยพบว่าที่สัดส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินแต่ละค่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้นจาก 1% เป็น 4% ส่งผลทำให้มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชีววัสดุผสมที่ถูกเชื่อมขวางเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เนื่องจากมีปริมาณของชีววัสดุผสมที่เข้าไปเชื่อมขวางอยู่ในรูพรุนของกระดูกมนุษย์มากขึ้น

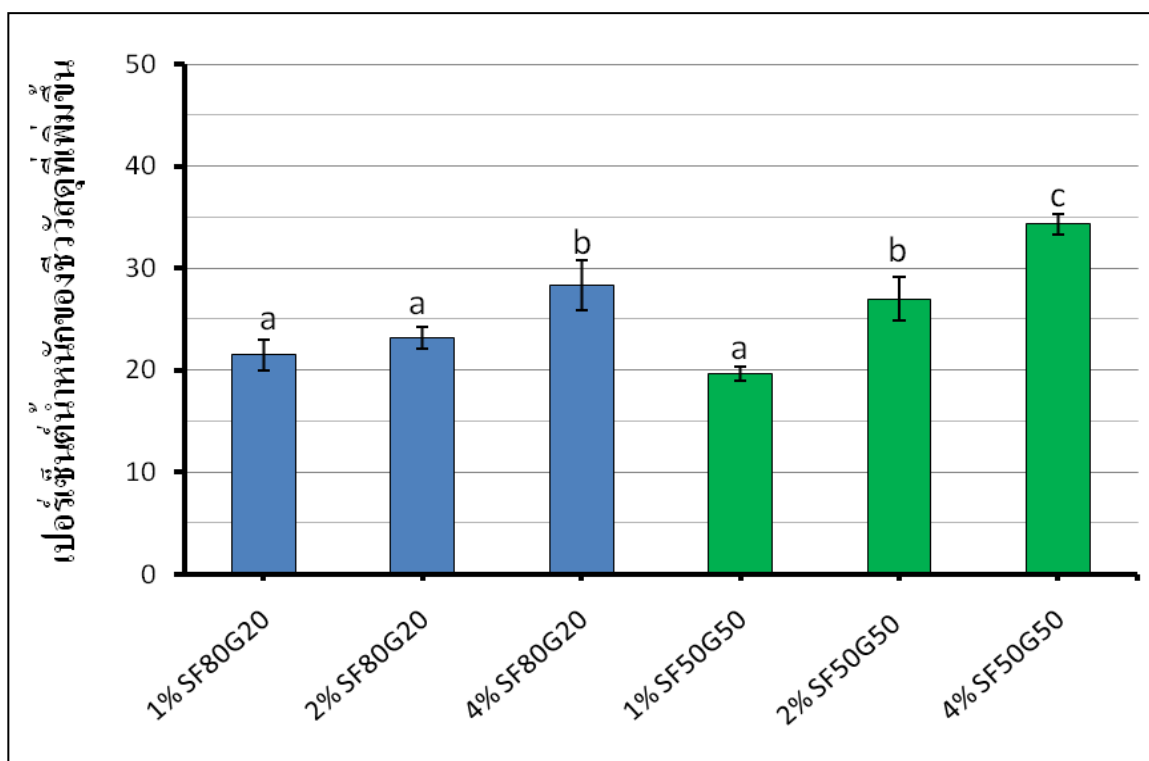
เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินและเจลาตินผสมเดียวกัน อัตราส่วนผสมต่างกัน พบว่า สารละลายที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ 50/50 สามารถถูกเชื่อมขวางได้มากกว่าสารละลายที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ 80/20 โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของสารละลายผสม 2% และ 4% โดยน้ำหนัก ทำให้มีปริมาณชีววัสดุที่เชื่อมขวางอยู่ใน

กระดูกมนุษย์มากกว่าสารละลายที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ 80/20 เนื่องจากมีหมู่ที่สามารถเกิดการเชื่อมขวางระหว่างเจลาติน และสาร EDC/NHS ได้ 2 หมู่ คือ หมู่คาร์บอกซิล และหมู่เอมีน ซึ่งเจลาตินยังมีหมู่อะมิโนอิสระที่สามารถเกิดการเชื่อมขวางกันของเจลาตินเองอีกด้วย [Zhang, Y. และคณะ 2006] ทั้งนี้จากรายงานของ Barnes, C.P. พบว่าการเชื่อมขวางของ EDC/NHS จะเกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน aspartic หรือ glutamic และหมู่เอมีน เมื่ออัตราส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้นทำให้มีการเชื่อมขวางได้มากขึ้น [Barnes, C.P. และคณะ 2007]

เมื่อเปรียบเทียบที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินเดียวกัน ความเข้มข้นของสารละลายผสมต่างกัน พบว่า เมื่อใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมที่ 4% จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชีววัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่เข้าไปอยู่ในรูพรุนกระดูกมนุษย์มากกว่ากรณีใช้ความเข้มข้นสารละลายผสมที่ 2% และ 1% ตามลำดับ

จากผลการทดลองสามารถเห็นได้ว่า การใช้อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสมที่ 4% จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชีววัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่เข้าไปอยู่ในรูพรุนกระดูกมนุษย์สูงสุด คือ ร้อยละ 34





รูปที่ 4.2 เปอร์เซนต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกระดูกมนุษย์ภายหลังการตัดแปรด้วยชีวะวัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนผสมและความเข้มข้นของสารละลายผสม

[a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]

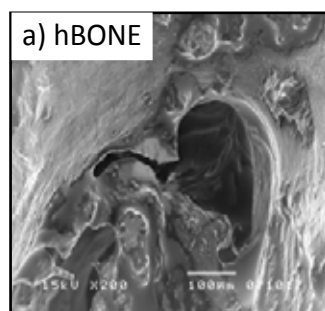
## 4.1 สมบัติของกระดูกมนุษย์

### 4.1.1 โครงสร้างพื้นฐานของกระดูก

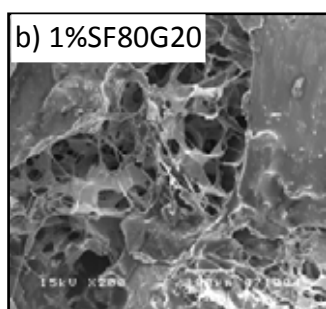
จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 แสดงลักษณะโครงสร้างรูพรุนของกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับดัดแปรพื้นผิวที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ที่ความเข้มข้นของสารละลายผสมต่างๆ จากโครงสร้างรูพรุนของกระดูกมนุษย์จากส่วนหัวข้อสะโพกบริเวณส่วนบนของกระดูกต้นขามนุษย์ (Femoral head) ที่ถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4.2(a)) พบว่า โครงสร้างภายในของกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกดัดแปรพื้นผิวมีความขรุขระ โดยมีรูพรุนขนาดเฉลี่ย  $255 \pm 45$  ไมโครเมตร ส่วนโครงสร้างภายในของกระดูกมนุษย์ที่ได้รับดัดแปรพื้นผิวที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ที่ความเข้มข้นของสารละลายผสมต่างๆ พบว่า ภายหลังจากการดัดแปรกระดูกมนุษย์ด้วยชีววัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินมีชีววัสดุผสมเข้าไปเชื่อมขวางอยู่ภายในรูพรุนของกระดูกมนุษย์ในลักษณะคล้ายกับมีโครงเลี้ยงเซลล์จากชีววัสดุผสมแทรกอยู่ระหว่างรูพรุนของกระดูกมนุษย์ ทำให้สังเกตเห็นรูพรุนมีขนาดเล็กลงเชื่อมโยงต่อกันเป็นเครือข่าย

เมื่อความเข้มข้นของสารละลายผสมไฟโบรอินและเจลาตินเพิ่มขึ้นจาก 1% เป็น 4% โดยน้ำหนัก ส่งผลทำให้กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวมีขนาดรูพรุนลดลง ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 80/20 (รูปที่ 4.2(b-d)) พบว่า กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวที่ความเข้มข้นของสารละลายผสมต่างๆ ได้แก่ 1%SF80G20, 2%SF80G20 และ 4%SF80G20 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย  $157 \pm 19$ ,  $92 \pm 21$  และ  $85 \pm 11$  ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 50/50 (รูปที่ 4.2(e-g)) พบว่า กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวที่ความเข้มข้นของสารละลายผสมของชีววัสดุ 1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย  $152 \pm 20$ ,  $98 \pm 13$  และ  $91 \pm 15$  ไมโครเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้จากรายงาน O'Brien พบว่า ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ควรอยู่ในช่วง 95.9 – 150.5 ไมโครเมตร [O'Brien, F.J. และคณะ 2005]

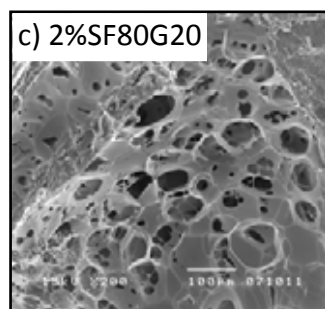
เมื่อเปรียบเทียบที่อัตราส่วนผสมของไฟเบอร์อินและเจลาตินต่างกัน ความเข้มข้นของสารละลายผสมเดียวกัน พบว่า ขนาดของรูพรุนที่เกิดขึ้นภายในกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรไม่มีความแตกต่างกัน



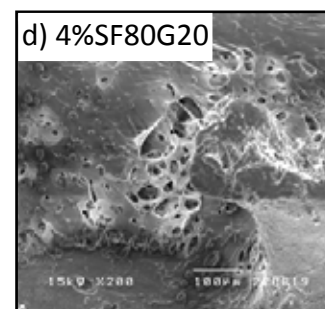
รูป รุน 255 ± 45 ไมโครเมตร



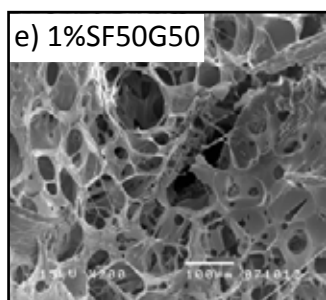
รูป รุน 157 ± 19 ไมโครเมตร



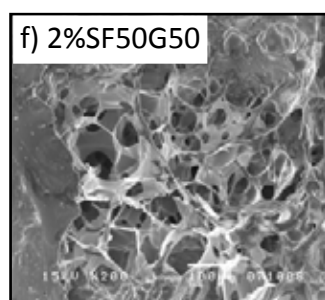
รูป รุน 92 ± 21 ไมโครเมตร



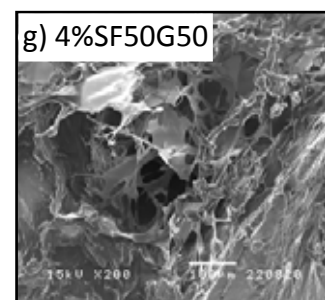
รูป รุน 85 ± 11 ไมโครเมตร



รูป รุน 152 ± 20 ไมโครเมตร



รูป รุน 98 ± 13 ไมโครเมตร



รูป รุน 91 ± 15 ไมโครเมตร

**รูปที่ 4.3** ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยชีววัสดุผสมที่อัตราส่วนผสมของไฟเบอร์อินและเจลาติน 80/20, 50/50 และความเข้มข้นของสารละลายผสม 1%-4% (a) hBONE, (b) 1%SF80G20, (c) 2%SF80G20, (d) 4%SF80G20, (e) 1%SF50G50, (f) 2%SF50G50 (g) 4%SF50G50 (แถบสเกล = 100 ไมโครเมตร)

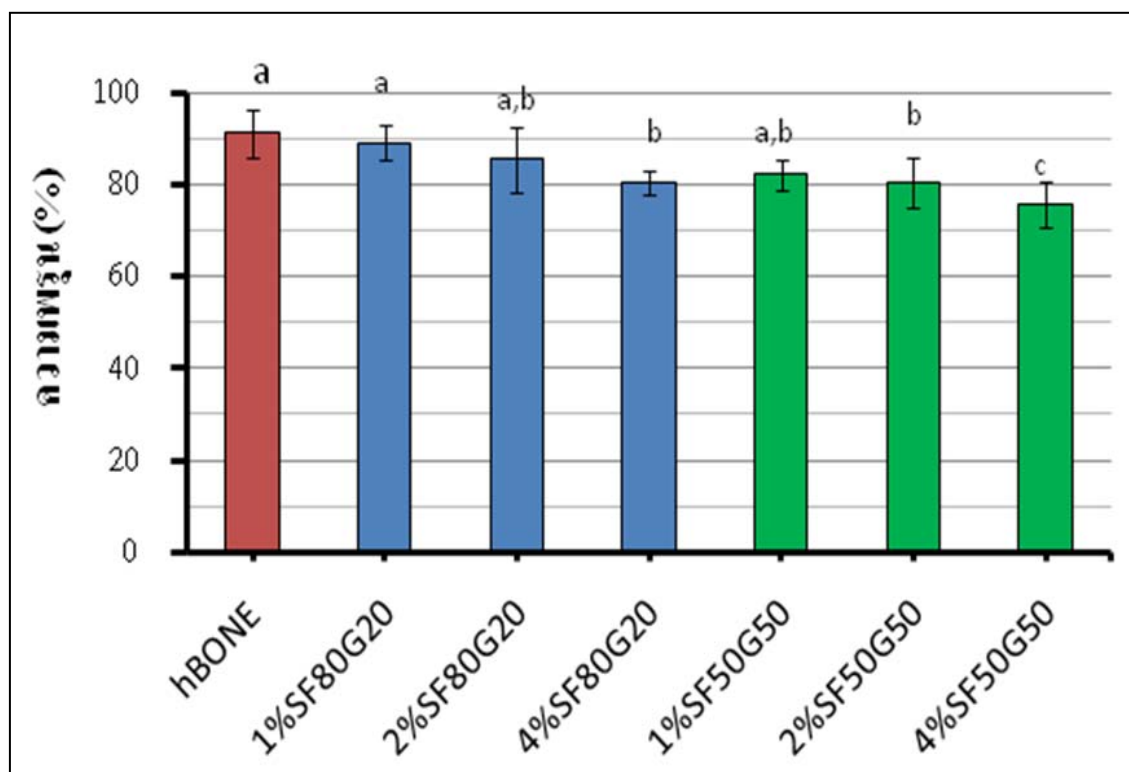
#### 4.1.2 ความพรุน

จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 ความพรุนของกระดูกมนุษย์ (hBONE) มีค่าเท่ากับร้อยละ 91 เมื่อพิจารณากระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินทั้ง 6 สูตร 1%SF80G20, 2%SF80G20, 4%SF80G20, 1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50 พบว่ามีความพรุนลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อความเข้มข้นของสารละลายผสมของซีวัสต์เพิ่มขึ้นจาก 1% เป็น 4% โดยน้ำหนัก พบว่ากระดูกที่ถูกตัดแปรจะมีความพรุนลดลง เนื่องจากมีปริมาณของซีวัสต์ผสมของไฟโบรอินและเจลาตินเข้าไปอยู่ภายในรูพรุนของกระดูกมนุษย์มากขึ้น รูพรุนมีขนาดเล็กลง (ดังที่สังเกตจากผลของโครงสร้างพื้นฐานในหัวข้อ 4.1.1) ทำให้มีความพรุนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกระดูกมนุษย์ภายหลังการตัดแปร

เมื่อเปรียบเทียบที่อัตราส่วนผสมต่างกัน ความเข้มข้นของสารละลายเดียวกัน พบว่ากระดูกที่ถูกตัดแปรเมื่อใช้สารละลายที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 50/50 จะมีความพรุนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกที่ถูกตัดแปรเมื่อใช้สารละลายที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 80/20 เนื่องจากมีหมู่ที่สามารถเกิดการเชื่อมขวางระหว่างเจลาติน และสาร EDC/NHS ได้ 2 หมู่ คือ หมู่เอมีน และ หมู่ของคาร์บอกซิล ส่งผลให้เมื่อมีปริมาณของเจลาตินมากขึ้นก็จะเกิดการเชื่อมขวางได้มากขึ้น

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่ากระดูกมนุษย์จะมีความพรุนมากที่สุด และความเข้มข้นของสารละลายผสมของซีวัสต์ อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ใช้ในการตัดแปรส่งผลต่อความพรุน เนื่องจากหลังการตัดแปรกระดูกมนุษย์แล้วรูพรุนมีขนาดเล็กลง ทำให้มีความพรุนลดลง



รูปที่ 4.4 ความพรุนของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับดัดแปรพื้นผิวด้วยซีวีสอดผสมที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน 80/20, 50/50 และความเข้มข้นของสารละลายผสม 1%-4%

[a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]

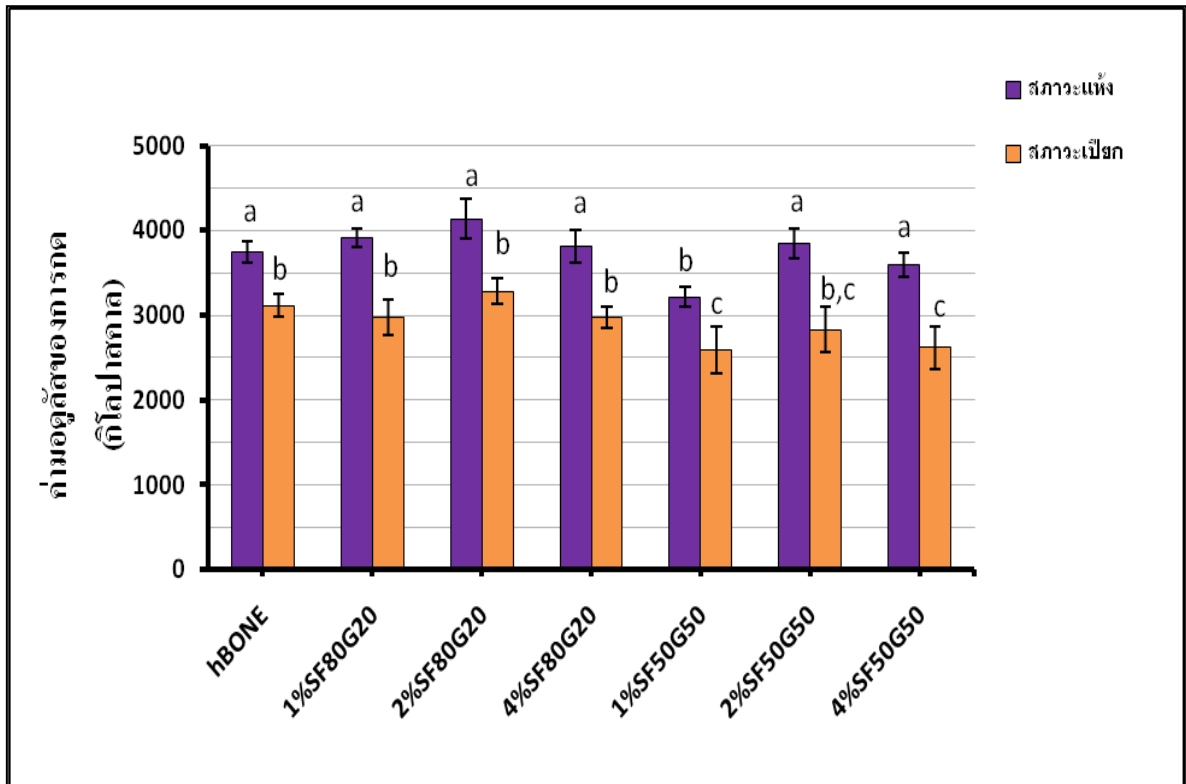
#### 4.1.3 สมบัติทางกลของกระดูก

การวิเคราะห์ความสามารถในการทนแรงกด (Compressive modulus) ของกระดูกมนุษย์ (hBONE) และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ในสภาวะแห้งและสภาวะเปียก จะได้ค่ามอดุลัสของการกด ดังแสดงในรูปที่ 4.5

สำหรับในสภาวะแห้ง ค่ามอดุลัสของการกดของกระดูกมนุษย์ (hBONE) มีค่าเท่ากับ  $3,746 \pm 127$  กิโลปาสคาล และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน 1%SF80G20, 2%SF80G20, 4%SF80G20, 1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50 มีค่ามอดุลัสของการกด เท่ากับ  $3,917 \pm 109$ ,  $4,139 \pm 227$ ,  $3,810 \pm 198$ ,  $3,218 \pm 121$ ,  $3,846 \pm 183$  และ  $3,596 \pm 141$  กิโลปาสคาล ตามลำดับ ทั้งนี้สังเกตได้ว่าค่ามอดุลัสของการกดของกระดูกมนุษย์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสูตร 1%SF50G50

เมื่อเปรียบเทียบค่ามอดุลัสของการกดในสภาวะแห้ง และในสภาวะเปียกของตัวอย่างกระดูกแต่ละประเภท พบว่า ค่ามอดุลัสของการกดของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวในสภาวะแห้งมีค่ามอดุลัสของการกดมากกว่าเมื่อเทียบกับในสภาวะเปียก

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ชีววัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่เข้าไปเชื่อมขวางในรูพรุนของกระดูกมนุษย์ไม่มีผลต่อค่ามอดุลัสของการกด ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างหลักซึ่งเป็นกระดูกมนุษย์เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความแข็งแรงเมื่อเปรียบเทียบกับสารอินทรีย์ของชีววัสดุผสมไฟโบรอินและเจลาตินปริมาณเพียงเล็กน้อยที่เข้าไปตัดแปรอยู่ภายในกระดูก ร้อยละ 19-34 ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.5 ค่ามอดูลัสของการกดในสภาวะแห้งและสภาวะเปียกของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน

[a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]

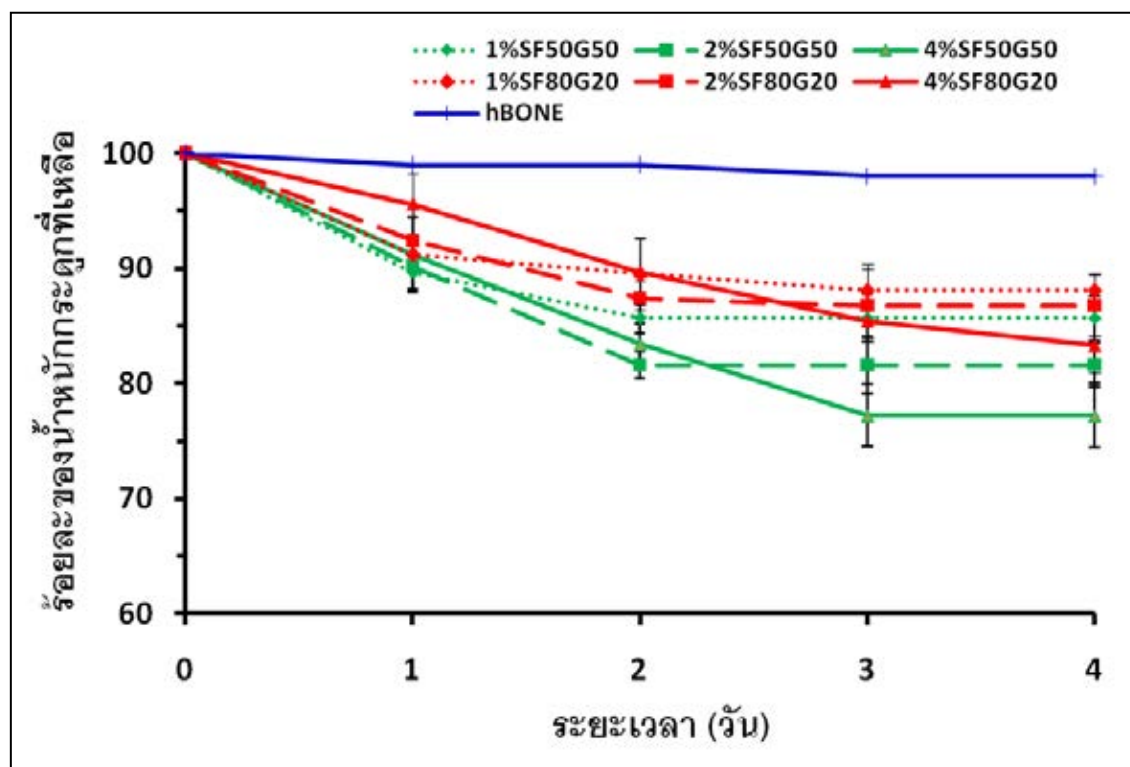
#### 4.1.3 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ

จากผลการศึกษาดังรูปที่ 4.6 ซึ่งแสดงร้อยละของน้ำหนักกระดูกที่เหลือภายหลังจากการย่อยสลายของชีวะวัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาติน เมื่อแช่ในสารละลายคอลลาจีเนส พบว่ากระดูกมนุษย์ (hBONE) น้ำหนักลดลง 1-3% เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 3 วัน ทั้งนี้อาจจะเป็นน้ำหนักของเศษกระดูกที่เกิดจากการตัด และติดอยู่ในชิ้นกระดูก เมื่อแช่ในสารละลายคอลลาจีเนส อาจเกิดการชะล้างเศษกระดูกออกมาดังที่สังเกตพบในสารละลาย

เมื่อเปรียบเทียบชีวะวัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่อัตราส่วน 50/50 พบว่า มีแนวโน้มของการย่อยสลายเร็วกว่าชีวะวัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินอัตราส่วน 80/20 เนื่องจากที่อัตราส่วน 50/50 มีปริมาณเนื้อสารของเจลาตินมากกว่า และเอนไซม์คอลลาจีเนสมีหน้าที่เฉพาะเจาะจงในการย่อยโปรตีนคอลลาเจน และเจลาติน จึงทำให้เมื่อมีปริมาณของเจลาตินเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการย่อยสลายได้เร็วขึ้น [Yasuhiko, T. และ Ikada, Y. 1998 ]

เมื่อเปรียบเทียบชีวะวัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆ พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้น 1% และ 2% โดยน้ำหนัก น้ำหนักที่เหลือจะเริ่มคงที่ เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 2-3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก จะเห็นได้ว่าน้ำหนักที่เหลือจะเริ่มคงที่ เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 4 วัน ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนที่เข้าไปเชื่อมขวางในกระดูกมนุษย์ถูกย่อยสลายจนหมด





รูปที่ 4.6 ร้อยละของน้ำหนักระดูกละที่เหลือน้ำอยู่ภายหลังจากแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร ในสภาวะ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

## 4.2 สมบัติทางชีวภาพ

### 4.2.1 การยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู

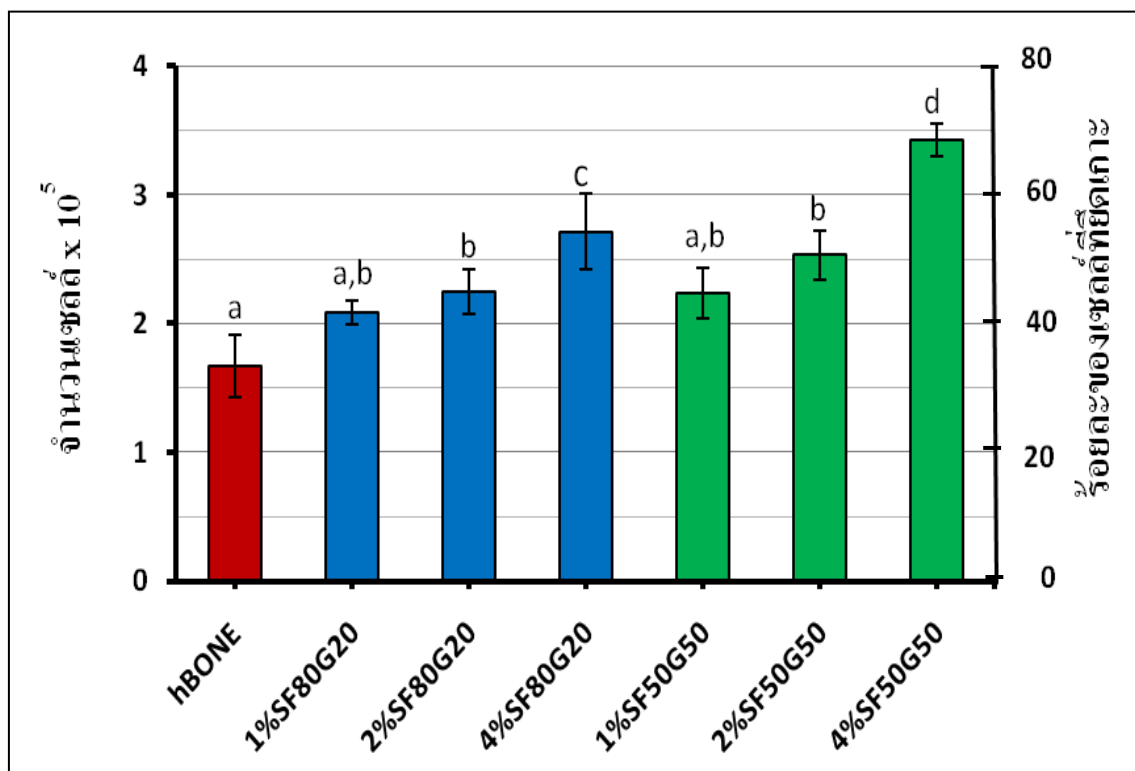
การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของกระดูกมนุษย์ โดยพิจารณาจากการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูที่เพาะเลี้ยงในกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าร้อยละของเซลล์ที่ยึดเกาะในกระดูกมนุษย์มีค่าประมาณร้อยละ 32 ทั้งนี้กระดูกมนุษย์ดังกล่าวได้ผ่านการทำความสะอาด และกำจัดเซลล์ออกด้วยสารเคมี ซึ่งอาจจะมีผลทำให้สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของกระดูกมนุษย์ด้อยลงได้ นอกจากนี้ยังพบว่ากระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวมีการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ โดยมีร้อยละของเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่ในช่วง 32-68

เมื่อเปรียบเทียบที่อัตราส่วนผสมเดียวกัน ความเข้มข้นของสารละลายผสมต่างกัน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายผสมของซีวีสดูเพิ่มขึ้นจาก 1%-4% โดยน้ำหนัก ในการเชื่อมขวางกระดูกมนุษย์ที่ถูกดัดแปรจะมีเซลล์ต้นกำเนิดมายึดเกาะในปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารละลายผสมของซีวีสดูผสมไฟโบรอินและเจลาตินที่เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณเนื้อสารผสมที่ถูกเชื่อมขวางไว้ในกระดูกมนุษย์มากขึ้น สามารถช่วยส่งเสริมให้เซลล์มาเกาะได้ดีขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายผสมเดียวกัน อัตราส่วนผสมต่างกัน พบว่าเมื่อใช้สารละลายที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 80/20 และ 50/50 จะทำให้มีแนวโน้มของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะในกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรด้วยสารละลายไฟโบรอินและเจลาติน คล้ายคลึงกัน แต่ที่เห็นได้ชัดเจน คือ เมื่อใช้สารละลายที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก จะทำให้ได้กระดูกมนุษย์ที่ถูกดัดแปรแล้วมีจำนวนเซลล์มายึดเกาะมากที่สุด และมีร้อยละของเซลล์ที่ยึดเกาะสูงที่สุด คือ ร้อยละ 68 ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าของกระดูกมนุษย์ก่อนการดัดแปร ทั้งนี้เนื่องจากเจลาตินมีผลช่วยให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี เพราะมีลำดับของกรดอะมิโน arginine-glycine-aspartic (RGD) [Lee, J.M. และคณะ

1996] จากรายงานของ Yoshitake T. และ Yasuhiko T. พบว่า ร้อยละของเซลล์ที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตาไทรแคลเซียมฟอสเฟตอยู่ในช่วง 60-70% ในการเพาะเซลล์โดยวิธี Agitation seeding ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที [Yoshitake, T. และ Yasuhiko, T. 2003] และจากรายงานของ Chamchongkaset J. พบว่า พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไทยที่ค้อนจุกเกิดด้วยเจลาตินสามารถช่วยในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะ และเจริญเติบโตได้ดี [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008]

จากผลการทดลองนี้ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายผสมของซีวัสดูที่ใช้ในการเชื่อมขวาง และอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินมีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ โดยมีแนวโน้มของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะในกรณีของกระดูกที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 50/50 และความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก ซึ่งมีจำนวนเซลล์มายึดเกาะมากที่สุดภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จึงได้ทำการเลือกเฉพาะกระดูกที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยซีวัสดูผสมที่อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาติน 50/50 มาศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกต่อไป



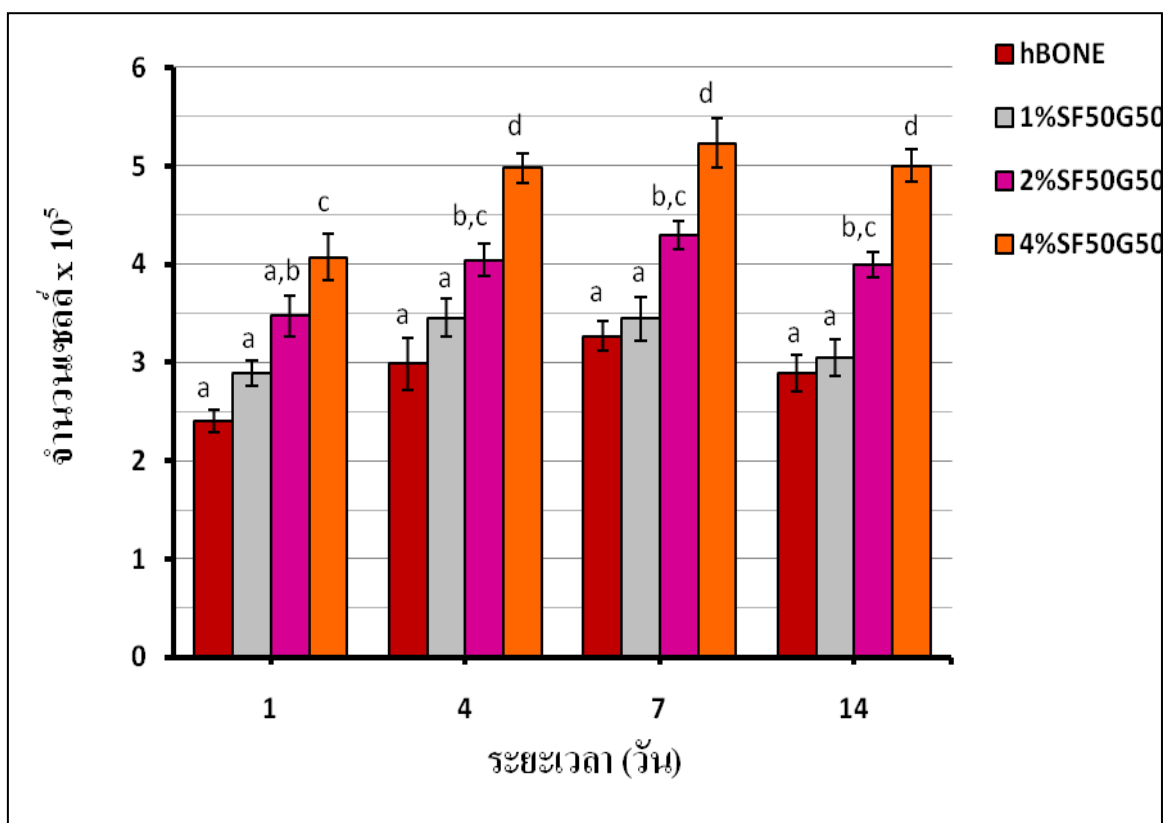
รูปที่ 4.7 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูที่ยึดเกาะและร้อยละของเซลล์ที่ยึดเกาะบนกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ปริมาณเซลล์ในการเพาะเลี้ยง  $5 \times 10^5$  เซลล์/ตัวอย่าง [a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]

จากการศึกษาผลของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูบนกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เป็นเวลา 14 วัน แสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายผสมชีววัสดุ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายผสมมากขึ้น ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์บนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรเพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน พบว่า เซลล์สามารถยึดเกาะบนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวได้ดีกว่ากระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการตัดแปรพื้นผิว

จากนั้นพิจารณาที่เวลา 1, 4 และ 7 วัน เพื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์บนกระดูกมนุษย์ พบว่า เซลล์เจริญเติบโตบนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวสูตร 4%SF50G50 ได้มากที่สุด รองลงมา คือ สูตร 2%SF50G50 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT) ของเซลล์ ซึ่งคำนวณจากช่วงการเพาะเลี้ยง 1 – 7 วัน พบว่า จำนวนเซลล์บนกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการตัดแปรพื้นผิว มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 156 ชั่วโมง และเซลล์บนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน สูตร 1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50 มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ เท่ากับ 123, 112 และ 91 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการตัดแปรพื้นผิว พบว่า กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินมีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณลดลงในทุกสูตร ซึ่งกระดูกมนุษย์สูตร 4% SF50G50 มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณน้อยที่สุด ประมาณ 0.6 เท่า สอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) ในกระดูกที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (4% SF50G50) ซึ่งมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ  $4.12 \times 10^{-3}$  เซลล์ต่อชั่วโมง มากกว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ในกระดูกที่ไม่ได้รับการตัดแปร ( $2.58 \times 10^{-3}$ ) ประมาณ 1.6 เท่า (แสดงในตารางที่ 4.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการตัดแปร ทั้งนี้ น่าจะเป็นผลมาจากลำดับของกรดอะมิโน arginine-glycine-aspartic (RGD) ดังที่กล่าวไว้แล้วในผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู

จากผลการทดลองการยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูในกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ซึ่งพบว่ากระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินสามารถทำให้เซลล์มายึดเกาะ และเจริญเติบโตได้ดีกว่ากระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการดัดแปรพื้นผิว แสดงให้เห็นว่ากระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินมีสมบัติ Osteoconduction ที่ดีกว่ากระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการดัดแปร (สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้ามายึดเกาะได้ดีขึ้น) โดยเฉพาะกระดูกมนุษย์สูตร 4%SF50G50 ซึ่งมีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณสั้นที่สุด และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สูงที่สุด



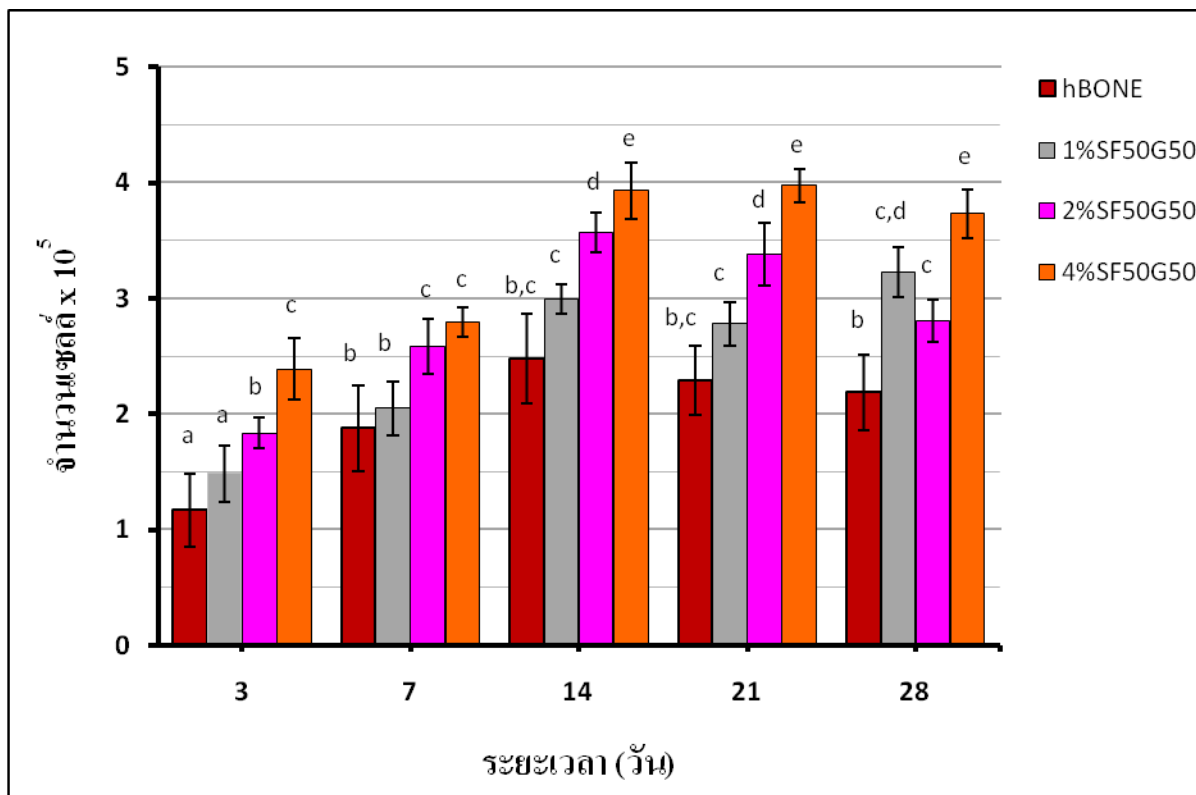
รูปที่ 4.8 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูที่เจริญเติบโตบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ภายหลังการเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เป็นเวลา 1, 4, 7 และ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์

[a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]

**ตารางที่ 4.2** อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) และค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูที่เพาะเลี้ยงบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ

ประเภทของตัวอย่าง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของเซลล์ ( $\mu$ ) (เซลล์ต่อชั่วโมง)	ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) (ชั่วโมง)
hBONE	$2.58 \times 10^{-3}$	156
1%SF50G50	$2.97 \times 10^{-3}$	123
2%SF50G50	$3.40 \times 10^{-3}$	112
4%SF50G50	$4.12 \times 10^{-3}$	91

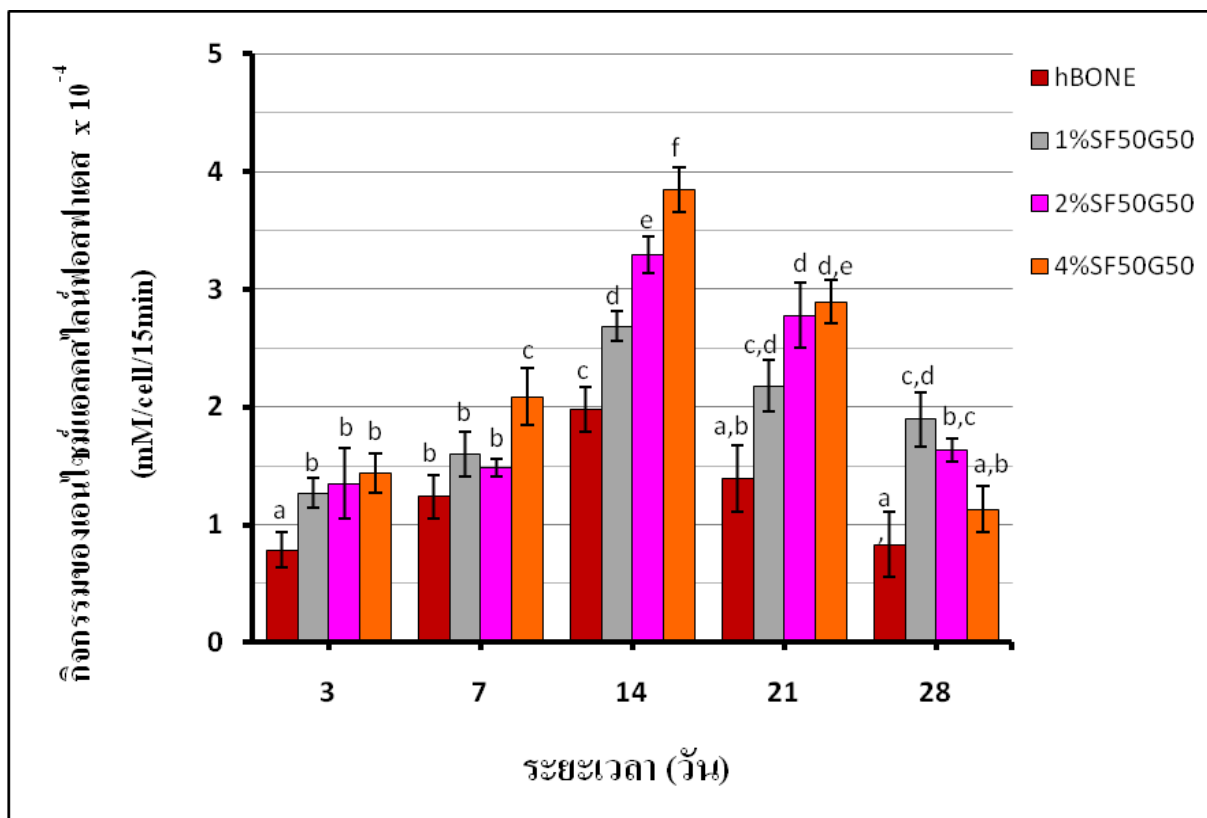
#### 4.2.2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (differentiation)



รูปที่ 4.9 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนุบนกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์

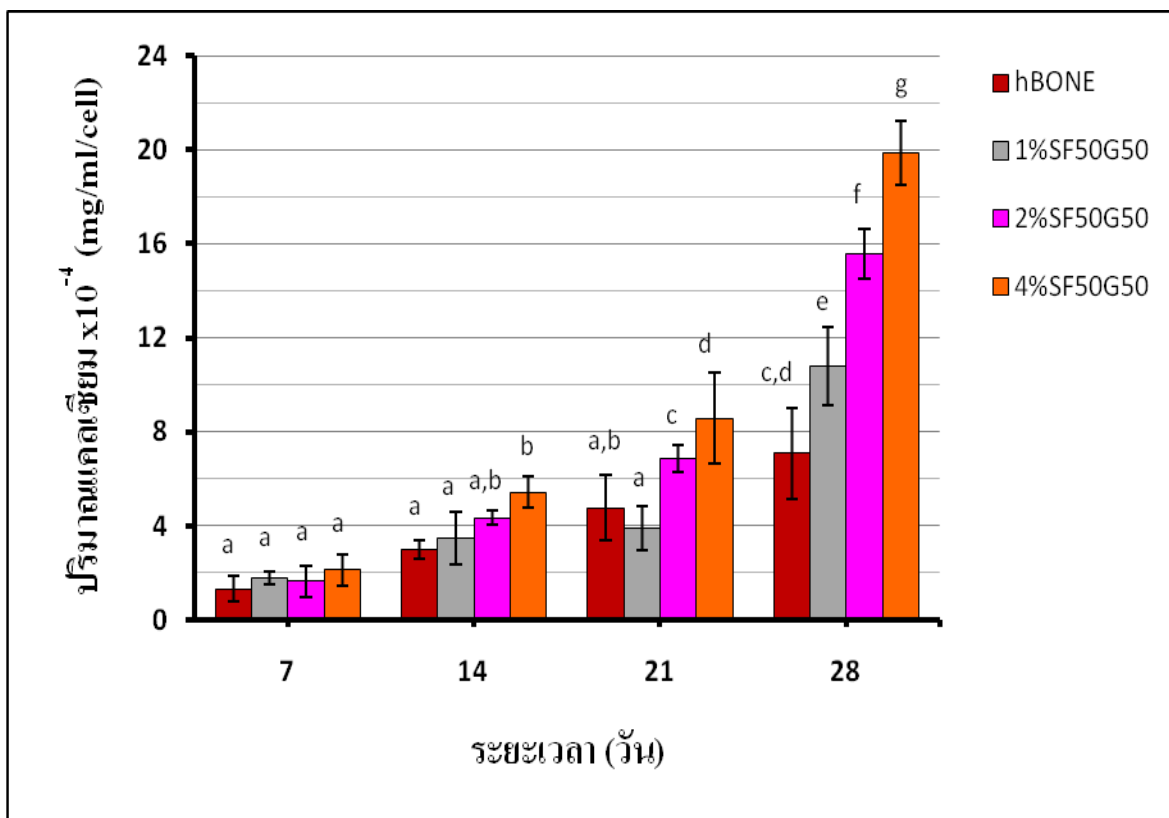
[a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]





รูปที่ 4.10 กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เกิดขึ้นบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิว ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู เป็นระยะเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์

[a, b, c, d, e และ f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]



รูปที่ 4.11 ปริมาณแคลเซียมที่เกิดขึ้นบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ของการเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์ [a, b, c, d, e, f และ g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )]

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูนบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน แสดงดังรูปที่ 4.9 พบว่า จำนวนเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง 3 – 14 วัน โดยเซลล์บนกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการตัดแปรพื้นผิว มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT) เท่ากับ 132 ชั่วโมง และเซลล์บนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน 1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50 มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ เท่ากับ 108, 99 และ 86 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) ในกระดูกที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (4%SF50G50) มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ  $4.53 \times 10^{-3}$  เซลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ในกระดูกที่ไม่ได้รับการตัดแปร ( $2.76 \times 10^{-3}$ ) ประมาณ 1.6 เท่า (ตารางที่ 4.3) และเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกนานขึ้น จำนวนเซลล์ที่พบในกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรจะเริ่มไม่มีการเปลี่ยนแปลง

**ตารางที่ 4.3** อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) และค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ที่เพาะเลี้ยงบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

ประเภทของตัวอย่าง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) (เซลล์ต่อชั่วโมง)	ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) (ชั่วโมง)
hBONE	$2.76 \times 10^{-3}$	132
1%SF50G50	$3.81 \times 10^{-3}$	108
2%SF50G50	$4.32 \times 10^{-3}$	99
4%SF50G50	$4.53 \times 10^{-3}$	86

รูปที่ 4.10 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) บนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน พบว่า ในช่วงวันที่ 3-14 ปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในแต่ละสูตรตัวอย่าง และปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าสูงสุดในวันที่ 14 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้นในช่วงวันที่ 14-28 พบว่า ปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เกิดขึ้นมีค่าลดลงในแต่ละสูตรตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Zhang D.Y. ที่ว่า กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะสูงสุดในช่วงสองสัปดาห์แรกของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก และถือเป็นสัญญาณการเปลี่ยนเป็นกระดูกช่วงแรก [Zhang, D.Y. และคณะ 2009]

เมื่อพิจารณาปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50) พบว่า ปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินมีค่าสูงกว่าปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกตัดแปรอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสูตร 2%SF50G50 ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

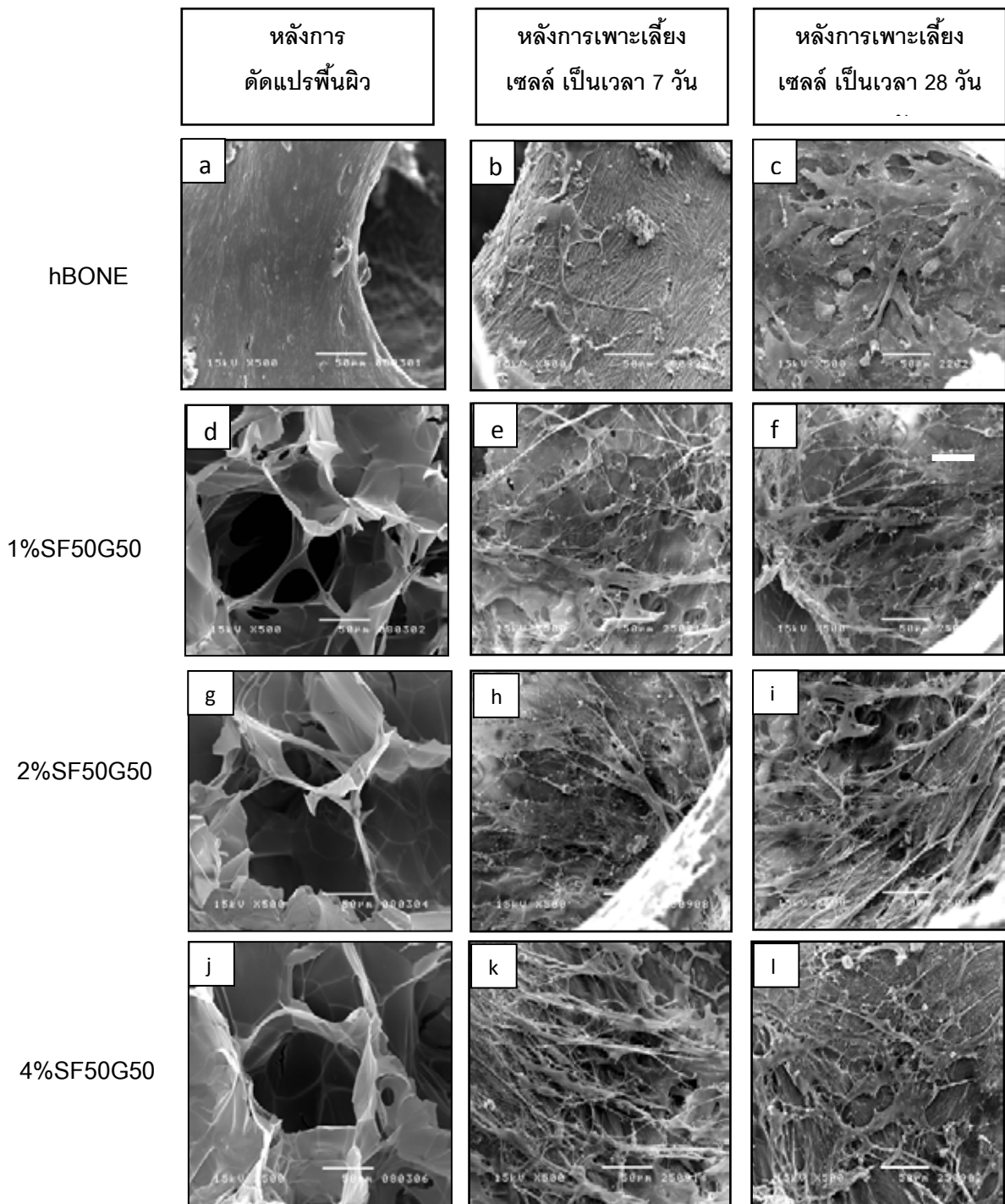
เมื่อพิจารณาปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ทั้ง 3 สูตร (1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50) พบว่า ปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าสูงขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นสารละลายชีววัสดุของผสมไฟโบรอินและเจลาตินเพิ่มมากขึ้น และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กระดูกภายหลังจากตัดแปรสูตร 4%SF50G50 สามารถชักนำให้เซลล์สร้างกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้มากที่สุด

จากรูปที่ 4.11 แสดงปริมาณของแคลเซียมบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกเป็นเวลา 28 วัน พบว่า ปริมาณของแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นในกระดูกมนุษย์ทุกประเภท เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้น และมีปริมาณของแคลเซียมสูงสุดในวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kim, U.J. ซึ่งพบว่า แคลเซียมจะเริ่มสูงในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป โดยเป็น late marker ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Kim, U.J. และคณะ 2005]

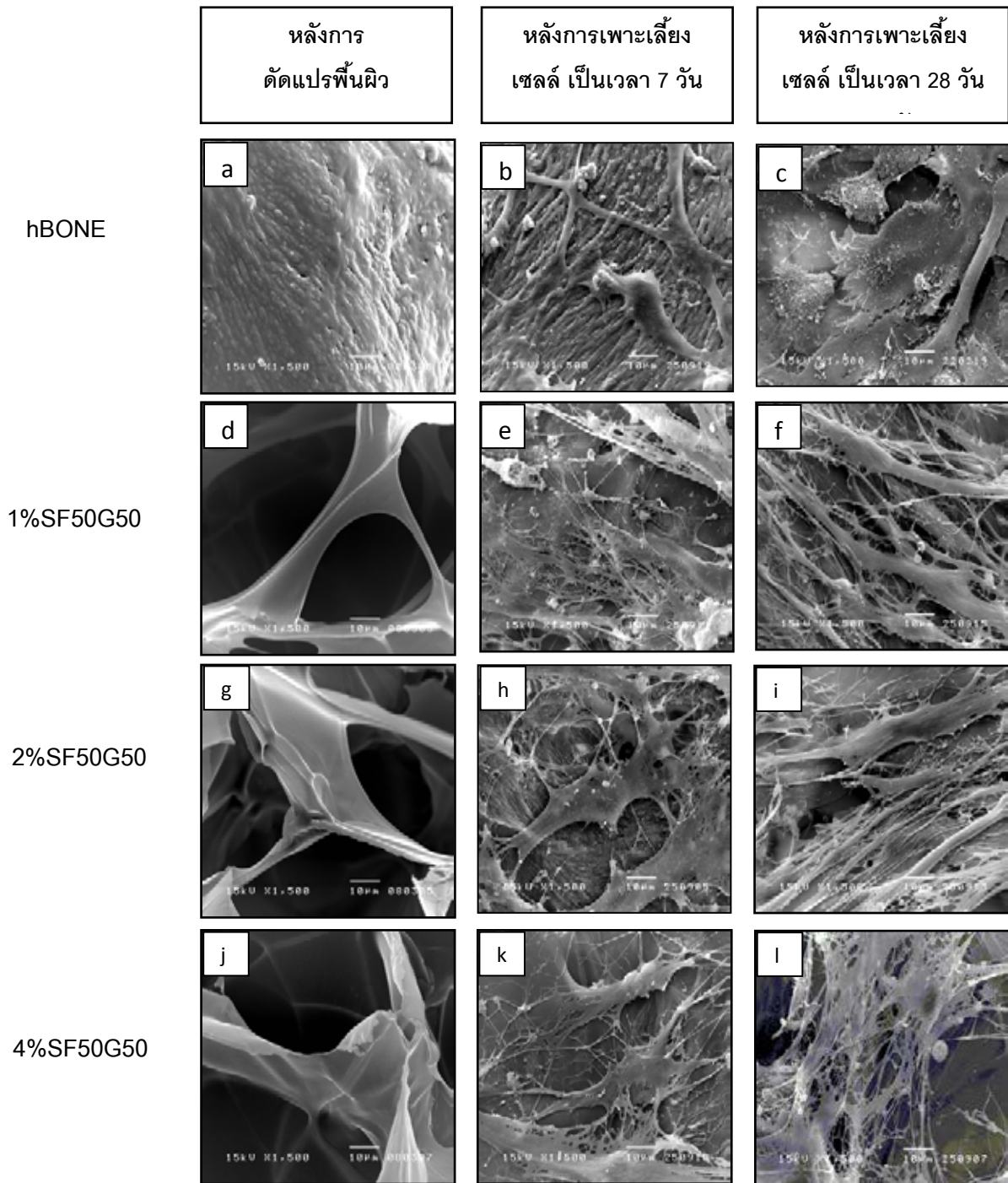
เมื่อพิจารณาปริมาณของแคลเซียมในกระดูกมนุษย์ทุกประเภทที่ระยะเวลา 28 วันของการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน สูตร 4%SF50G50 มีปริมาณของแคลเซียมเกิดขึ้นสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณของแคลเซียมที่เซลล์สามารถสร้างขึ้นนี้ สอดคล้องกับผลของกิจกรรมเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) กล่าวคือ สูตรที่ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) สูงที่สุดจะให้ปริมาณของแคลเซียมมากที่สุดด้วย

จากผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกดังรูปที่ 4.9 - 4.11 จะพบว่ามีผลสอดคล้องกับทฤษฎีของ Komori, T. และ Kishimoto, T. (1998) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 โดยในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะมีการเจริญเติบโต (Proliferation) โดยกระบวนการเจริญเติบโตจะค่อยๆชะลอลดน้อยลง ในขณะที่กระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation) จะค่อยๆเกิดขึ้น ซึ่งประกอบด้วย ช่วงการเกิด Matrix maturation (วันที่ 7-14) ซึ่งเป็นการเริ่มของกระบวนการเกิดเนื้อเยื่อกระดูก เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต โดยจะมีการหลั่งสาร ALP ออกมา ซึ่งเป็นสัญญาณของการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกในช่วงแรกนี้ ภายหลังจากวันที่ 14 เซลล์จะเข้าสู่ระยะ Mineralization ซึ่งระยะนี้การหลั่ง ALP จะลดลง ในขณะที่จะมีการสะสมของแคลเซียมมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งถือเป็นสัญญาณการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกอย่างต่อเนื่อง

จากรูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูที่เพาะเลี้ยงบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ภายหลังจากเพาะเลี้ยง เซลล์เป็นที่เวลา 7 วัน และ 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก พบว่า กระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ที่เวลา 4 วัน ลักษณะของเซลล์มีทั้งในส่วนที่ยังไม่แผ่ขยาย และแผ่ขยาย ส่วนที่เวลา 28 วัน ลักษณะของเซลล์ส่วนใหญ่จะแผ่ขยาย และมีการสร้างเมตริกซ์ ซึ่งคาดว่าเซลล์น่าจะอยู่ในระยะของการสะสมแคลเซียม โดยการตรวจพบปริมาณแคลเซียมที่สูงที่สุดในช่วงวันที่ 28 ดังแสดงในรูปที่ 4.11 นอกจากนี้ลักษณะรูปร่างของเซลล์ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Jennifer, L.M. และ Hockin, H.K.X. ที่พบว่า เซลล์มีรูปร่างแผ่ขยาย และสร้างเป็นเมตริกซ์เกิดขึ้น [Jennifer, L.M. และ Hockin, H.K.X. 2009]



รูปที่ 4.12 ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูที่เพาะเลี้ยงในกระดูกมนุษย์ hBONE (a-c) และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน 1%SF50G50 (d-f), 2%SF50G50 (g-i) และ 4%SF50G50 (j-l) ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 7 และ 28 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%คาร์บอนไดออกไซด์ เวลา 7 วัน และ 28 วัน (แถบสเกล = 50 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4.13 ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจากหนูที่เพาะเลี้ยงในกระดูกมนุษย์ hBONE (a-c) และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน 1%SF50G50 (d-f), 2%SF50G50 (g-i) และ 4%SF50G50 (j-l) ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 7 และ 28 วัน



เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณธาตุออกซิเจน ฟอสฟอรัส และแคลเซียม ด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) ที่มีอยู่บนพื้นผิวของกระดูกมนุษย์และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน หลังการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก และหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน โดยพิจารณาเฉพาะธาตุออกซิเจน ฟอสฟอรัส และแคลเซียม จาก 3 ตำแหน่งบนพื้นผิวของแต่ละสูตรตัวอย่าง และรายงานค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่ตรวจพบดังแสดงในตารางที่ 4.4 จะเห็นว่าปริมาณธาตุแต่ละชนิดในตัวอย่างกระดูกแต่ละสูตรภายหลังการตัดแปรจะมีค่าอยู่ในช่วงค่อนข้างกว้าง ซึ่งไม่เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกระดูกสูตรต่างๆ

เมื่อพิจารณาปริมาณธาตุบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินหลังการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน พบว่า ปริมาณธาตุออกซิเจน ฟอสฟอรัส และแคลเซียม ยังคงไม่เห็นค่าความแตกต่างอย่างชัดเจน และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณธาตุบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน จะเห็นว่าค่าต่ำสุดมีแนวโน้มสูงขึ้นเล็กน้อย แต่ค่าสูงสุดก็ยังคงอยู่ในช่วงเดียวกันกับกรณีที่พบในตัวอย่างหลังการตัดแปรโดยไม่มี ความแตกต่างที่ชัดเจน

เมื่อพิจารณาปริมาณธาตุบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน พบว่า ช่วงของปริมาณธาตุแคลเซียมที่ตรวจพบมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างใน 2 กรณีแรก (หลังการตัดแปรพื้นผิว และหลังการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน) แสดงให้เห็นว่าปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นอย่างมากนี้เป็นผลมาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ไม่ได้เป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ทั้งนี้ผลการตรวจวัดปริมาณแคลเซียมด้วยเครื่อง EDX ซึ่งเป็นการตรวจวัดแคลเซียมบนพื้นผิว จำนวน 3 ตำแหน่งนี้ช่วยสนับสนุนผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมด้วยวิธี Calcium contents ซึ่งเป็นการตรวจวัดแคลเซียมทั้งหมดที่สะสมอยู่ในตัวอย่าง (รูปที่ 4.11)

**ตารางที่ 4.4** ปริมาณธาตุออกซิเจน ฟอสฟอรัส และแคลเซียม ด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) ที่มีอยู่บนพื้นผิวของกระดูกมนุษย์ กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินหลังการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก และหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน

ประเภทของตัวอย่าง	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการตัดแปรพื้นผิว (เปอร์เซ็นต์)			ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการแช่ในอาหาร OM* เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)			ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูในอาหาร OM* เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)		
	O	P	Ca	O	P	Ca	O	P	Ca
hBONE	61-73	9-19	16-22	65-67	12-13	21-22	45-57	11-18	32-42
1%SF50G50	61-78	7-8	15-31	65-66	10-11	24-25	22-49	12-21	39-57
2%SF50G50	60-75	10-13	14-27	63-64	11-13	24-25	25-33	12-21	47-61
4%SF50G50	51-74	7-17	19-32	60-62	11-13	26-27	17-28	10-16	58-71

\*OM = อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพทั้งหมด สรุปได้ว่ากระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (1%SF50G50, 2%SF50G50 และ 4%SF50G50) มีการยึดเกาะ การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่ากระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการตัดแปร (hBONE) เมื่อพิจารณาสูตรที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินทั้งหมด พบว่ากระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน สูตร 4%SF50G50 มีความสามารถในการส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะ การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูนอกร่างกายได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นชัดเจนว่าการตัดแปรพื้นผิวกระดูกมนุษย์ด้วยไฟโบรอินและเจลาตินช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้ามายึดเกาะและเจริญเติบโตในกระดูกได้ดีขึ้น (Osteoconduction) รวมถึงช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteoinduction)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของชีววัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่นำมาใช้ในการตัดแปรรูปพื้นผิวของกระดูกมนุษย์โดยการเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวางประเภท EDC/NHS ร่วมกับกระบวนการทำแห้งแข็งด้วยความเย็น โดยทดสอบสมบัติทางกายภาพ และสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการของกระดูกมนุษย์ ผลการทดลอง พบว่าโครงสร้างพื้นฐานภายในของกระดูกมนุษย์มีความขรุขระ ส่วนโครงสร้างพื้นฐานภายในของกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรรูปพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน โดยกำหนดอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน คือ 80/20 และ 50/50 และใช้ความเข้มข้นของสารละลายผสมของชีววัสดุ 1%, 2% และ 4% พบว่า ภายหลังจากการตัดแปรรูปกระดูกมนุษย์ด้วยชีววัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาติน จะมีชีววัสดุผสมเข้าไปเชื่อมขวางอยู่ภายในรูพรุนของกระดูกมนุษย์ในลักษณะคล้ายกับมีโครงเลี้ยงเซลล์จากชีววัสดุผสมแทรกอยู่ระหว่างรูพรุนของกระดูกมนุษย์ ทำให้สังเกตเห็นรูพรุนที่มีขนาดเล็กกลวงเชื่อมโยงต่อกันเป็นเครือข่าย อย่างสม่ำเสมอ

กระดูกมนุษย์มีความพรุนร้อยละ 91.3 เมื่อทำการตัดแปรรูปกระดูกมนุษย์ด้วยไฟโบรอินและเจลาติน พบว่า มีความพรุนลดลงอยู่ในช่วงร้อยละ 75 – 89 เนื่องจากมีปริมาณของชีววัสดุผสมของไฟโบรอินและเจลาตินเข้าไปอยู่ภายในรูพรุนของกระดูกมนุษย์มากขึ้น รูพรุนมีขนาดเล็กกลวง ทำให้มีความพรุนลดลง ค่ามอดูลัสของการกดของกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการตัดแปรรูป และที่ได้รับการตัดแปรรูปไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากโครงสร้างหลักของกระดูกมนุษย์เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความแข็งแรงมาก เมื่อเทียบกับสารอินทรีย์(ชีววัสดุ)มีปริมาณเล็กน้อยที่เข้าไปตัดแปรรูปในกระดูกมนุษย์

จากการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรรูปพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งให้เห็นว่ากระดูกที่ได้รับการตัดแปรรูปพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินที่อัตราส่วนผสม 50/50 มีจำนวนเซลล์มายึดเกาะและเจริญเติบโตมากกว่าที่อัตราส่วนผสม 80/20 และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายผสมเพิ่มขึ้นจาก 1% ถึง 4% โดยนำหน้าพบพบว่า ความเข้มข้นมีผลต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายผสมมากขึ้น ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์มายึดเกาะและเจริญเติบโตมากขึ้น สรุปได้ว่าเมื่อมีอัตราส่วนของเจลาตินมากขึ้น และความเข้มข้นของสารละลายผสมมากขึ้น ทำให้เซลล์สามารถยึด

เกาะและเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากเจลาตินมีลำดับของกรดอะมิโน arginine-glycine-aspartic (RGD) ซึ่งช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการดัดแปร ส่วนผลการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูในกระดูกมนุษย์สูตรต่างๆ พบว่ากระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินสามารถส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกมนุษย์ที่ไม่ได้รับการดัดแปร โดยเฉพาะกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 50/50 ด้วยสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 4% (4%SF50G50) จะมีการตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส และปริมาณของแคลเซียมสูงที่สุดภายในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นเวลา 28 วัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้ามายึดเกาะ และเจริญเติบโตในกระดูกได้ดีขึ้น (Osteoconduction) และยังกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteoinduction) ได้ดีด้วย

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. เปลี่ยนแปลงสารที่นำมาใช้เชื่อมขวาง เช่น glutaraldehyde และนำไปทดสอบสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทดสอบในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสารดังกล่าวได้รับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาจากประเทศสหรัฐอเมริกาแล้ว
2. นำกระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาตินไปทดสอบในระดับสัตว์ทดลอง เพื่อดูความสามารถในการชักนำให้เกิดกระดูกในสัตว์ทดลอง

## รายการอ้างอิง

- Barnes, C.P., Pemble, C.W., Brand, D.D., Simpson, D.G., and Bowlin, G.L. Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol. *Tissue engineering* 13 (2007):1593-1605.
- Bautista, D.S., et al. Quantification of Osteopontin in Human Plasma With an ELISA: Basal Levels in Pre- and Postmenopausal Women. *Clinical Biochemistry* 29(1996): 231-239.
- Belmonte, M.M., et al. Mesenchymal stem cells on plasmadeposited acrylic acid coatings: An in vitro investigation to improve biomaterial performance in bone reconstruction. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 20 (2005) 343-360.
- Bronzino, J.D. *Biomedical engineering fundamentals*. New York: Taylor & Francis, (2006).
- Bryan, H.D., and Tortora, G.J. *Principles of anatomy and physiology*. New York: Wiley, (2005).
- Carmen, A.C., and Corcuera, B.L. Structure. function and regulation of glycine neurotransmitters. *European Journal of Pharmacology* 479 (2003): 249– 262.
- Caroline, S., Judith, S., Kerstin, W., Johanannes, F., and Dirk, H. Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behavior of human mesenchymal stem cells (MSC) *in vitro*. *Injury* 41(2010)731-738.
- Chamchongkaset, J., Kanokpanont, S., Kaplan, D.L., and Damrongsakkul, S. Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering. *Advanced Material Research* 55–57(2008): 685–688.
- Chang, B.S., et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21(2002): 1291-1298.
- Choi, Y. S., et al. Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials* 20(1999):409-417.

- Dominici, M., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8(2006):315-317.
- Donzelli, E., et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. Archives of oral biology 52(2007): 64-73.
- Doron, I., and Amy, L. Bone graft substitutes. Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery. 9(2003)151-160.
- Duthie, R.B., and Bentley, G. Mercer's Orthopaedic Surgery. 8<sup>th</sup> London: Butler and Tanner.27 (1983).
- Eun, S.G., David, J.F., Samuel M.H., and Richard, J.S. Silk fibroin membranes from solvent-crystallized silk fibroin/gelatin blends: Effects of blend and solvent composition. Materials Science and Engineering. C 27 2007:426–431
- Famdale, R.W., Buttle, D.J. and Barrett, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochimica et Biophysica Acta 883(1986):173-177.
- Friess, W. Review article Collagen-biomaterial for drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45 (1998): 113-136.
- Hofmann, S., et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. Biomaterials 28 (2007): 1152-1162.
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H., and Yasuhiko, T. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide–amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. Biomaterials 27(2006):5089-5098.
- Jennifer L. M. and Hockin H.K.X. Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate–Chitosan composite scaffold. Biomaterials 30(2009):2675–2682

- Jetbumpenkul, P. Effect of chemical crosslink and hydroxyapatite on the properties of Thai silk fibroin/gelatin scaffold. Master's Thesis., Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, 2009.
- Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M., and Kaplan, D.L. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. Biomaterials 26(2005): 2775-2785.
- Kundu, J., Dewan, M., Ghoshal, S., and Kundu, S.C. Mulberry non-engineered silk gland protein vis-a-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices. Journal Master Science 19(2008):2679-2689.
- Langer, R. Tissue engineering. Molleccular Therapy 1(2000):12-15
- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., and Farson, D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds, Materials Science and Engineering C 27 (2007): 504-509.
- Lee, J.M., Edwards, H.H.L., Pereira, C.A., and Samii, S.I. Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). Journal of Materials Science 7 (1996):531-541.
- Lee, S.B., et al. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6)- $\beta$ -glucan. Biomaterials 24(2003): 2503-2511.
- Lee, S. B., Kima, Y. H., Chonga, M. S., Hongb, S. H. and Lee, Y. M. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method, Biomaterials 26(2005): 1961-1968.
- Lennon, D.P., et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. Experimental Cell Researc 219 (1995): 211-222.
- Li, J.L., Pan, J.L., Zhang, L.G., and Yu, Y.T. Culture of hepatocytes on fructose modified chitosan scaffolds. Biomaterials 24 (2003)2317-2322.

- Lv, Q., Feng, Q., Hu, K., and Cui, F. Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture. Polymer 46 (2005): 12662–12669.
- Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X. and Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineer, Biomaterials 24(2003): 4833-4841.
- Mandal, B.B., Jasdeep, K. M., and Kundu, S.C. Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. European Journal of Pharmaceutical Sciences 37(2009): 160–171.
- Mao, J.S., Liu, H.F., Yin, Y.J., and Yao, K.D. The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. Biomaterials 24 (2003): 1621–1629.
- Marolt, D., et al. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. Biomaterials 27 (2006): 6138–6149.
- Meinel, L., et al. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. Wiley interscience (2004): 25-34.
- Netter, F.H. Musculoskeletal system : anatomy physiology and metabolic disorders. Summit. New Jersey. Ciba-Geigy Corporation (1987).
- Nicholas, D.E., Eileen, G., and Julia, M.P. Scaffolds for stem cells. Materials today 9(2006):26-33.
- O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., and Gibson, L. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterials 26 (2005)433-441.
- Paul, K.C., and Xuanyang, L. Biomaterials fabrication and processing handbook. Faylor & Fracis Group. USA. NW. (2008).
- Pek, Y.S., Spector, M., Yannas, I.V., and Gibson, L.J. Degradation of a collagenchondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. Biomaterials 25(2004): 473-482.



- Pieper, J., Hafmans, T., Veerkamp, J., and Van K.T. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS cross-linking and ultrastructural aspects. Biomaterials 21 (2000): 581-593.
- Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Yasuhiko, T., and Damrongsakkul, S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films, Carbohydrate Polymers 78(2009): 873–878.
- Rocky, S.T., Genevieve, B., and Richard, T. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Research and Therapy 5(2002):32-45.
- Ruth, K., and Lana, R.S. Stem cells: Scientific progress and future research directions. Terese Winslow 3(2001):173-181.
- Sautier, J.M., Nefussi, J.R., and Forest, N. In vitro differentiation and mineralization of cartilaginous nodules from enzymatically released rat nasal cartilage cells. Biology of the Cell 78 (1993): 181-189.
- Sionkowska, A., et al. Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen / chitosan thin films. Polymer Degradation and Stability 91 (2006) : 3026-3032.
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., and Yasuhiko, T. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate, Biomaterials 26 (2005): 3587-3596.
- Tomihata, K., and Ikada, Y. Cross-linking of gelatin with carbodiimides. Tissue Engineering 2 (1996): 307-313.
- Tritanipakul, S. Effects of gelatin conjugation and hydroxyapatite deposition on thai silk fibroin Scaffold. Master's thesis., Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (2009).
- Yasuhiko, T., and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 31 (1998): 287–301.

- Vepari, C., and Kaplan, D.L. Silk as a biomaterial. Progress in Polymer Science 32 (2007): 991-1007.
- Vachiraroj, N., Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Pichyangkura, R., Banaprasert, T., and Kanokpanont, S. A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on in vitro biocompatibility for bone substitutes, International Journal of Biological Macromolecules. 45(2009):470-477.
- Wess, T., and Orgel, J. Changes in collagen structure : drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. Thermochimica Acta 365 (2000): 119-128.
- Yannas, V. I. Tissue and Organ Regeneration in Adults. New York: Springer, 2001.
- Young, S., Wong, M., Yasuhiko, T., and Mikos, A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. Journal of Controlled Release 109(2005): 256-274.
- Zhang, D.Y., et al. Biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. Biomaterials 30(2009): 2694-2704.
- Zhang, Y., Venugopal, J., Huang, Z., Lim, C., and Ramakrishna, S. Crosslink of the electrospun gelatin nanofibers. Polymer 47 (2006): 2911-2917.
- Available From : [http://www.piercenet.com/media/edc\\_coupling](http://www.piercenet.com/media/edc_coupling)
- Available From : <http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>
- Available From : [http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone\\_tissue\\_engineering/](http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/)
- Available From : [http://www.en.rmut.ac.th/prd/Journal/Silk\\_with\\_figuresnew.pdf](http://www.en.rmut.ac.th/prd/Journal/Silk_with_figuresnew.pdf)
- Available From : [http://www.concord.org/silk/silk\\_beta.html](http://www.concord.org/silk/silk_beta.html)

**ภาคผนวก**

### ภาคผนวก ก

ตาราง ก.1 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกระดูกมนุษย์  
ภายหลังการตัดแปรด้วยชีวะวัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

ประเภทของตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1%SF80G20	21.47	1.49
2%SF80G20	23.18	1.06
4%SF80G20	28.29	2.43
1%SF50G50	19.66	0.68
2%SF50G50	26.98	2.18
4%SF50G50	34.31	0.98

ตาราง ก.2 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความพรุนของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์  
ที่ได้รับตัดแปรพื้นผิวด้วยชีวะวัสดุผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

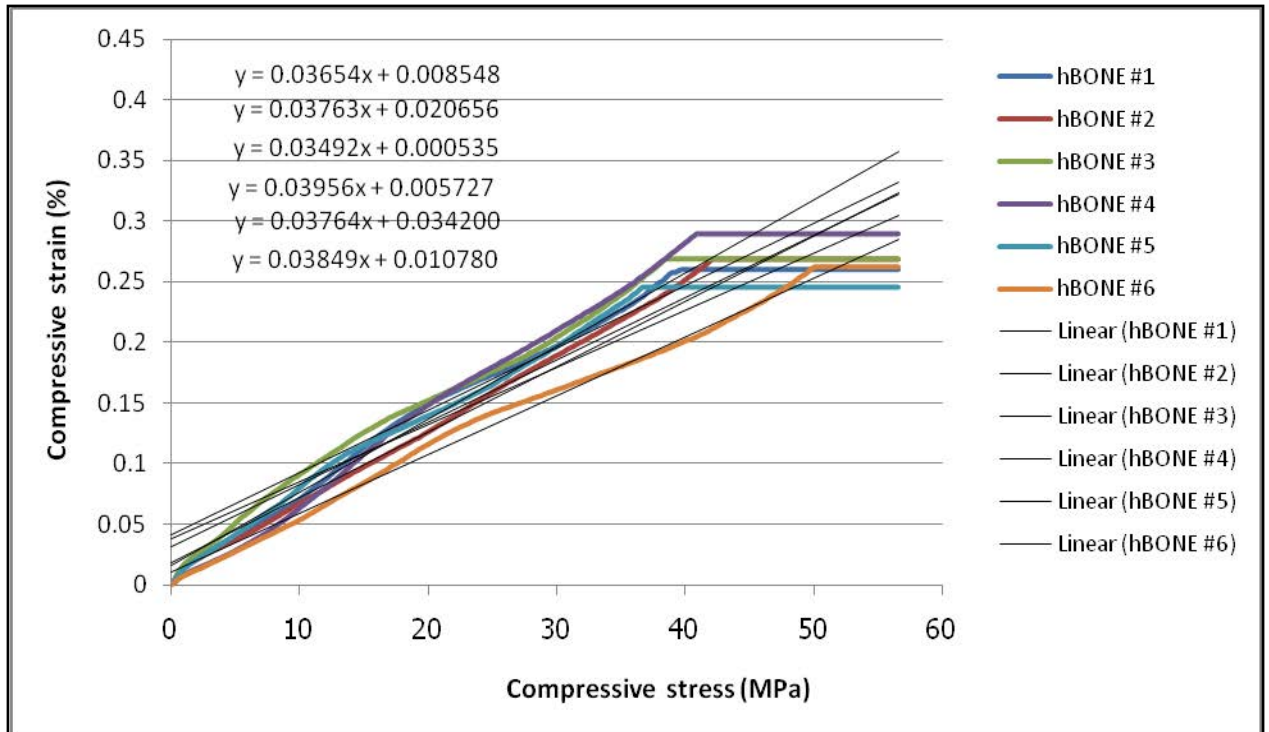
ประเภทของตัวอย่าง	ความพรุน (%)	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
hBONE	91.3	5.2
1%SF80G20	89.3	3.6
2%SF80G20	85.6	7.1
4%SF80G20	80.5	2.7
1%SF50G50	82.3	3.2
2%SF50G50	80.4	5.5
4%SF50G50	75.7	4.9

## ภาคผนวก ข

### ความสามารถในการทนแรงกด

คำนวณหาค่ามอดูลัสของการกด (compressive modulus) จากค่าความชันระหว่างกราฟของความเค้น (compressive stress) และความเครียด (compressive strain) โดยทำการทดสอบซ้ำ 6 ครั้ง เพื่อรายงานผลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากสูตร

$$\text{Compressive modulus} = \frac{\text{stress (MPa)}}{\text{Strain (\%)}} \times 1,000 \times 100 \quad (\text{kPa})$$



ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสามารถในการทนแรงกดของกระดูก โดยคำนวณค่ามอดูลัสของการกด จากค่าความชันของกราฟระหว่าง stress (MPa) และ strain (%) ในช่วง strain = 5%-30% ซึ่งเป็นช่วงที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จะได้ค่ามอดูลัสของกระดูก เท่ากับ 3,746 กิโลปาสคาล

**ตาราง ข.1** ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่ามอดูลัสของการกดของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (ในสภาวะแห้ง)

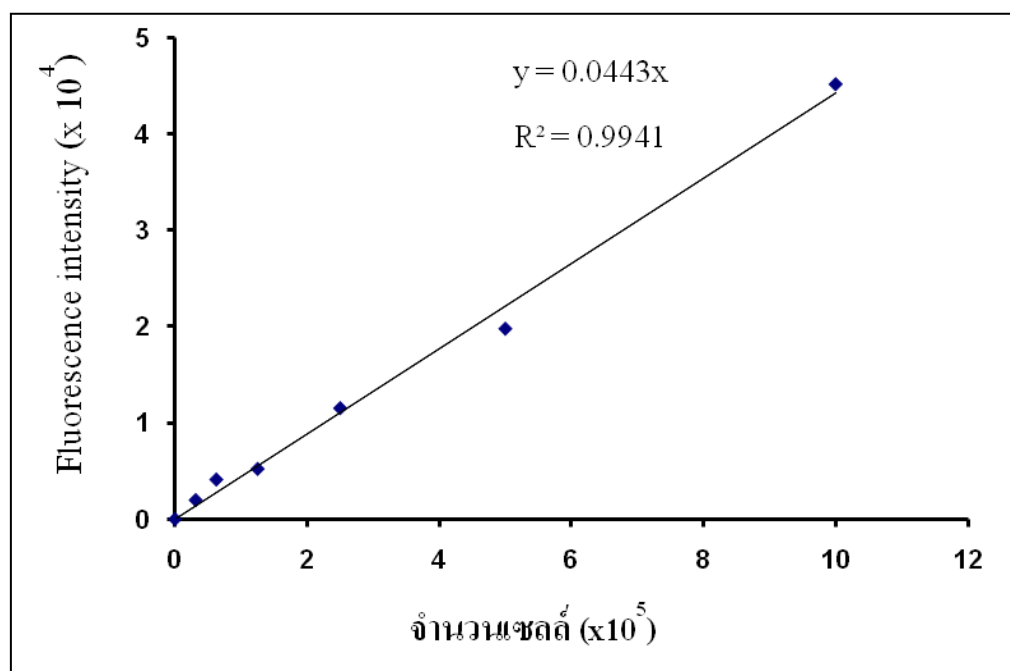
ประเภทของตัวอย่าง	ค่ามอดูลัส (กิโลปาสคาล)	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
hBONE	3,746	127.1
1%SF80G20	3,917	109.2
2%SF80G20	4,139	227.6
4%SF80G20	3,810	198.3
1%SF50G50	3,218	121.7
2%SF50G50	3,846	183.0
4%SF50G50	3,596	141.3

ตาราง ข.2 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่ามอดูลัสของการกดของกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินและเจลาติน (ในสภาวะเปียก)

ประเภทของตัวอย่าง	ค่ามอดูลัส (กิโลปาสคาล)	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
hBONE	3113	134.3
1%SF80G20	2975	213.4
2%SF80G20	3282	152.8
4%SF80G20	2974	128.1
1%SF50G50	2593	241.5
2%SF50G50	2828	173.1
4%SF50G50	2621	252.2

## ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกโดยวิธี DNA Assay

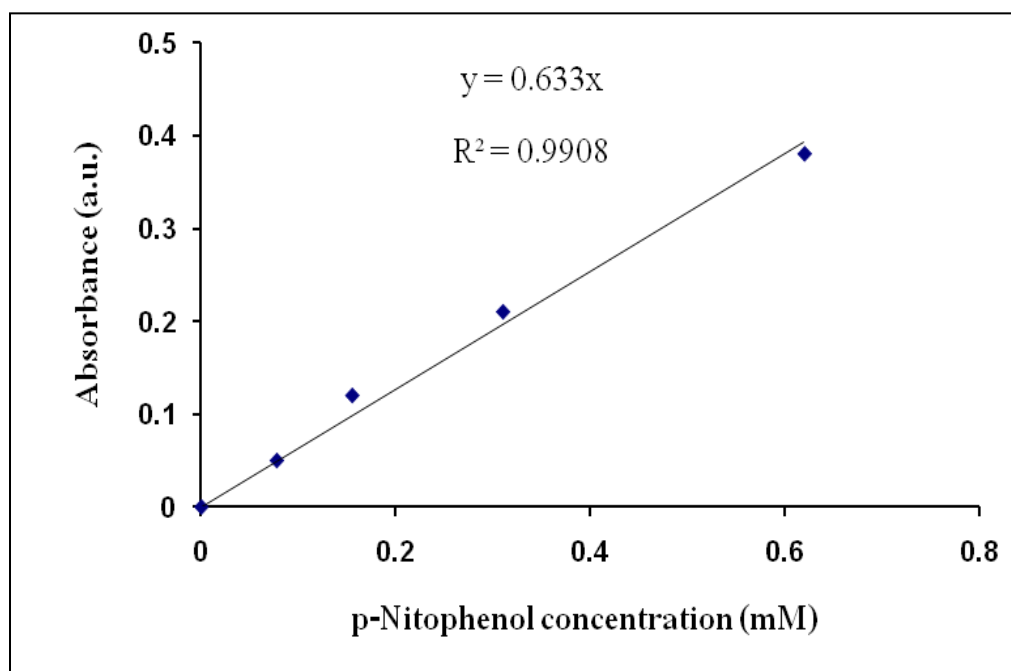


รูป ค กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกโดยวิธี DNA Assay



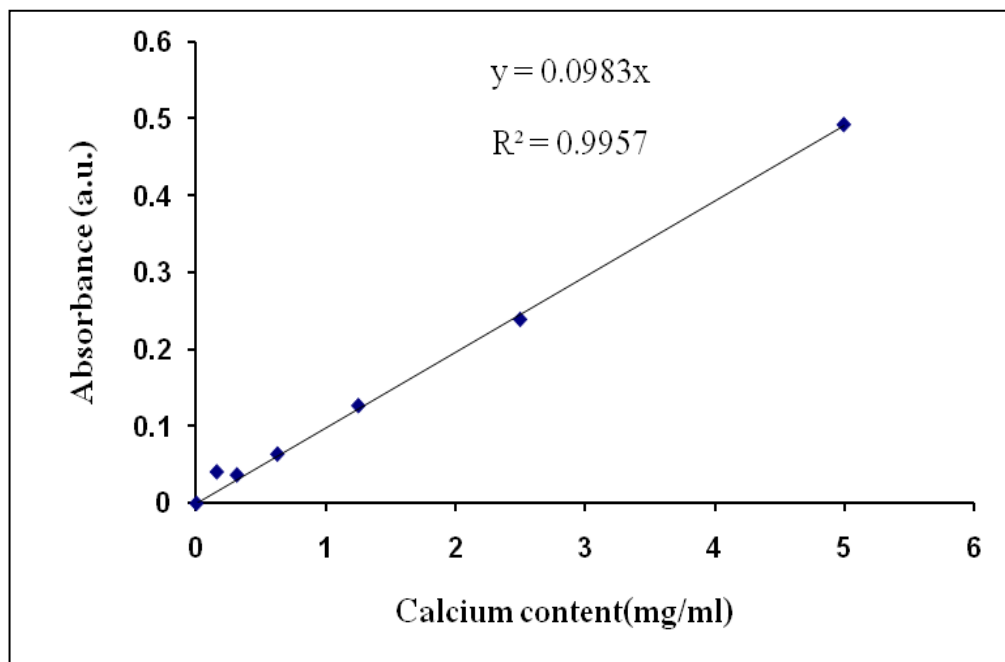
## ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)



รูป ง กราฟมาตรฐานการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)

ภาคผนวก จ  
กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม



รูป จ กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม

### ภาคผนวก จ

การคำนวณอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ทวิคูณ (Population doubling time, PDT)

เวลาการแบ่งตัวทวิคูณ (population doubling time, PDT) คำนวณจาก

$$\text{เวลาแบ่งตัวทวิคูณ PDT} = 1/r \text{ (ชั่วโมง)}$$

เมื่อ อัตราการแบ่งตัว (multiplication rate, r) คำนวณจาก

$$\begin{aligned} \text{อัตราการแบ่งตัว } r &= \text{จำนวนชั้นอายุต่อหนึ่งหน่วยเวลา} \\ &= 3.32 (\log N_H - \log N_1) / (t_2 - t_1) \text{ (รุ่นต่อชั่วโมง)} \\ \text{โดย } N_1 &\text{ คือ เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้น ที่เวลา } t_1 \\ N_H &\text{ คือ จำนวนเซลล์ทั้งหมด ที่เวลา } t_2 \end{aligned}$$

เช่น การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนกระดูกมนุษย์ในอาหารปกติ โดยเลือกเวลาที่อยู่ในช่วง log phase

ที่เวลา 1 วัน มีเซลล์  $10 \times 10^5$  เซลล์

ที่เวลา 7 วัน มีเซลล์  $15 \times 10^5$  เซลล์

$$\begin{aligned} \text{อัตราการแบ่งตัว } r &= 3.32 [\log (2.4 \times 10^5) - \log (5 \times 10^5)] / (24 - 168) \\ &= 5.18 \times 10^3 \text{ รุ่นต่อชั่วโมง} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{เวลาแบ่งตัวทวิคูณ PDT} &= 1/r \\ &= 1 / 6.48 \times 10^3 \\ &= 156 \text{ ชั่วโมง} \end{aligned}$$

### ภาคผนวก ช

#### การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, $\mu$ )

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate,  $\mu$ ) คำนวณจาก

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์  $\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt}$  (ต่อชั่วโมง)

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dx$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1$$

โดย $X_1$	คือ	จำนวนเซลล์ที่เวลา $t_1$
$X_2$	คือ	จำนวนเซลล์ที่เวลา $t_2$

เช่น การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนกระดุกมนุษย์ในอาหารปกติ โดยเลือกเวลาที่อยู่ในช่วง log phase

ที่เวลา 1 วัน มีเซลล์  $2.4 \times 10^5$  เซลล์

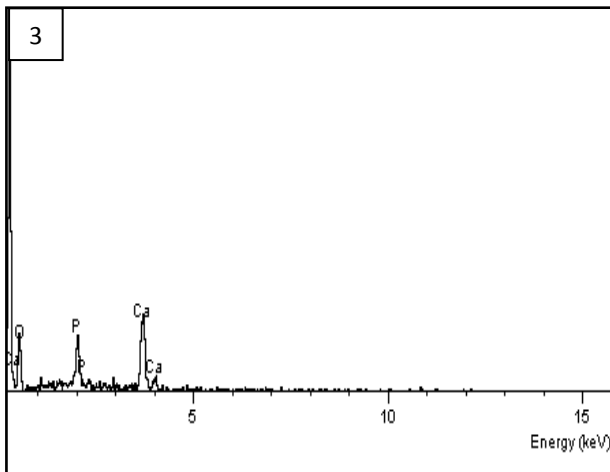
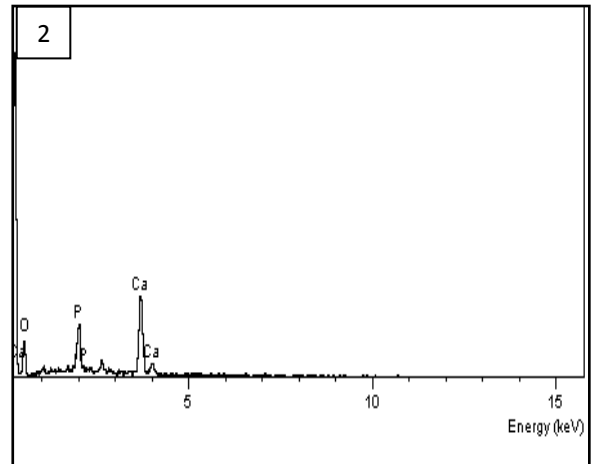
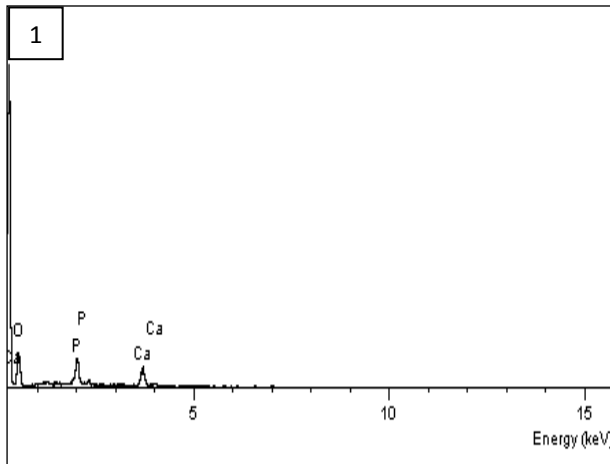
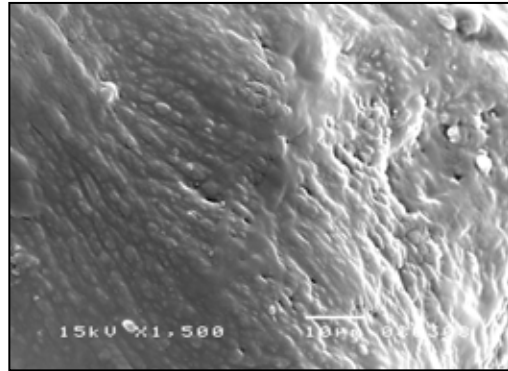
ที่เวลา 7 วัน มีเซลล์  $5 \times 10^5$  เซลล์

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

$$\begin{aligned} \mu(168-24) &= \ln(2.4 \times 10^5) - \ln(5 \times 10^5) \\ &= 2.58 \times 10^{-3} \text{ ต่อชั่วโมง} \end{aligned}$$

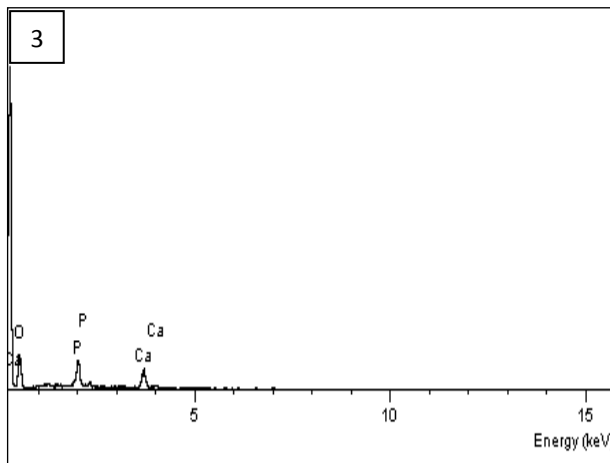
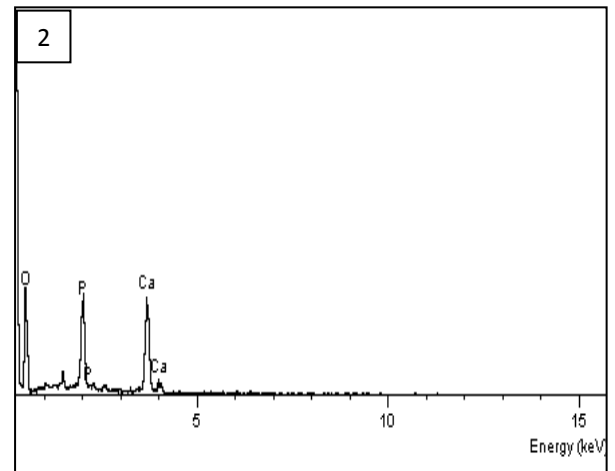
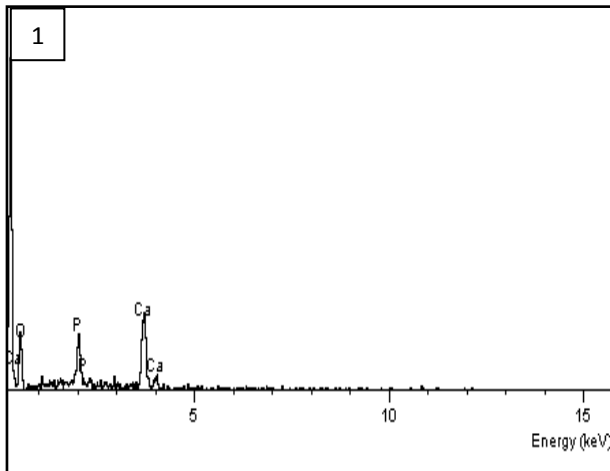
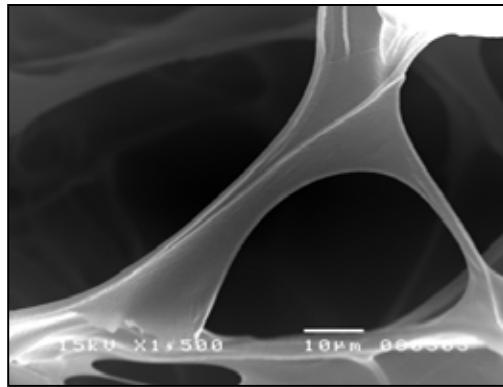
ภาคผนวก ซ

การวิเคราะห์ธาตุบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอิน/เจลาตินด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)



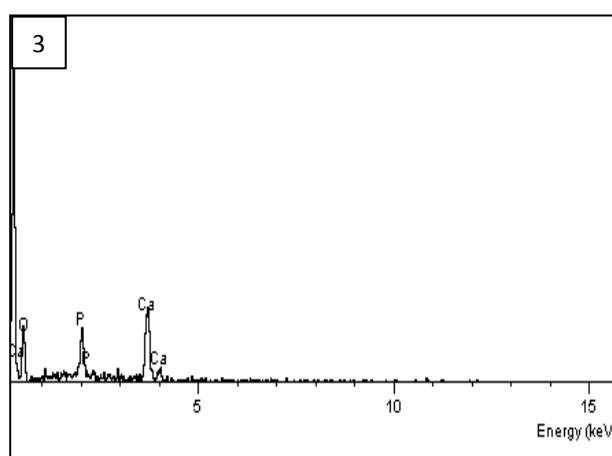
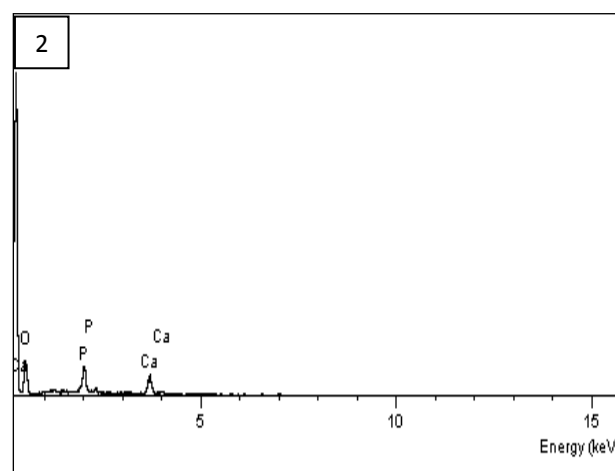
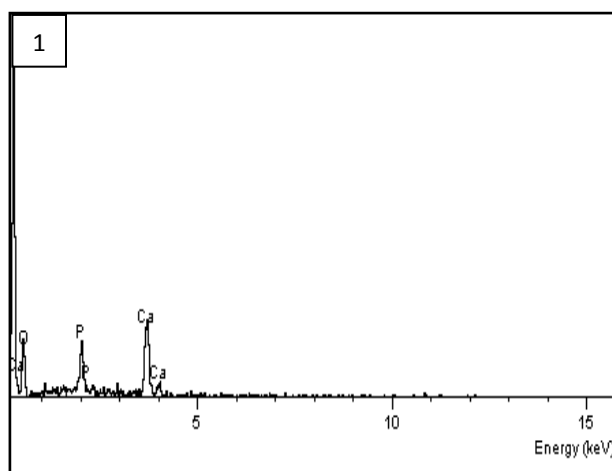
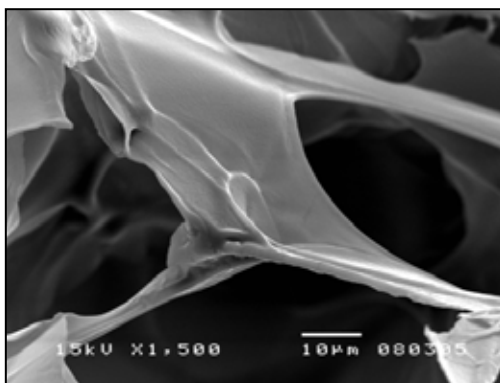
ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่าง หลังการตัดแปรพื้นผิว (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	73	69	61
P	11	9	19
Ca	16	22	20

รูปที่ ซ.1 กระดูกมนุษย์ (hBONE)



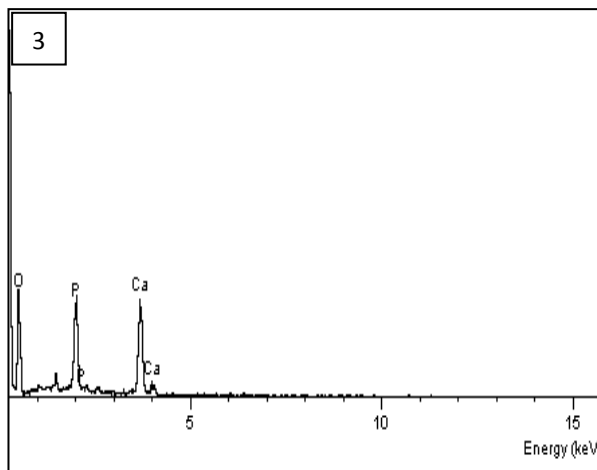
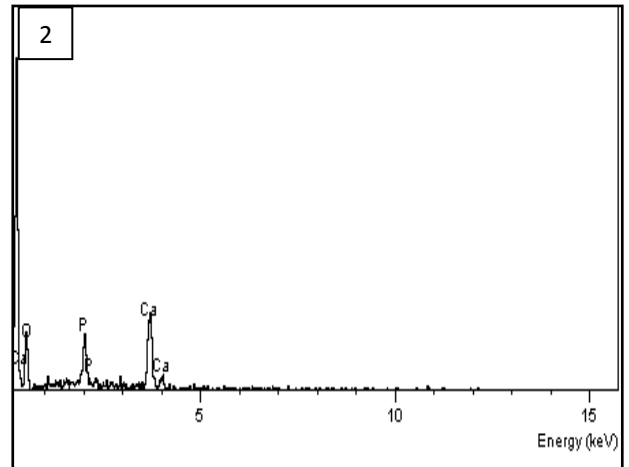
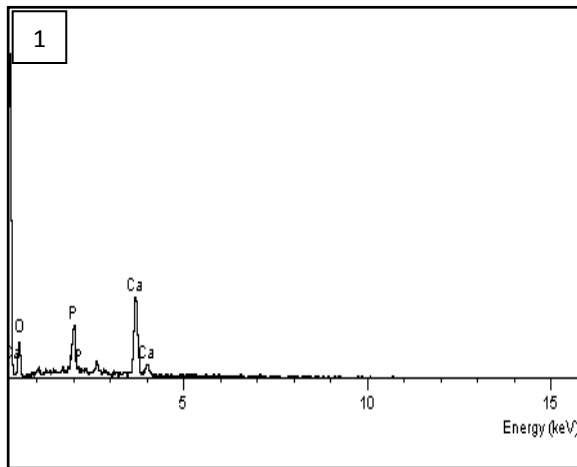
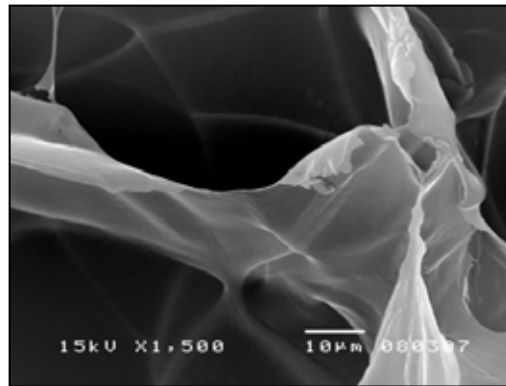
ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างก่อนการเพาะเลี้ยง (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	73	61	78
P	8	8	7
Ca	19	31	15

รูปที่ ๕.2 กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 1% โดยน้ำหนัก (1%SF50G50)



ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างก่อนการเพาะเลี้ยง (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	71	75	60
P	10	11	13
Ca	19	14	27

รูปที่ ๕.3 กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 2% โดยน้ำหนัก (2%SF50G50)



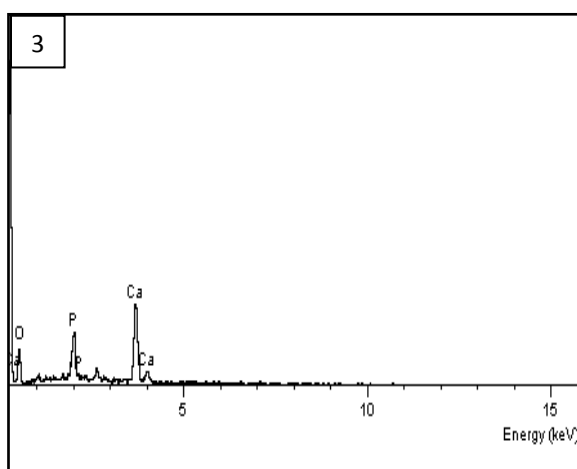
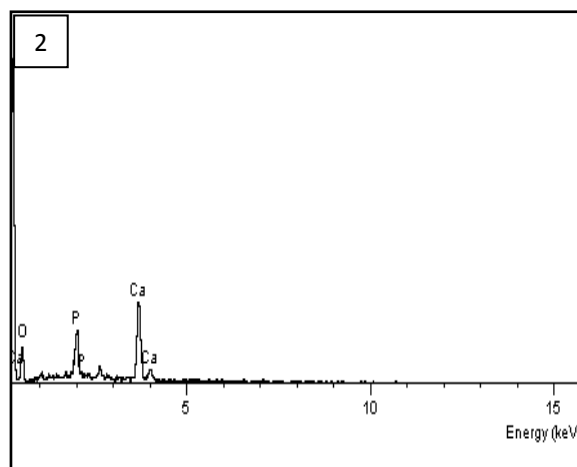
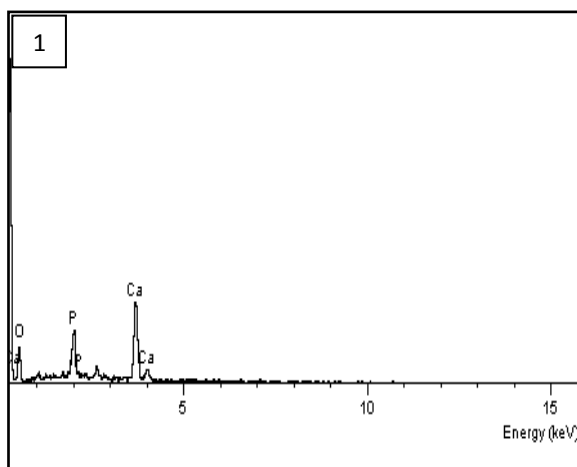
ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างก่อนการเพาะเลี้ยง (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	67	74	51
P	11	7	17
Ca	22	19	32

รูปที่ ๕.4 กระจุกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก (4%SF50G50)



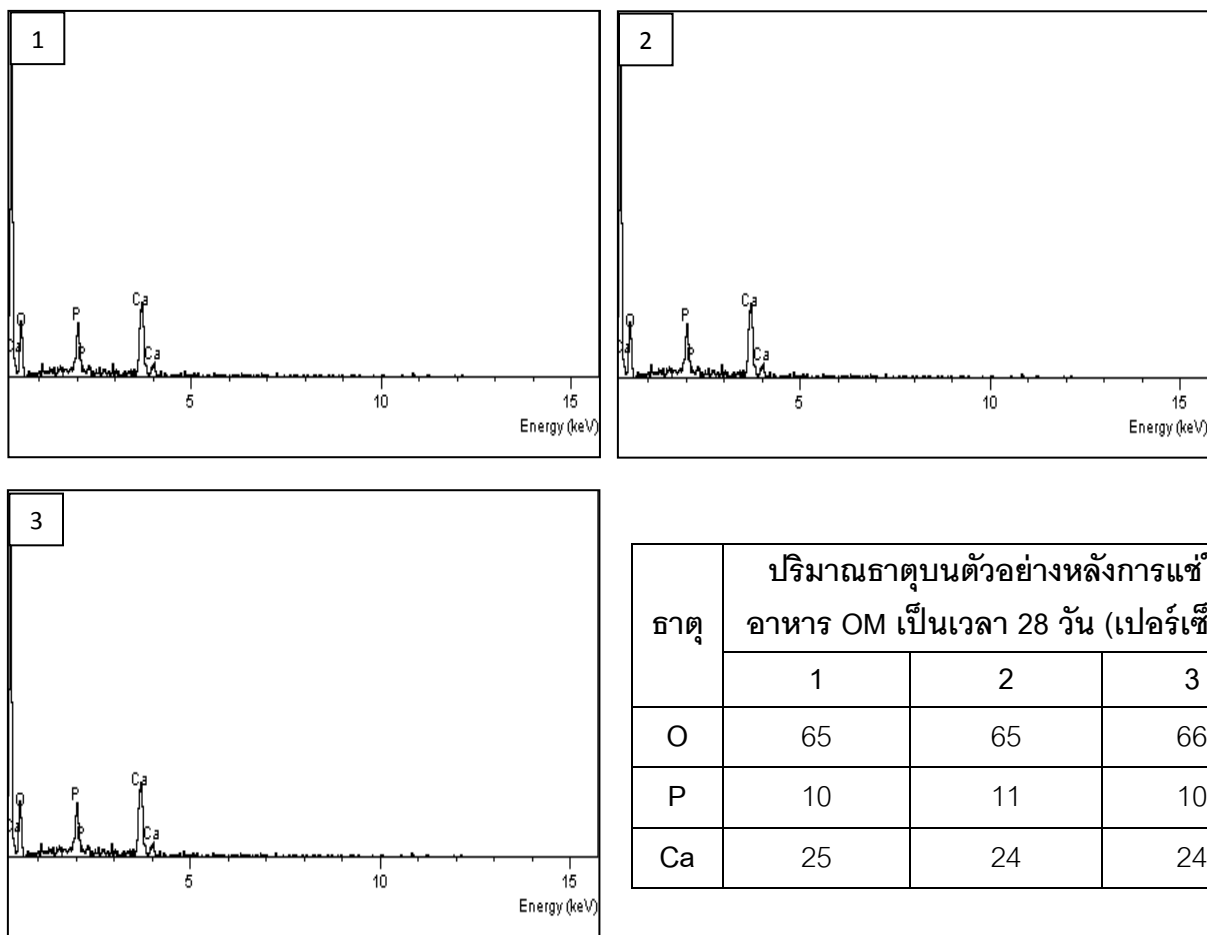
### ภาคผนวก ฅ

การวิเคราะห์ธาตุบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรรูปผิว  
ด้วยไฟโบรอิน/เจลาตินหลังการแช่ในอาหาร OM ที่ระยะเวลา 28 วัน  
สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% คาร์บอนไดออกไซด์  
ด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)

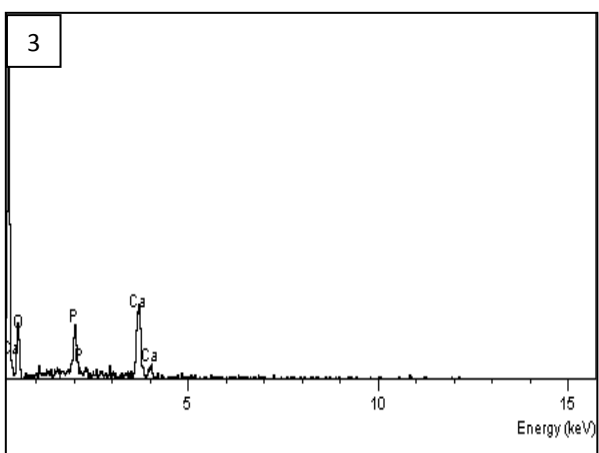
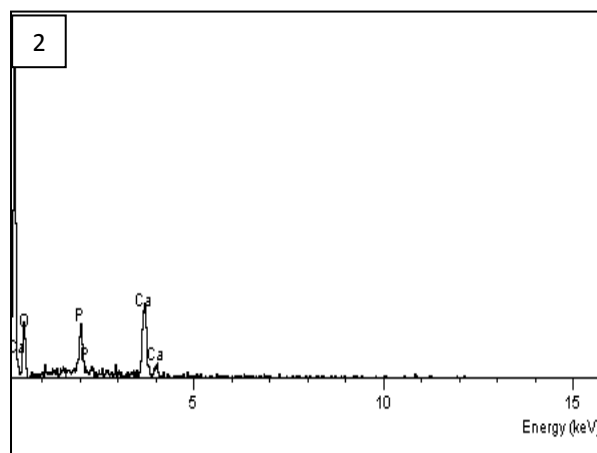
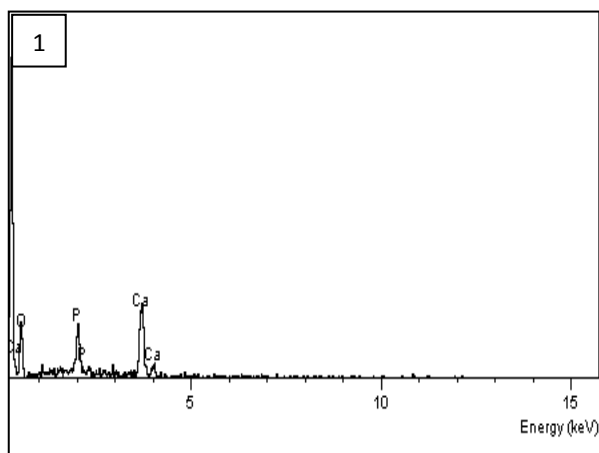


ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการแช่ใน อาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	66	67	65
P	12	12	13
Ca	22	21	22

รูปที่ ฅ.1 กระดูกมนุษย์ (hBONE)

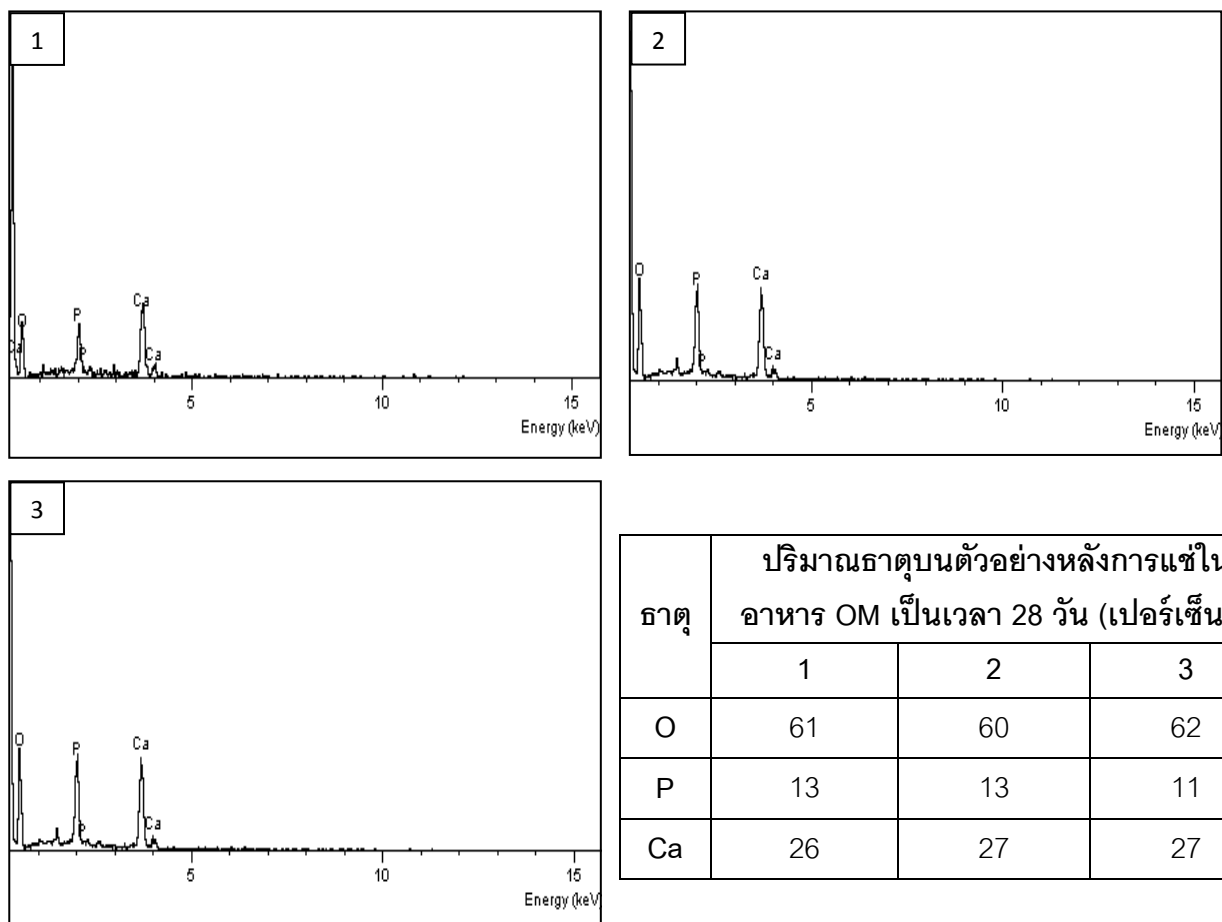


รูปที่ ๓.2 กระจุกอนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 1% โดยน้ำหนัก (1%SF50G50)



ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการแช่ใน อาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	63	64	64
P	13	11	12
Ca	24	25	24

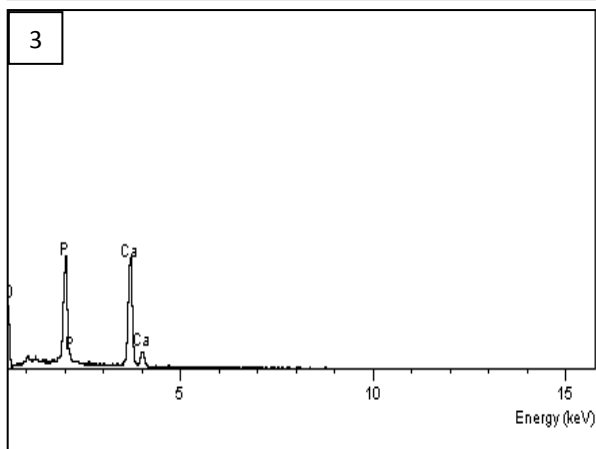
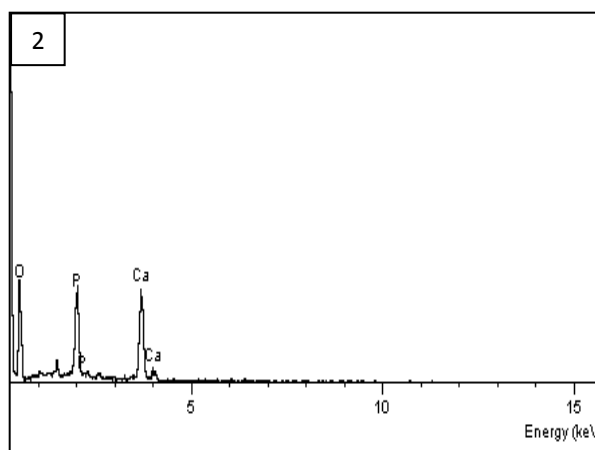
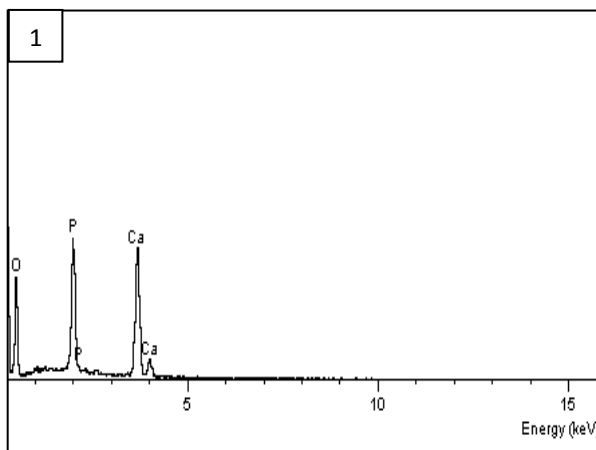
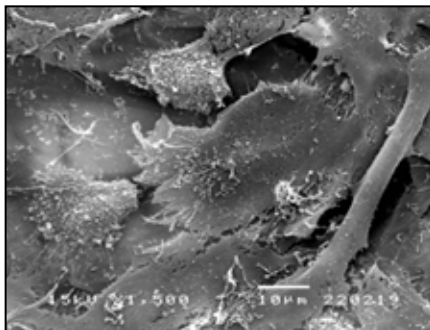
รูปที่ ๓.3 กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 2% โดยน้ำหนัก (2%SF50G50)



รูปที่ ๔.4 กระดุกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก (4%SF50G50)

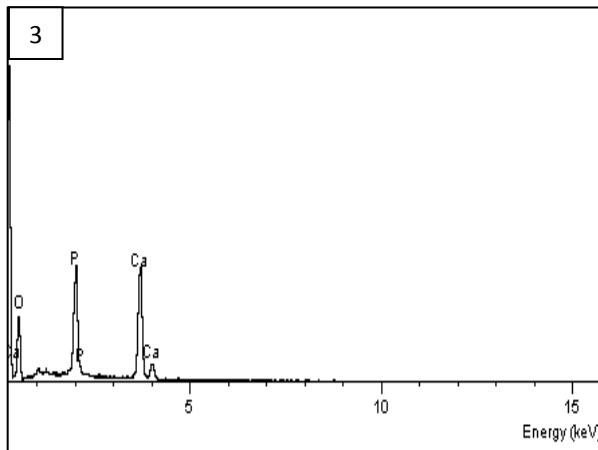
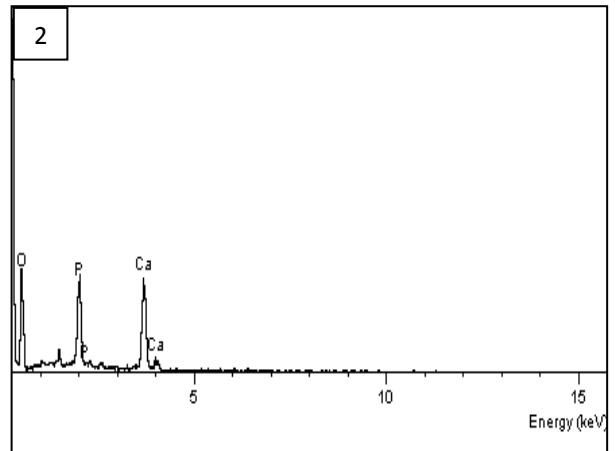
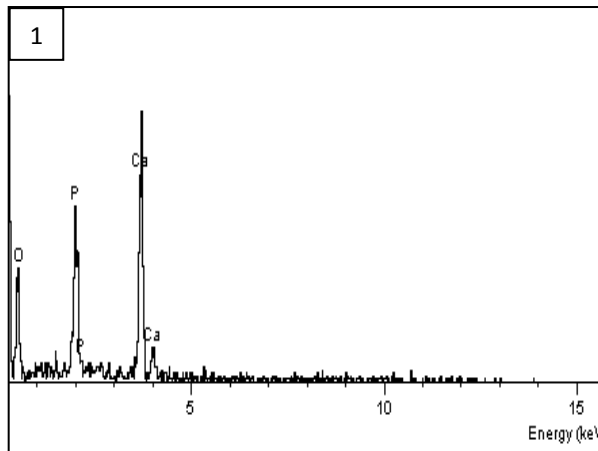
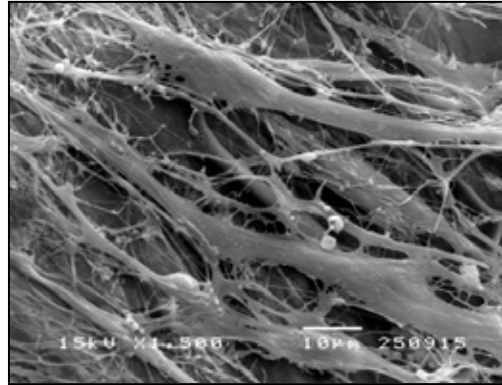
### ภาคผนวก ญ

การวิเคราะห์ธาตุบนกระดูกมนุษย์ และกระดูกมนุษย์ที่ได้รับตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอิน/เจลาตินหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ในอาหาร OM ที่ระยะเวลา 28 วัน สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)



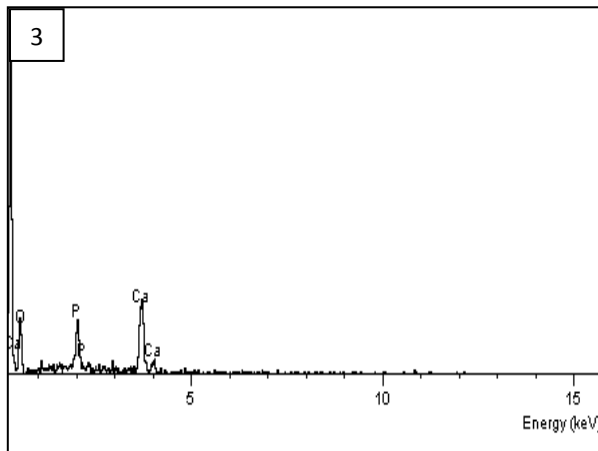
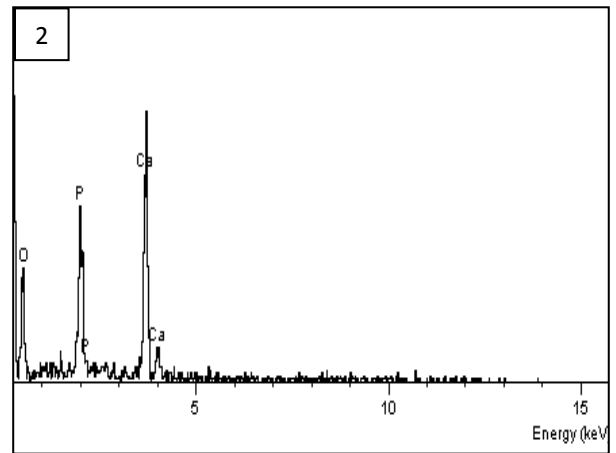
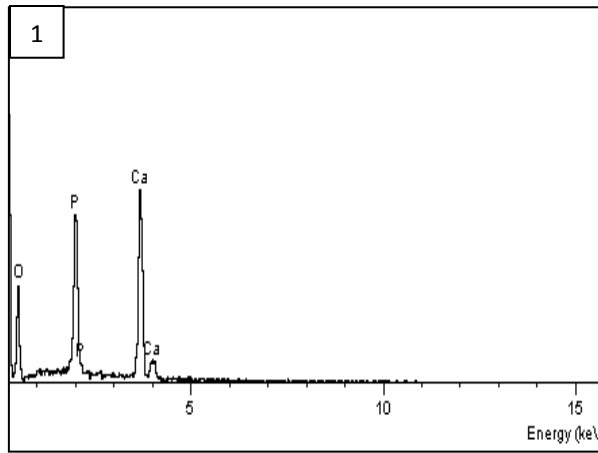
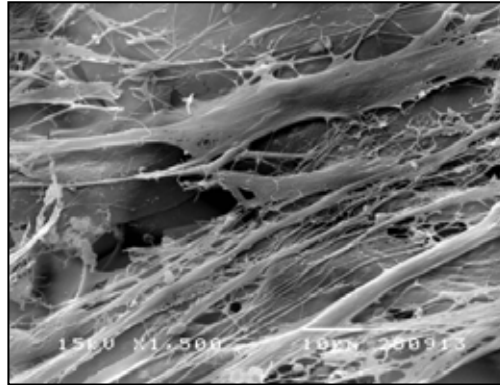
ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ในอาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	45	57	48
P	13	11	18
Ca	42	32	34

รูปที่ ญ.1 กระดูกมนุษย์ (hBONE)



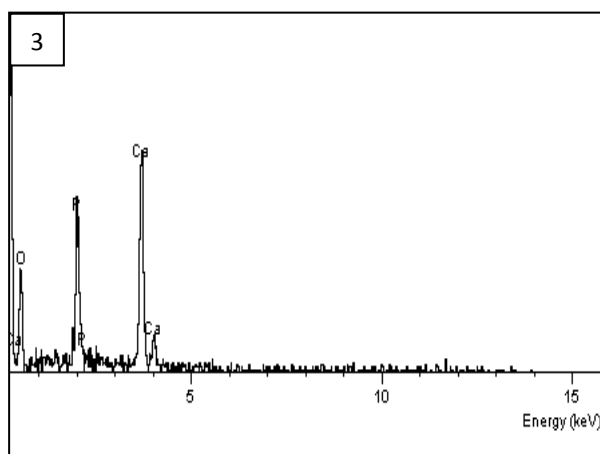
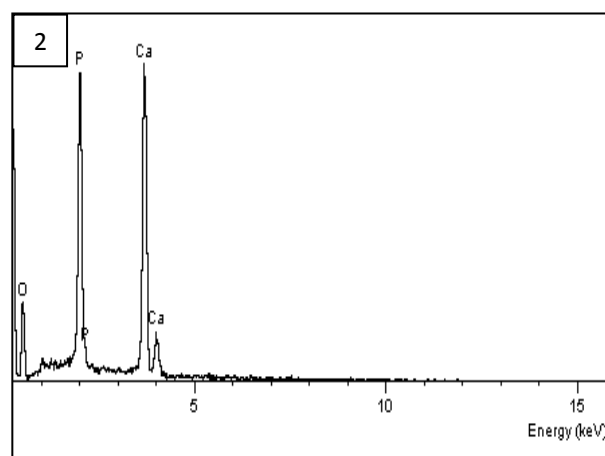
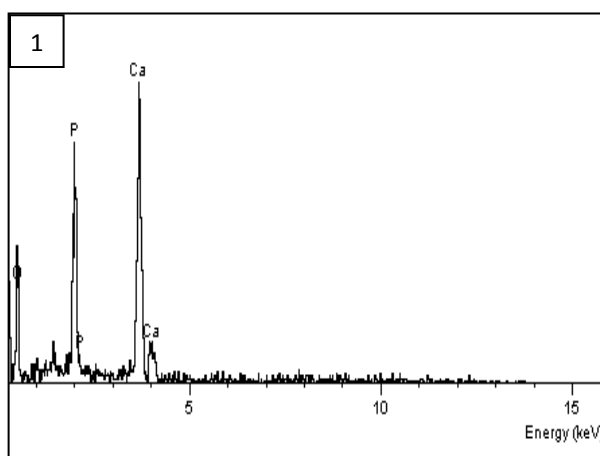
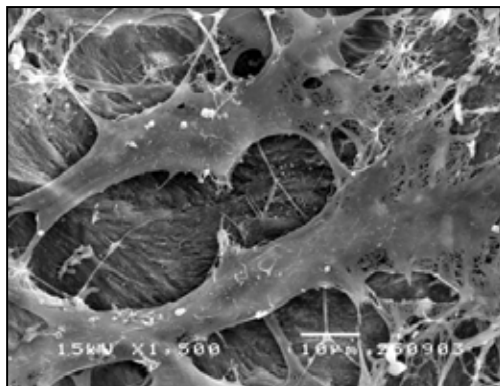
ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ในอาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	22	49	38
P	21	12	18
Ca	57	39	44

รูปที่ ๒ ๓. กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการตัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 1% โดยน้ำหนัก (1%SF50G50)



ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการเพาะเลี้ยง เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ในอาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	33	27	25
P	20	12	21
Ca	47	61	54

รูปที่ ๓.3 กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 2% โดยน้ำหนัก (2%SF50G50)



ธาตุ	ปริมาณธาตุบนตัวอย่างหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู ในอาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	3
O	17	19	28
P	16	10	14
Ca	67	71	58

รูปที่ ๔. ๔ กระดูกมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน อัตราส่วน 50/50 ความเข้มข้นของสารละลายผสม 4% โดยน้ำหนัก (4%SF50G50)



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรุ่งนภา วรรณภักดิ์ เกิดวันที่ 8 ตุลาคม พ.ศ. 2529 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย ในปีการศึกษา 2547 จากโรงเรียนหอวัง กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต 2551 จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2551 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

### ผลงานวิจัยที่มีการนำเสนอในการประชุมวิชาการนานาชาติ

- Vorrapakdee R., Kanokpanont S., Waikakul S., Charoenlap C., Damrongsakkul S. "Effects of Thai Silk Fibroin/Gelatin on Human Cancellous Bone" 4th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, National University of Singapore (NUS), Singapore, 15-16 December 2010
- Vorrapakdee R., Kanokpanont S., Charoenlap C., Damrongsakkul S. "Modification of Cancellous Bone using Thai Silk Fibroin and Gelatin" The 17<sup>th</sup> Regional Symposium on Chemical Engineering, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 22-23 November 2010