

การตรึงโอพีเอ็มบนพอลิแอคริลิกแอซิดบรัชที่กราฟต์บนพื้นผิวเพื่อส่งเสริม
การยึดติดและการเจริญของเซลล์กระดูก

OPN IMMOBILIZATION ON SURFACE-GRAFTED POLY(ACRYLIC ACID)
BRUSHES TO PROMOTE OSTEOBLAST ADHESION/PROLIFERATION



โดย

นางสาว พนิษฐา ดำส่งแสง

นางสาว ออหทัย จิระรัตน์โพธิ์ชัย

ภาควิชาเคมี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง การตั้งโอพีเอ็นบนพอลิแคคลิกแอซิดบรัชที่กราฟต์บนพื้นผิวเพื่อส่งเสริมการยึดติดและการเจริญของเซลล์กระดูก

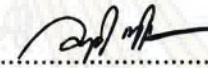
โดย นางสาวพณิฏฐา คำส่งแสง และ นางสาวอหทัย จิระรัตนโพธิ์ชัย

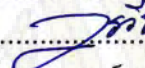
ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

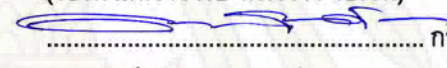
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


คณะกรรมการสอบโครงการ


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิรี โฮเวน)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี
วัน 22 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2558

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การตรึงโอพีเอ็นบนพอลิแอคริลิกแอซิดบรัชที่กราฟบนพื้นผิวเพื่อส่งเสริมการยึดติดและการเจริญของเซลล์กระดูก

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวพนิษฐา คำส่งแสง เลขประจำตัว 5433119323

นางสาวอหทัย จิระรัตนโพธิ์ชัย เลขประจำตัว 5433157123

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้กราฟต์พอลิแอคริลิกแอซิด (PAA) บรัช บนผิวกระจกโดยอาศัยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวผ่านกลไกแบบ Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) ผลการวิเคราะห์ PAA ที่เกิดขึ้นในสารละลายด้วยเทคนิคโปรตอน-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์แสดงให้เห็นว่าสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้ดี จากนั้นตรึงโปรตีนออสติโอพอนติน (OPN) ลงบนพื้นผิวที่กราฟต์ด้วย PAA บรัช โดยใช้ EDC/NHS เป็นตัวรีเอเจนต์คู่ควบ ยืนยันการดัดแปรพื้นผิวกระจกแต่ละขั้นตอนโดยการวัดมุมสัมผัสของน้ำและเทคนิคฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอ็กซ์เรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโทรสโกปี (XPS) แสดงให้เห็นว่าปริมาณการตรึง OPN บนพื้นผิวที่กราฟต์ด้วย PAA ขึ้นกับความเข้มข้นของ OPN ในสารละลาย จากการทดลองพบว่าตัวกลางชนิด OM เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกชนิด MC-3T3-E1 เนื่องจากช่วยส่งเสริมให้เกิดการยึดติดและการเจริญของเซลล์ การวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) ซึ่งให้ผลการแสดงออกของยีนชนิดต่างๆ ได้แก่ คอลลาเจน I (Coll I), อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP), octamer-binding transcription factor 4 (Oct 4), NANOG และ Reduced expression 1 (REX1) ขึ้นกับปริมาณของ OPN ที่ตรึงบนพื้นผิว นำมาซึ่งสมมุติฐานที่ว่าโครงสร้างของ OPN ที่ตรึงบนพื้นผิวอาจจะเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของ OPN ในสารละลายที่ใช้ในการตรึง โดยสรุปแล้วงานวิจัยนี้ได้แสดงถึงศักยภาพในการนำ OPN ไปประยุกต์ใช้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

คำสำคัญ: พอลิแอคริลิกแอซิดบรัช, โอพีเอ็น, เซลล์กระดูก, กระดูก, การแสดงออกของยีน

Title OPN Immobilization on Surface-grafted Poly(acrylic acid) Brushes to Promote Osteoblast Adhesion/Proliferation

Student name Miss Panitha Damsongsang ID 5433119323

Miss Orhathai Jirattanapochai ID 5433157123

Advisor Assoc. Prof. Dr. Voravee P. Hoven

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Academic Year 2014

Abstract

In this research, glass substrates were grafted with poly(acrylic acid) (PAA) brushes via surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. ^1H NMR analysis of PAA formed in solution indicated that the polymerization was well-controlled. Osteopontin (OPN) was then immobilized on the surface-grafted PAA brushes using EDC/NHS as coupling agents. Stepwise surface modification was verified by water contact angle measurements and FT-IR. Analysis by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) suggested that the amount of immobilized OPN on the surface-grafted PAA brushes was concentration-dependent. Osteogenic Medium (OM) was found to be an appropriate media for culturing MC-3T3-E1 cells in that it can promote cell adhesion and differentiation. Polymerase chain reaction (PCR) analysis indicated that expression of the following genes, namely collagen I (Coll I), alkaline phosphatase (ALP), octamer-binding transcription factor 4 (Oct 4), NANOG and Reduced expression 1 (REX1) was dose-dependent implying that the structure of immobilized OPN may be varied as a function of its concentration in solution used for immobilization. Overall, this research has demonstrated that OPN can potentially be used for bone tissue engineering applications.

Keywords: poly(acrylic acid) brushes, OPN, osteoblast, bone, gene expression

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคือรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ เพื่อให้การเขียนรายงาน senior project สำเร็จลุล่วงด้วยดี ตลอดจน แนะนำเทคนิคการนำเสนอโครงการวิจัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ทันทแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และนางสาวนันทวรรณ เหาวโรจน์ ตลอดจนนิสิตปริญญาโทและเอกในกลุ่มงานวิจัยของศาสตราจารย์ ทันทแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ ที่ให้ความรู้ทางด้านชีววิทยาเกี่ยวกับผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์

ขอขอบคุณ นางสาวพรเพ็ญ แซ่อึ้ง นางสาววิไลพร ไกรสุวรรณ ตลอดจนนิสิตปริญญาโทและเอกในกลุ่มงานวิจัยของรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น ที่ให้ความรู้ในการใช้เครื่องมือตลอดจนแนะนำเทคนิคการนำเสนอโครงการวิจัย

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมีที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี รุ่น 80 ที่ให้กำลังใจในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจและอยู่เคียงข้างเสมอมา

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณะอาจารย์ทุกท่านในคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี ที่อบรมสั่งสอน ให้มีความรู้คู่คุณธรรม และสร้างแรงผลักดันให้เดินทางมาถึงจุดหมายในวันนี้ ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญรูปประกอบ	ช
สารบัญตารางประกอบ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 มูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 เครื่องมือ	9
2.2 วัสดุและสารเคมี	9
2.3 วิธีการทดลอง	11
2.3.1 การกราฟต์พอลิแอสคริลิกแอซิดบนแผ่นกระจก	11
2.3.1.1 การติด APTES ลงบนแผ่นกระจก	11
2.3.1.2 การติด Initiator ลงบนแผ่นกระจกที่ติด APTES	11
2.3.1.3 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอสคริลิกแอซิด	12
2.3.2 การตรึงโอพีเอ็นบนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอสคริลิกแอซิด	13
2.3.3 การกราฟต์ด้วยพอลิแอสคริลิกแอซิดบนอนุภาคซิลิกา	14
2.3.3.1 การติด APTES ลงบนซิลิกา	14
2.3.3.2 การติด Initiator ลงบนอนุภาคซิลิกาที่ติด APTES	14
2.3.3.3 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอสคริลิกแอซิด	14
2.3.4 การติด OPN บนอนุภาคซิลิกาที่กราฟต์ด้วยพอลิแอสคริลิกแอซิด	14
2.3.5. การทดสอบผลการเพาะเลี้ยงเซลล์	14
2.3.5.1 การเลี้ยงเซลล์	14
2.3.5.2 การเพาะเซลล์บนแผ่นกระจก	14
2.3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธี อาร์ทีพีซีอาร์	15
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	
3.1 การสังเคราะห์ polyacrylic acid (PAA) บนแผ่นกระจกผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization	16
3.2 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวบนแผ่นกระจกและอนุภาคซิลิกา	18
3.3 การตรึง OPN ลงบนพอลิแอสคริลิกแอซิด	22
3.4 การตอบสนองของเซลล์ MC-3T3-E1 บนแผ่นกระจกที่ตรึง OPN	24
3.4.1 การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation)	24
3.4.2 การทดสอบการแสดงออกของยีน (gene expression)	29
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38
ประวัติผู้วิจัย	40

สารบัญญรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 การตัดแปรรูปผิวไททาเนียมด้วยการกราฟต์ poly(OEGMA-r-HEMA) และตรึง Fibronectin (FN) และ recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)	1
1.2 ขั้นตอนการตัดแปรรูปผิวของไททาเนียมด้วยการกราฟต์ไฮโดรเจลบนพื้นผิว	2
1.3 การตรึง OPN บนแผ่นฟิล์มของ polyHEMA ด้วยพันธะเอไมด์	3
1.4 การยึดเกาะและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ MG63 บน A) พื้นผิวของ PMAA brushes, B) พื้นผิวของหมู่ RGD ที่ถูกตรึงบน PMAA brushes, C) พื้นผิวของ PMAA ที่ต่อเพิ่มจากการตรึงเพปไทด์ RGD	4
1.5 ขั้นตอนการตรึงโปรตีน green fluorescent protein (eGFP) และ coral derived red fluorescent protein (DsRed) ลงบนพื้นผิว MacroporousPolyHIPE ที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิด	5
1.6 ขั้นตอนการกราฟต์พอลิแอคริลิกแอซิดบรัชลงบนอนุภาคนาโนซิลิกา ซึ่งเป็นปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวโดยปฏิกิริยา RAFT polymerization	6
1.7 การตรึงโปรตีน streptavidin (SA) บนพื้นผิวของพอลิแอคริลิกแอซิดบรัชที่กราฟต์ลงบนอนุภาคนาโนซิลิกา พบว่าสามารถตรึงโปรตีนได้มากกว่าแบบมอนอเลเยอร์ถึง 60 เท่า	6
1.8 ขั้นตอนการเตรียมแพทเทิร์นโปรตีนโดยใช้พอลิแอคริลิกแอซิดบรัชเพื่อตรึงโปรตีน	7
3.1 สมการแสดงการสังเคราะห์ PAA ในสารละลายด้วย RAFT polymerization	16
3.2 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ PAA ก่อน (Crude) และหลัง (Pure) การทำให้บริสุทธิ์โดยการ Dialysis โดยใช้ความเข้มข้น acrylic acid 1 M และ CTA : Initiator เป็น 4 : 1 และทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเป็นเวลา 20 ชั่วโมง	17
3.3 สมการแสดงการติด APTES ลงบนแผ่นกระจก	19
3.4 สมการแสดงการติด 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) ลงบนแผ่นกระจกที่ผ่านการติด APTES	19
3.5 สมการแสดงปฏิกิริยาการกราฟต์ PAA บนพื้นผิวกระจก	19
3.6 FT-IR สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิลิกา: a) SiO ₂ /Si-OH b) SiO ₂ /Si-APTES c) SiO ₂ /Si-initiator d) SiO ₂ /Si-PAA และ e) SiO ₂ /Si-PAA-OPN	21
3.7 สมการการตรึง OPN บนบนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดบรัช	22
3.8 แสดงผลการทดสอบ Cell Proliferation ที่เวลา A) 24 ชั่วโมง B) 3 วัน ใน Growth medium	26
3.9 แสดงผลการทดสอบ Cell Proliferation ที่เวลา 3 วันใน osteogenic medium (OM)	28
3.10 ปริมาณยีนต่างๆ ที่เซลล์ MC-3T3-E1 แสดงออกมาในเวลา 7 วัน บนพื้นผิวแผ่นกระจกเปล่า แผ่นกระจกที่ติด PAA แผ่นกระจกที่ตรึง OPN ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml	30
3.11 แสดงปริมาณยีน NANOG ที่เซลล์แสดงออกมาบนพื้นผิวต่างๆ	31
3.12 แสดงปริมาณยีน REX1 ที่เซลล์แสดงออกมาบนพื้นผิวต่างๆ	32
3.13 แสดงปริมาณยีน OCT4 ที่เซลล์แสดงออกมาบนพื้นผิวต่างๆ	33
3.14 แสดงปริมาณยีน Coll I ที่เซลล์ปลดปล่อยออกมาบนพื้นผิวต่างๆ	34
3.15 แสดงปริมาณยีน ALP ที่เซลล์ปลดปล่อยออกมาบนพื้นผิวต่างๆ	35

สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
3.1 Chemical shift ของ PAA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$	17
3.2 ค่ามุมสัมผัสนบนแผ่นกระจกหลังจากทำปฏิกิริยาต่างๆ	20
3.3 เปอร์เซนต์ประกอบของธาตุนบนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอสไตรคและตริงด้วย OPN ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเทคนิค XPS	23



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

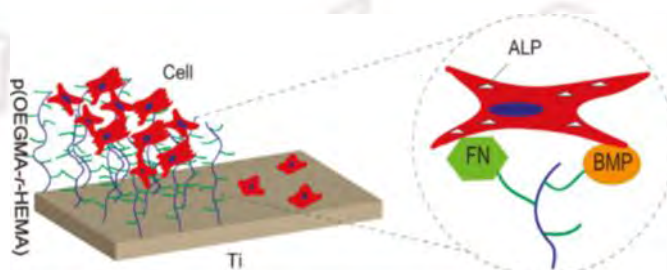
บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจ

ทันตกรรมรากเทียมเป็นหนึ่งในวิธีการรักษาบูรณะฟัน หลังการสูญเสียฟันตามธรรมชาติ ซึ่งมีวิธีการคือการฝังวัสดุที่มีรูปร่างคล้ายรากฟันลงบนกระดูกขากรรไกร เพื่อใช้เป็นหลักสำหรับการยึดเกาะของฟันเทียมในช่องปากทั้งชนิดถอดได้ เพื่อให้ฟันเทียมมีความมั่นคงที่ดีหรือใช้เป็นหลักสำหรับการใส่ครอบฟัน ซึ่งทำให้การใส่ฟันนั้นมีสภาวะที่คล้ายธรรมชาติ วัสดุที่นิยมนำมาทำเป็นรากเทียม คือไททาเนียมซึ่งมีสมบัติที่เข้ากันได้กับร่างกาย มีความแข็งแรง ไม่กระตุ้นกระบวนการอักเสบของเนื้อเยื่อ และไม่เกิดผลข้างเคียงใดๆ แต่อย่างไรก็ตามวัสดุไททาเนียมนั้นยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการเจริญของเซลล์กระดูกเข้าสู่ผิวรากเทียมเจริญได้ไม่ดีนัก ส่งผลให้วัสดุรากเทียมมีขนาดไม่พอดีกับช่องว่างที่ฝังและมีอายุการใช้งานสั้น [1] ซึ่งการฝังวัสดุไม่ได้ขึ้นกับการเจริญของเซลล์กระดูกเข้าสู่ผิวรากเทียมเท่านั้น แต่ขึ้นกับการเกิดหลอดเลือดใหม่ในกระดูกที่ฝังวัสดุอีกด้วย [2] ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปรพื้นผิวของไททาเนียมเพื่อใช้พัฒนาประสิทธิภาพของวัสดุรากเทียม ได้แก่

ในปี ค.ศ. 2009, Raynor และคณะ [3] ได้ทำกราฟต์ poly(2-gluconamidoethyl methacrylate) ลงบนไททาเนียมโดยผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวด้วยกลไกแบบอะตอมทรานส์เฟอร์เรดิคัลพอลิเมอไรเซชัน (surface-initiated atom-transfer radical polymerization; SI-ATRP) ก่อนตรึงเพปไทด์ที่มีลำดับกรดแอมิโนเป็น GFOGER ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่ช่วยให้เซลล์กระจายได้ดีขึ้น (Well-spread cells) จากการทดลองพบว่าพื้นผิวไททาเนียมที่ถูกดัดแปรด้วยการตรึงโปรตีน GFOGER ช่วยให้เซลล์ MC-3T3-E1 เกิดการกระจายตัวและยึดเกาะได้ดีกว่าพื้นผิวไททาเนียมที่ไม่ดัดแปร

ในปี ค.ศ. 2011, Ren และคณะ [4] ได้ดัดแปรพื้นผิวของไททาเนียมเพื่อกระตุ้นการเจริญของเซลล์กระดูกเข้าสู่ผิววัสดุรากเทียม โดยการกราฟต์โคพอลิเมอร์แบบสุ่มของ poly(oligo(ethylene glycol)methacrylate-r-hydroxyethyl methacrylate) (poly(OEGMA-r-HEMA)) ลงบนพื้นผิว โดยผ่านปฏิกิริยา SI-ATRP จากนั้นจึงทำปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันกับ succinic anhydride เพื่อเปลี่ยนหมู่ข้างที่เป็นไฮดรอกซิลของโคพอลิเมอร์เป็นคาร์บอกซิล ก่อนนำไปตรึงด้วย Fibronectin (FN) และ recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) ซึ่งโปรตีนทั้งสองจะช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์ MC-3T3 บนพื้นผิวได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเพิ่ม alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นให้เซลล์ MC-3T3 เกิดกระบวนการ differentiation ไปเป็นเซลล์กระดูกได้ (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 การดัดแปรพื้นผิวไททาเนียมด้วยการกราฟต์ poly(OEGMA-r-HEMA) และตรึง Fibronectin (FN) และ recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) [4]

ในปี ค.ศ. 2014, Muir และคณะ [5] ได้ดัดแปรพื้นผิวของไททาเนียม โดยจะทำ grit-blasting ด้วย $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของไททาเนียม ก่อนทำปฏิกิริยากับ 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (TMSPM) เพื่อสร้างพันธะ Si-O-Si บนพื้นผิวของ SiO_2 และทำให้พื้นผิวมีหมู่เมทาคริเลต ตามด้วยการกราฟต์ไฮโดรเจลที่เตรียมโดยกระบวนการ photopolymerization จาก poly(ethylene glycol)-dimethacrylate (PEG-DMA) หรือ poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (PHEMA) เป็น single network หรือ poly(ethylene glycol)diacrylate ร่วมกับ poly(acrylic acid) เป็น semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) ชนิด PEG/PAA โดยไฮโดรเจลจะทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมระหว่างไททาเนียม 2 แผ่น ซึ่งพบว่าไฮโดรเจลที่เตรียมได้ทั้งหมดมีเสถียรภาพสูงเมื่ออยู่ในน้ำ และไฮโดรเจลที่เตรียมจาก PEG-DMA สามารถยึดอยู่บนพื้นผิวได้แข็งแรงที่สุด คณะผู้วิจัยคาดว่ากระบวนการเตรียมไฮโดรเจลที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์กับการเตรียมไฮโดรเจลชนิดอื่นที่สามารถประยุกต์ใช้ในการรักษาแผล การควบคุมการปลดปล่อยยา หรือโครงพวงเนื้อเยื่อต่อไปได้ (รูปที่ 1.2)

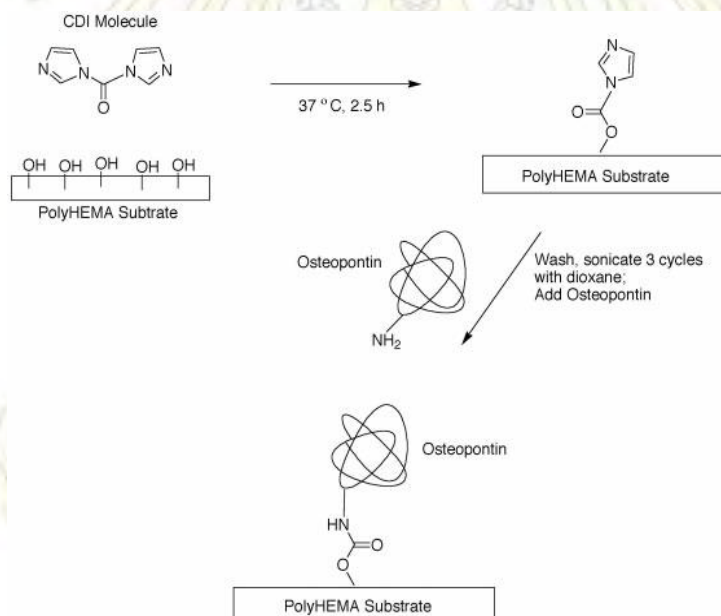


รูปที่ 1.2 ขั้นตอนการดัดแปรพื้นผิวของไททาเนียมด้วยการกราฟต์ไฮโดรเจลบนพื้นผิว [5]

ในปี ค.ศ. 2014, Kim และคณะ [6] ได้ดัดแปรพื้นผิวของไททาเนียมโดยการกราฟต์เฮพาริน (heparin) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีหน่วยซ้ำเป็นไกลโคซามิโนไกลแคนที่มีหมู่ซัลเฟตอยู่จำนวนมาก เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสามารถในการจับ growth factor หลายชนิด เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) ผ่านการเกิดพันธะเอไมด์ด้วยการใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลของเฮพาริน จากนั้นจึงทำการตรึง bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นกระบวนการ differentiation ของเซลล์ mesenchymal stem cells (MSCs) ไปเป็นเซลล์ osteoblast ลงบนพื้นผิวไททาเนียมที่ติดด้วยเฮพารินโดยแรงระหว่างประจุลบของเฮพารินและประจุบวกของ BMP-2 จากการศึกษาพบว่า BMP-2 สามารถปลดปล่อยออกมาจากพื้นผิวแบบควบคุมโดยไม่เกิด burst release เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ MG-63 พบว่าส่งเสริมการเกิด proliferation การเพิ่มขึ้นของระดับของ ALP activity และ calcium deposition รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของระดับของยีน osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN) แสดงให้เห็นการส่งเสริมการเกิด osteogenic differentiation ของเซลล์ osteoblast

โอพีเอ็น หรือ Osteopontin (OPN) เป็นโปรตีนที่มีสมบัติช่วยการยึดเกาะของเซลล์กับสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ดีขึ้นและมีบทบาทช่วยซ่อมแซมร่างกายบริเวณที่ติดเชื้และที่ได้รับบาดเจ็บกระตุ้นการเจริญของเซลล์กระดูก (osteoblast) และช่วยสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ทั้งนี้ OPN เป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโน 3 ชนิดเรียงต่อกันอยู่ในโครงสร้าง ได้แก่ อาร์จินีน (arginine), ไกลซีน (glycine) และกรดแอสพาติก (aspartic acid) (RGD) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงกับ $\alpha_3\beta_1, \alpha_2\beta_1, \alpha_1\beta_1$ ที่อยู่บนผิวเซลล์เรียกว่า อินเทกริน (integrin) [7] ด้วยเหตุนี้ทำให้ OPN ช่วยส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์ได้ดีการตรึง OPN บนพื้นผิววัสดุรากเทียมจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการใช้งานของวัสดุรากเทียมในการส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์กระดูก ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึง OPN บนพื้นผิววัสดุต่างๆ ได้แก่

ในปี ค.ศ. 2003, Martin และคณะ [7] เตรียมแผ่นฟิล์มของ poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (polyHEMA) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ข้างของทุกๆหน่วยซ้ำตลอดสายโซ่ของพอลิเมอร์เพื่อตรึง OPN โดยใช้ 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) เป็นตัวกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลให้ตรึง OPN ได้ด้วยพันธะเอไมด์ ซึ่งใช้เป็นแบบจำลองเบื้องต้นเพื่อทดสอบการเจริญของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของวัว (รูปที่ 1.3) จากนั้นนำไปทดสอบการเจริญของเซลล์ พบว่า OPN สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้ และวัสดุแบบจำลองดังกล่าวสามารถใช้ศึกษาการเจริญของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



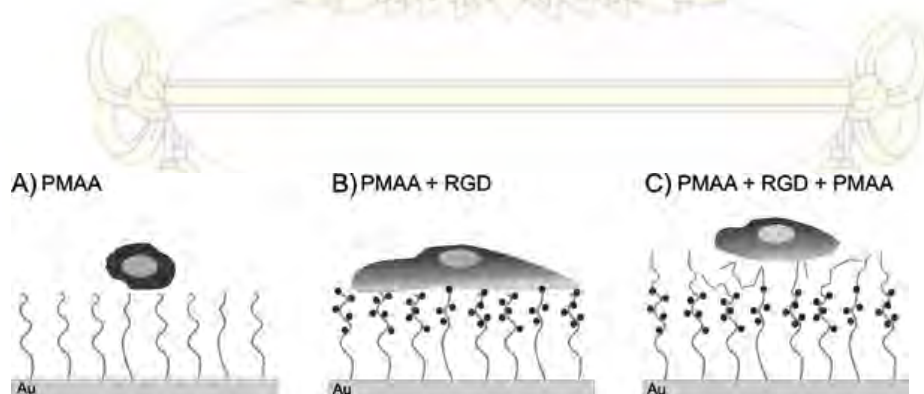
รูปที่ 1.3 การตรึง OPN บนแผ่นฟิล์มของ polyHEMA ด้วยพันธะเอไมด์ [7]

ในปี ค.ศ. 2004, Liu และคณะ [8] ได้ศึกษาการเรียงตัวของ OPN ซึ่งถูกดูดซับทางกายภาพบนผิวที่เป็นโมเลกุลชั้นเดี่ยว (monolayer) ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ได้แก่ หมู่เอมิโน (-NH₂), คาร์บอกซิล (-COOH), เมทิล (-CH₃) และไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งได้จากการกราฟต์ 1-undecanethiol ([HS(CH₂)₁₀CH₃]), 10-mercaptoundecanoic acid ([HS(CH₂)₁₀COOH]), 11-amino-1-undecanethiol ([HS(CH₂)₁₁NH₂]), 11-mercapto-1-undecanol ([HS(CH₂)₁₀OH]) ตามลำดับ บนผิวของทองด้วยการเกิด self-assembled monolayers (SAMs) จากนั้นจึงนำวัสดุที่ดูดซับ OPN ไปศึกษาการเจริญของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของวัว (Bovine-aortic endothelial cell) พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้บน OPN ที่ถูกดูดซับบนพื้นผิวของหมู่เอมิโน, คาร์บอกซิล เนื่องจากการเรียงตัวของ OPN บนพื้นผิวดังกล่าว ได้หันหมู่ RGD ออกมาภายนอก ในขณะที่เซลล์ไม่สามารถเจริญได้เลยบนพื้นผิวที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลและเซลล์สามารถเจริญได้แต่ OPN เสียสภาพไปบนพื้นผิวที่เป็นหมู่เมทิล

ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำมาตรึงสารชีวโมเลกุลหรือโปรตีนต่างๆ เนื่องจากพอลิเมอร์มีปริมาณหมู่ฟังก์ชันเป็นจำนวนมากต่อพื้นที่ ทั้งยังมีความสามารถในการบวมตัว (swellability) และความยืดหยุ่นของโซ่พอลิเมอร์ (chain flexibility) [9] ทำให้สารชีวโมเลกุลหรือโปรตีนสามารถเข้าถึง (accessibility) โมเลกุลพอลิเมอร์ได้ง่าย ส่งผลให้การตรึงสารชีวโมเลกุลหรือโปรตีนทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) [10] เป็นวิธีการเตรียมพอลิเมอร์บนผิววัสดุ โดยมีปลายข้างหนึ่งของพอลิเมอร์ยึดติดกับพื้นผิวด้วยพันธะโควาเลนต์ได้เป็นพอลิเมอร์บรัช (polymer brushes) ซึ่งวิธีการนี้ให้เสถียรภาพในการติดพอลิเมอร์ดีกว่าการดูดซับทางกายภาพ ความหนาแน่นของการกราฟต์ (grafting density) สูง และสามารถควบคุมความยาวของสายโซ่ได้ดี [11] การที่พอลิเมอร์มีหน่วยซ้ำเป็นจำนวนมากอยู่ในสายโซ่ ทำให้มีปริมาณหมู่ฟังก์ชันที่จะใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อพื้นที่สูงตามไปด้วย ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้พอลิเมอร์บรัชในการเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดติดโปรตีน ได้แก่

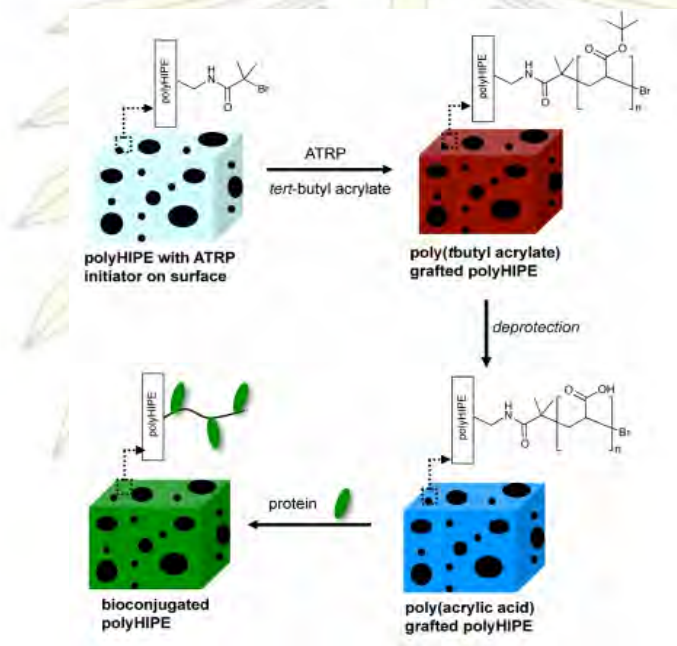
ในปี ค.ศ. 2008, Narvarro และคณะ [12] ได้สังเคราะห์ poly(methacrylic acid) (PMAA) brushes โดยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวแบบ photopolymerization และทำการกราฟต์บนพื้นผิวของทอง จากนั้นได้ทำการตรึงเพปไทด์ RGD แล้วนำไปศึกษาการยึดติดและรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ MG63 ซึ่งเป็นเซลล์กระดูกของมนุษย์ พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวที่ตรึงด้วยเพปไทด์ RGD ซึ่งอยู่บริเวณปลายสายของ PMAA ได้ดี แต่เมื่อทำการต่อสาย PMAA เพิ่มเข้าไปโดยที่เพปไทด์ RGD อยู่บริเวณตอนกลางของสาย PMAA ดังรูปที่ 1.4 พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะบนพื้นผิวได้ไม่ดีนักและเซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลมผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นความสำคัญของ RGD ในการส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์



รูปที่ 1.4 การยึดเกาะและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ MG63 บน A) พื้นผิวของ PMAA brushes, B) พื้นผิวของหมู่ RGD ที่ถูกตรึงบน PMAA brushes, C) พื้นผิวของ PMAA ที่ต่อเพิ่มจากการตรึงเพปไทด์ RGD [12]

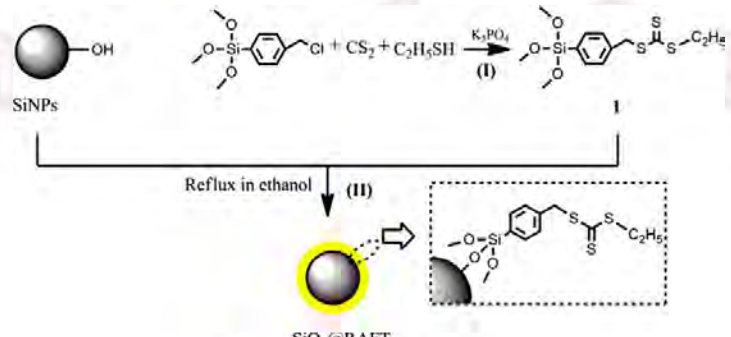
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปี ค.ศ. 2012, Audouin และคณะ [13] ได้ทำการกราฟต์พอลิแอคริลิกแอซิดบรัช (poly(acrylic acid) brushes) ลงบนพื้นผิวของ Macroporous Polymers Synthesized within High Internal Phase Emulsions (PolyHIPE) โดยเริ่มด้วยปฏิกิริยา activator regeneration by electron transfer-atom transfer radical polymerization (ARGET-ATRP) ของ tert-butyl acrylate เพื่อเตรียมเป็น poly(t-butyl acrylate) จากนั้นจึงทำปฏิกิริยา deprotection หมู่ t-butyl เพื่อเปลี่ยนเป็นพอลิแอคริลิกแอซิดบรัช และนำวัสดุดังกล่าวไปตรึง green fluorescent protein (eGFP) และ coral-derived red fluorescent protein (DsRed) โดยใช้ตัวกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลของพอลิแอคริลิกแอซิดเป็น EDC/sulfo-NHS (รูปที่ 1.5) ซึ่งวัสดุดังกล่าวมีประโยชน์อย่างมากในการนำไปใช้งานทางด้านการแยกผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (bioseparation)

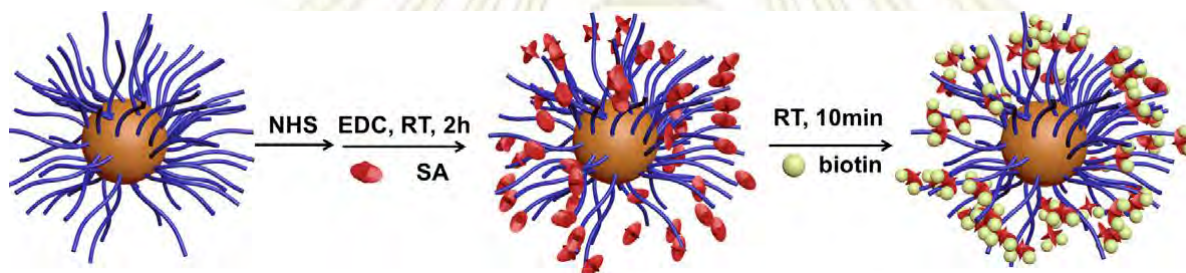


รูปที่ 1.5 ขั้นตอนการตรึงโปรตีน green fluorescent protein (eGFP) และ coral derived red fluorescent protein (DsRed) ลงบนพื้นผิว Macroporous PolyHIPE ที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิด [13]

ในปี ค.ศ. 2013, Qu และคณะ [14] ได้กราฟต์พอลิแอคริลิกแอซิดบรัชลงบนอนุภาคซิลิกาผ่านปฏิกิริยา Reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization (รูปที่ 1.6) โดยพบว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ดังกล่าวสามารถควบคุมน้ำหนักโมเลกุลและความหนาของพอลิเมอร์บรัชได้ดีจากนั้นจึงทำการตรึงโปรตีน streptavidin (SA) ด้วยพันธะเอไมต์ โดยอาศัยการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วย EDC/NHS ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีความจำเพาะต่อไบโอติน (รูปที่ 1.6) ได้ความหนาของพอลิแอคริลิกแอซิดบรัชบนอนุภาคเป็น 14.6-68.8 นาโนเมตรมีปริมาณคาร์บอกซิลบนพื้นผิวมากถึง 0.82-2.37 มิลลิโมลต่อกรัมและมีปริมาณการตรึงโปรตีน SA ได้สูงสุดถึง 2,600 ไมโครกรัมต่ออนุภาค 1 มิลลิกรัม ซึ่งพบว่าการกราฟต์พอลิแอคริลิกแอซิดบรัชบนอนุภาคซิลิกาสามารถตรึงโปรตีนได้มากกว่าการกราฟต์สายโซ่ยาวที่มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่ที่ตำแหน่งเฉพาะปลายสายซึ่งเป็นการกราฟต์แบบมอนอเลเยอร์ถึง 60 เท่า (รูปที่ 1.6)

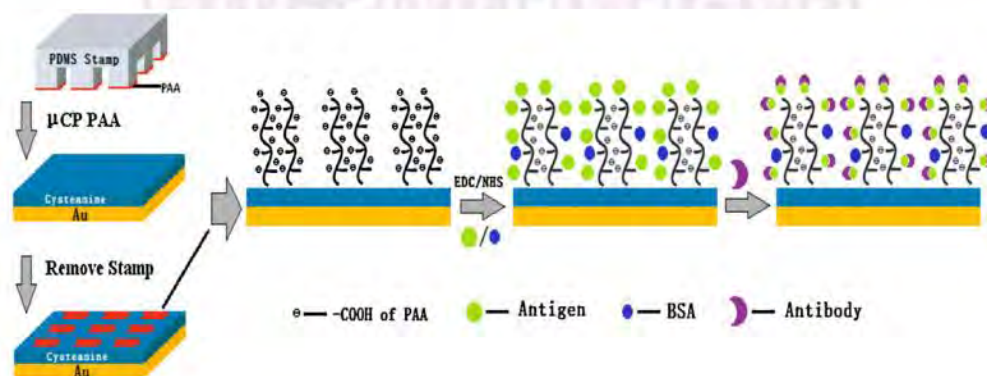


รูปที่ 1.6 ขั้นตอนการกราฟต์พอลิแอสคริลิกแอสซิดบรัชลงบนอนุภาคนาโนซิลิกา ซึ่งเป็นปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว โดยปฏิกิริยา RAFT polymerization [14]



รูปที่ 1.7 การตรึงโปรตีน streptavidin (SA) บนพื้นผิวของพอลิแอสคริลิกแอสซิดบรัชที่กราฟต์ลงบนอนุภาคนาโนซิลิกา พบว่าสามารถตรึงโปรตีนได้มากกว่าแบบมอนอเลเยอร์ถึง 60 เท่า [14]

ในปี ค.ศ. 2013, Wang และคณะ [15] ได้เตรียมแพทเทิร์นของโปรตีน (protein patterning) โดยทำการเตรียมพื้นผิวสำหรับการทำแพทเทิร์นโปรตีนโดยวิธี microcontact printing (μ CP) แล้วทำการกราฟต์พอลิแอสคริลิกแอสซิดลงบนพื้นผิวของ จากนั้นจึงนำไปตรึง human immunoglobulin G (H-IgG) และ goat anti-H-IgG (G-H-IgG) ซึ่งเป็นแอนติเจนและแอนติบอดีในร่างกายมนุษย์ ตามลำดับ ไปที่หมู่คาร์บอกซิลของพอลิแอสคริลิกแอสซิดด้วยการเกิดพันธะเอไมด์ (รูปที่ 1.8) ซึ่งวัสดุดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นวัสดุตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) หรือ protein microarrays ทั้งนี้ในขั้นตอนการตรึงแอนติเจนมีการเติม bovine serum albumin (BSA) เป็น blocking agent เพื่อทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลที่เหลือในโซ่ของพอลิแอสคริลิกแอสซิดด้วย



รูปที่ 1.8 ขั้นตอนการเตรียมแพทเทิร์นโปรตีนโดยใช้พอลิแอคริลิกแอซิดบรัชเพื่อตรึงโปรตีน [15]

งานวิจัยนี้จะใช้ OPN ในการตัดแปรพื้นผิววัสดุที่จะนำไปทำเป็นรากเทียม โดยมีสมมุติฐานว่า OPN ที่ตรึงบนวัสดุจะช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์กระดูก (osteoblast) และช่วยสร้างหลอดเลือดใหม่ ทั้งนี้จากการสืบค้นงานวิจัยยังไม่พบรายงานการตรึงโปรตีน OPN บนวัสดุเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวมาก่อน และจากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการตัดแปรวัสดุด้วยพอลิเมอร์บรัชช่วยเพิ่มปริมาณหมู่ฟังก์ชันต่อพื้นที่ในการตรึงโปรตีนได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจตัดแปรพื้นผิวของวัสดุด้วยการกราฟต์พอลิเมอร์บรัชของพอลิแอคริลิกแอซิดหรือพีเอเอ (poly(acrylic acid); PAA) ซึ่งในโครงสร้างประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลเป็นจำนวนมาก [14] เหมาะแก่การใช้ตรึงโปรตีนที่มีหมู่แอมิโน (NH₂) ด้วยพันธะเอไมด์ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวของตัวกลไกแบบ RAFT polymerization จากนั้นจึงทำการตรึง OPN บนพื้นผิวโดยอาศัยการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลซึ่งเป็นหมู่ข้างของทุก ๆ หน่วยซ้ำตลอดสายโซ่ของ PAA ด้วย N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride/ N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS) ในงานวิจัยนี้จะใช้แผ่นกระจกเป็นแบบจำลองของวัสดุในการกราฟต์ด้วย PAA และตรึงด้วย OPN จากนั้นจึงนำไปศึกษาการตอบสนองของเซลล์ MC-3T3-E1 ที่เป็นเซลล์อ่อนของการสร้างเซลล์กระดูกของหนู [3] ซึ่งมีสมบัติคล้ายเซลล์กระดูกของมนุษย์ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการตัดแปรพื้นผิวไททานเนียมเพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัสดุเพื่อเป็นรากเทียมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์พอลิแอคริลิกแอซิดบรัชที่กราฟต์บนแผ่นกระจก ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวด้วยกลไกแบบ RAFT polymerization และตรึงด้วย OPN
2. ศึกษาการตอบสนองของเซลล์ MC-3T3-E1 บนแผ่นกระจกที่ใช้เป็นแบบจำลองเบื้องต้นที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดบรัชและตรึงด้วย OPN

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดบรัชและตรึงด้วย OPN เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ MC-3T3-E1

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือ

1. Hot plate-stirrer (PC-420D, CORNING)
2. Plasma cleaner (PDC-32G, Harrick Plasma)
3. Contact angle goniometer (model 200-F1, Rame-Hart, Inc.)
4. Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$) Spectrometer (Model Mercury-400, Varian)
5. Infrared Spectrometer (IR) (Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR)
6. Bio 1 D software

2.2 วัสดุและสารเคมี

1. แผ่นกระจก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 และ 18 มิลลิเมตร
2. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES)
3. 4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) (Initiator)
4. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)
5. 4-Dimethylaminopyridine (DMAP)
6. Acrylic acid (AA)
7. 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid (chain transfer agent, CTA)
8. Deionized Water
9. Ethanol
10. Toluene
11. Milli-Q Water
12. Acetone
13. Sterile phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4
14. Dimethylformamide (DMF)
15. Osteopontin (OPN)
16. Nitrogen gas
17. Silica particles
18. N-Hydroxysuccinimide (NHS)
19. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)
20. Sulfuric acid (H_2SO_4)
21. Hydrogen peroxide (H_2O_2)
22. α -Minimum Essential Medium (α -MEM)
23. Penicillin G sodium
24. Streptomycin sulfate
25. L-glutamine
26. Fetal Bovine Serum (FBS)

27. 0.25% Trypsin-EDTA
28. p-Nitrophenol phosphate (PNPP)
29. Trizol reagent
30. Agarose gel electrophoresis
31. Ethidium bromide
32. Streptomycin
33. Betaglycerophosphate
34. Dexamethasone
35. Reverse Transcription Kit: Improm-IITM Reverse Transcription system
36. PCR Kit

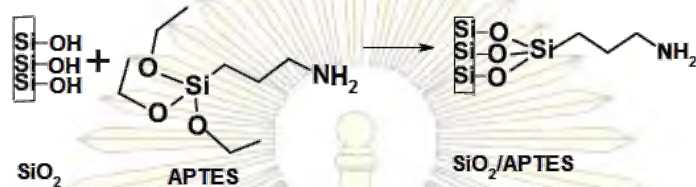


ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 วิธีการทดลอง

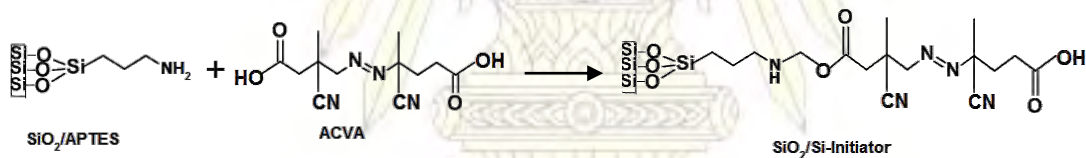
2.3.1 การกราฟต์พอลิแอสคริลิกแอซิดบรืซบนแผ่นกระจก

2.3.1.1 การติด APTES ลงบนแผ่นกระจก



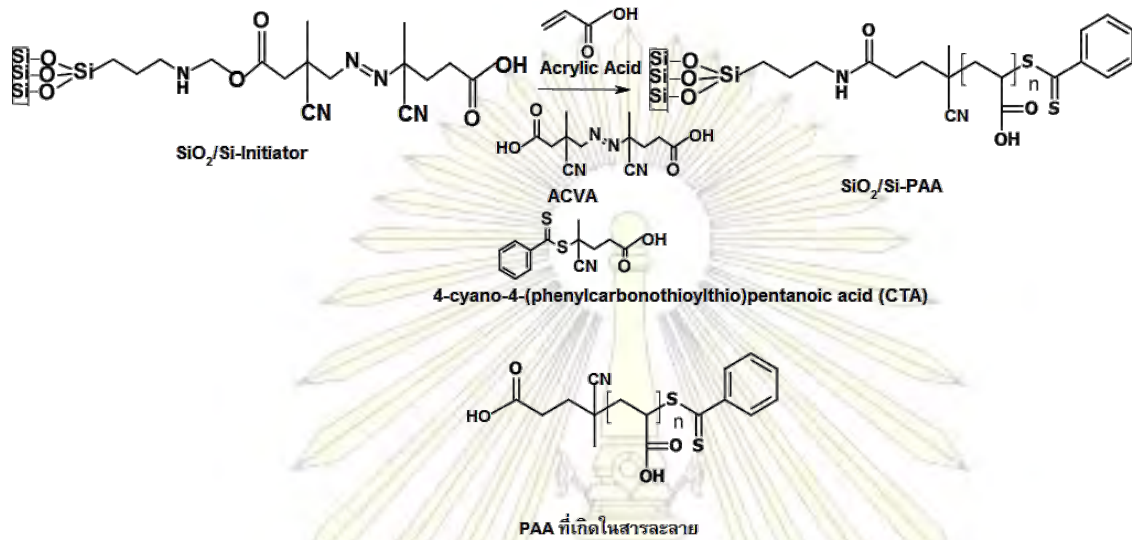
นำแผ่นกระจกเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 และ 18 มิลลิเมตร ไปทำความสะอาดทั้งสองด้านด้วยเครื่อง Plasma cleaner เป็นเวลาด้านละ 5 นาที นำแผ่นกระจกที่วางบน holder ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กที่บรรจุ APTES 150 ไมโครลิตร นำขวดแก้วที่มีแผ่นกระจกและ APTES ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำแผ่นกระจกที่ได้มาล้างด้วย toluene, acetone และ DI water เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน พิสูจน์เอกลักษณ์ของแผ่นกระจกโดยการวัดมุมสัมผัสของน้ำด้วยเครื่อง Contact angle goniometer

2.3.1.2 การติด Initiator ลงบนแผ่นกระจกที่ติด APTES



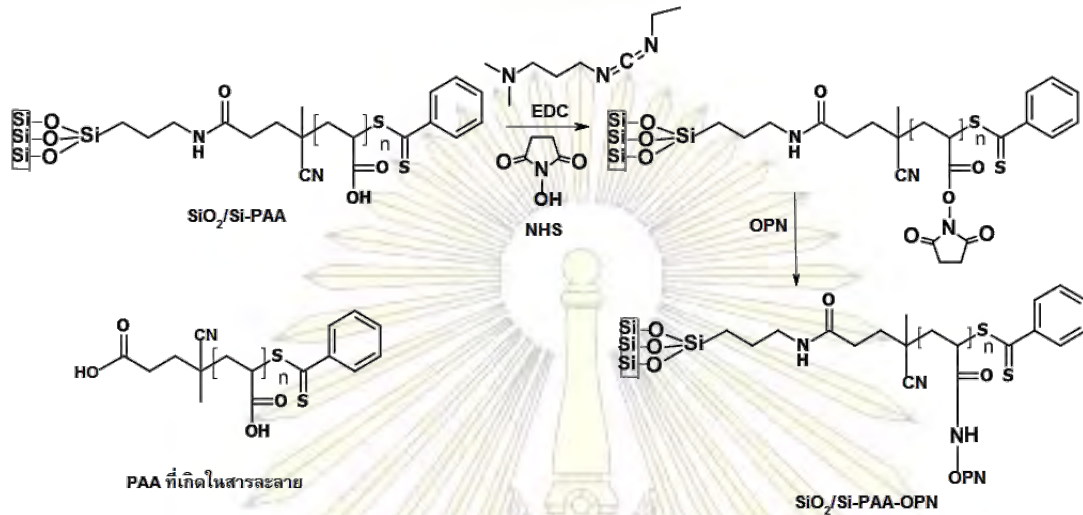
ซึ่ง 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) 0.21 กรัม (37.5 มิลลิโมล) ที่เป็นสารริเริ่มสำหรับปฏิกิริยา RAFT polymerization ซึ่ง N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.19 กรัม (37.5 มิลลิโมล) และ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 9.19 มิลลิกรัม (3.75 มิลลิโมล) เพื่อเป็นรีเอเจนต์คู่ควบ ในอัตราส่วนโดยโมลของ ACVA: DCC: DMAP = 1: 1: 0.1 ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีแท่งแม่เหล็กอยู่ ปิดด้วยจุกยางและรัดด้วยลวดทองแดง เติม DMF ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ syringe ลงในขวดแก้วเพื่อละลายสาร แล้วนำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พร้อมคนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก นำแผ่นกระจกจากขั้นตอน 2.3.1.1 วางบน holder แล้วใส่ในหลอดทดลองที่มีแท่งแม่เหล็ก ปิดด้วยจุกยางและรัดด้วยลวดทองแดง ถ่ายเทสารละลายที่เตรียมได้ลงในหลอดทดลองที่มีแผ่นกระจกโดยใช้ลวดนำพาสารละลาย (cannula) คนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กพร้อมผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ล้างแผ่นกระจกด้วย DMF และ ethanol เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน พิสูจน์เอกลักษณ์ของแผ่นกระจกที่ได้ด้วยการวัดมุมสัมผัสของน้ำด้วยเครื่อง Contact angle goniometer

2.3.1.3 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอคริลิกแอซิด



กราฟต์พอลิแอคริลิกแอซิดบนแผ่นกระจกโดยปฏิกิริยา RAFT polymerization เริ่มจากพื้นผิวของ acrylic acid (AA) โดยซึ่ง 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid 0.056 กรัม (0.20 มิลลิโมล) เป็นสารถ่ายโอนโซ่หรือ chain transfer agent (CTA) และ ซึ่ง ACVA 0.014 กรัม (0.050 มิลลิโมล) เป็นสารริเริ่ม ในอัตราส่วนโดยโมล CTA: ACVA = 4:1 ลงในหลอดทดลองที่มีแท่งแม่เหล็กอยู่ ใส่ Milli-Q water ลงในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ต้มจนเดือดแล้วทำให้เย็นด้วยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ผสม Milli-Q water กับ phosphate buffer solution (PBS) pH = 7.4 ความเข้มข้น 0.1 M โดยใช้ไมโครปิเปต ด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตร = 9:1 ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ จากนั้นดูดสารละลาย AA ความเข้มข้น 1M ปริมาตร 1.71 มิลลิลิตร (0.123 กรัม, 1.71 มิลลิโมล) ด้วยไมโครปิเปต ลงในสารละลายผสมของ Milli-Q water กับ PBS เทใส่ในหลอดทดลองที่มี CTA และ ACVA นำแผ่นกระจกที่ได้จากข้อ 2.3.1.2 วางบน holder แล้วใส่ในหลอดทดลอง ปิดด้วยจุกยางและรัดด้วยลวดทองแดง ผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 30 นาที แล้วย้ายหลอดทดลองที่บรรจุสารและแผ่นกระจกลงในอ่างน้ำมันที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส คนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กพร้อมผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ล้างแผ่นกระจกด้วย acetone, ethanol และ DI water เป่าแผ่นกระจกให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน พิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวัดมุมสัมผัสของน้ำด้วยเครื่อง Contact angle goniometer แบ่งสารละลายในหลอดทดลอง 200 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของ PAA ที่เกิดขึ้นในสารละลายก่อนทำให้บริสุทธิ์ นำสารละลายส่วนที่เหลือไปผ่านกระบวนการไดอะไลซิสเป็นเวลา 3 วัน โดยใช้ถุงไดอะไลซิส (molecular weight cut-off = 3500) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง ก่อนนำสารละลายไปทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dry ได้ผลิตภัณฑ์เป็น PAA มีลักษณะเป็นของแข็งสีส้ม นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy เพื่อหา % conversion และน้ำหนักโมเลกุล

2.3.2 การตรึง OPN บนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอสไตริกแอซิดบรซ์



เตรียมสารละลาย OPN เริ่มต้น (OPN stock solution) โดยใช้ PBS pH = 7.4 ความเข้มข้น 1 M เป็นตัวทำละลาย โดยสามารถหาความเข้มข้นได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ OPN stock solution} = \frac{\text{น้ำหนักของ OPN (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาตรของ PBS (มิลลิลิตร)}} \quad (2.1)$$

คำนวณความเข้มข้นของ OPN ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้จาก

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (2.2)$$

C_1 : ความเข้มข้นของ OPN stock solution (mg/ml)

C_2 : ความเข้มข้น OPN ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (mg/ml)

V_1 : ปริมาตรของ OPN stock solution (มิลลิลิตร)

V_2 : ปริมาตรรวมของ PBS และ OPN stock solution (มิลลิลิตร)

ชั่ง EDC 0.3451 กรัม (1.8 มิลลิโมล) และ NHS 0.0518 กรัม (0.45 มิลลิโมล) ในขวดแก้วขนาดเล็ก ละลาย EDC และ NHS ด้วย PBS pH = 7.4 ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของ EDC และ NHS เป็น 0.2 และ 0.05 M, ตามลำดับ จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ด้วยไมโครปิเปตไซในเวลเพลตที่มีแผ่นกระจกที่ได้จากข้อ 2.3.1.3 แต่ละหลุมหลุมละ 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 นาที เติมสารละลาย OPN ที่คำนวณความเข้มข้นแน่นอนลงไปในแต่ละหลุมโดยใช้ไมโครปิเปตหลุมละ 500 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายแต่ละหลุมทิ้ง เติม PBS pH = 7.4 ความเข้มข้น 10 mM ลงไปหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ทำซ้ำอีก 4 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์

2.3.3 การกราฟต์ด้วยพอลิแอสไตริกแอซิดบรซ์บนอนุภาคซิลิกา

2.3.3.1 การติด APTES ลงบนซิลิกา

ชั่งซิลิกา 0.3 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ทำความสะอาดด้วยสารละลาย Piranha (H₂SO₄:H₂O₂ = 7:3 โดยปริมาตร) โดยเท H₂SO₄ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร และ H₂O₂ ปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมกันอย่างช้าๆ ในขวดแก้ว

ที่มีซิลิกา ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงในตู้ดูดควัน จากนั้นนำอนุภาคซิลิกาไปกรองสูญญากาศ ล้างด้วย DI water หลายๆ ครั้ง จนน้ำล้างไม่มีฤทธิ์กรด โดยการตรวจสอบด้วย Universal indicator นำอนุภาคซิลิกาไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาไฮลาโนเซนโดยเติม 2% APTES ใน toluene ที่กลั่นแล้ว 10 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วที่มีซิลิกา ปิดจุกยางพร้อมรัดด้วยลวดทองแดง ผ่านแก๊สไนโตรเจนลงในสารละลาย พร้อมคนด้วยแท่งแม่เหล็กระหว่างทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคซิลิกาไปกรองสูญญากาศ ล้างด้วย toluene 2 ครั้ง นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Infrared Spectrometer

2.3.3.2 การติด Initiator ลงบนอนุภาคซิลิกาที่ติด APTES

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 2.3.1.2 โดยใช้อนุภาคที่เตรียมได้ในข้อ 2.3.3.1 เป็นชั้นสเตรทจากนั้นนำอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้ไป พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่อง Infrared Spectrometer

2.3.3.3 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอคริลิกแอซิด

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 2.3.1.3 โดยใช้อนุภาคที่เตรียมได้ในข้อ 2.3.3.2 เป็นชั้นสเตรท จากนั้นนำอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้ไป พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่อง Infrared Spectrometer

2.3.4. การติด OPN บนอนุภาคซิลิกาที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดบรัช

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 2.3.2 โดยใช้อนุภาคที่เตรียมได้ในข้อ 2.3.3.3 เป็นชั้นสเตรท จากนั้นนำอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้ไป พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่อง Infrared Spectrometer

2.3.5 การทดสอบการตอบสนองของเซลล์

2.3.5.1 การเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกหนู (MC-3T3-E1) ที่เป็นเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อในส่วนของกระดูกของหนู ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Growth medium (GM) ซึ่งประกอบด้วย FBS ร้อยละ 10 โดยปริมาตรใน α -MEM, เพนนิซิลิน 100 μ M/mL และสเตริบโทไมซิน 10 μ M/mL และเพาะเลี้ยงเซลล์อีกส่วนในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Osteogenic medium (OM) ซึ่งประกอบด้วย FBS ร้อยละ 10 โดยปริมาตรใน α -MEM เพนนิซิลินความเข้มข้น 100 μ M/mL และสเตริบโทไมซินความเข้มข้น 10 μ M/mL กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 50 μ M/mL เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (Beta glycerophosphate) ความเข้มข้น 5 mM และเดกซามาธาโซน (Dexamethasone) ความเข้มข้น 250 μ M

ทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่ชื้นมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเซลล์จึงทำการเพาะต่อช่วง (subculture) 3-5 รอบ ในอัตราส่วนหนึ่งต่อสาม

2.3.5.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่นกระจก

นำแผ่นกระจกเปล่า แผ่นกระจกที่กราฟต์ PAA และแผ่นกระจกที่กราฟต์ PAA และตริง OPN ใส่ในเวลเพลตแล้วไปเพาะเลี้ยงเซลล์ MC-3T3-E1 เป็นจำนวน 50,000 เซลล์ต่อเวลในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Growth medium (GM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3 วัน แผ่นกระจกอีกส่วนหนึ่งเพาะในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Osteogenic medium (OM) เป็นเวลา 3 วัน ดูผลการเพาะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง (bright field microscope)

2.3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธี อาร์ที-พีซีอาร์

นำแผ่นกระจกที่ได้จากข้อ 2.3.5.2 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วใส่ในเวลเพลตอันใหม่ เติมนสารละลายไตรโซล (TRIZOL) เพื่อไปสกัด RNA จากเซลล์ MC-3T3-E1 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง เปลี่ยน RNA 1 μ M เป็น Complementary DNA (cDNA) โดยผ่านขบวนการรีเวิร์สทรานคริปเตส (Reverse Transcriptase RT) เพื่อสร้าง cDNA ตรวจสอบจากเครื่อง Nano drop (Thermo Scientific NANODROP 2000) โดยดูค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการขยายสัญญาณของ cDNA ด้วยปฏิกิริยาอวกโซพอลิเมอเรสแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative PCR) โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase และไพรเมอร์ (Primer) จำเพาะต่อยีน Coll I, NANOG, REX1 และใช้ยีนกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง เป็นเวลา 7 วัน

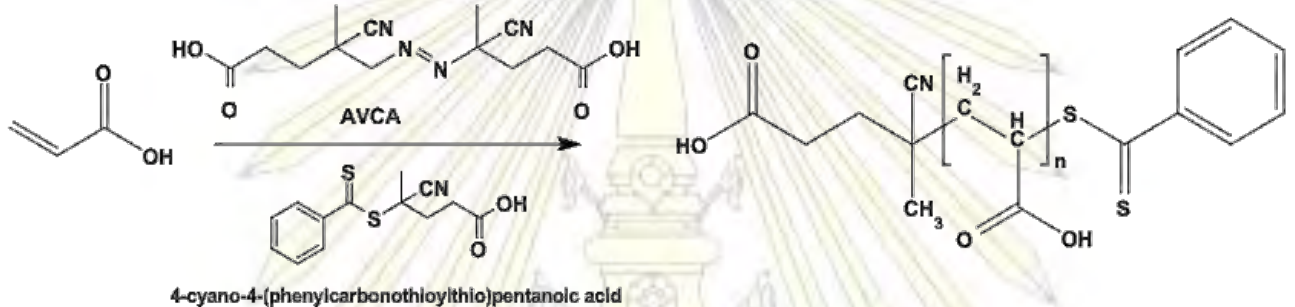
นำสารที่ผ่านกระบวนการ PCR แล้วไปวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 1.8 % และสามารถตรวจสอบการเปล่งแสงของแถบยีนด้วยเอทริเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ภายใต้แสงยูวี (UV) วิเคราะห์ความหนาแน่นของแถบยีนด้วยโปรแกรม ไบโอ 1 ดี (Bio1D software)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

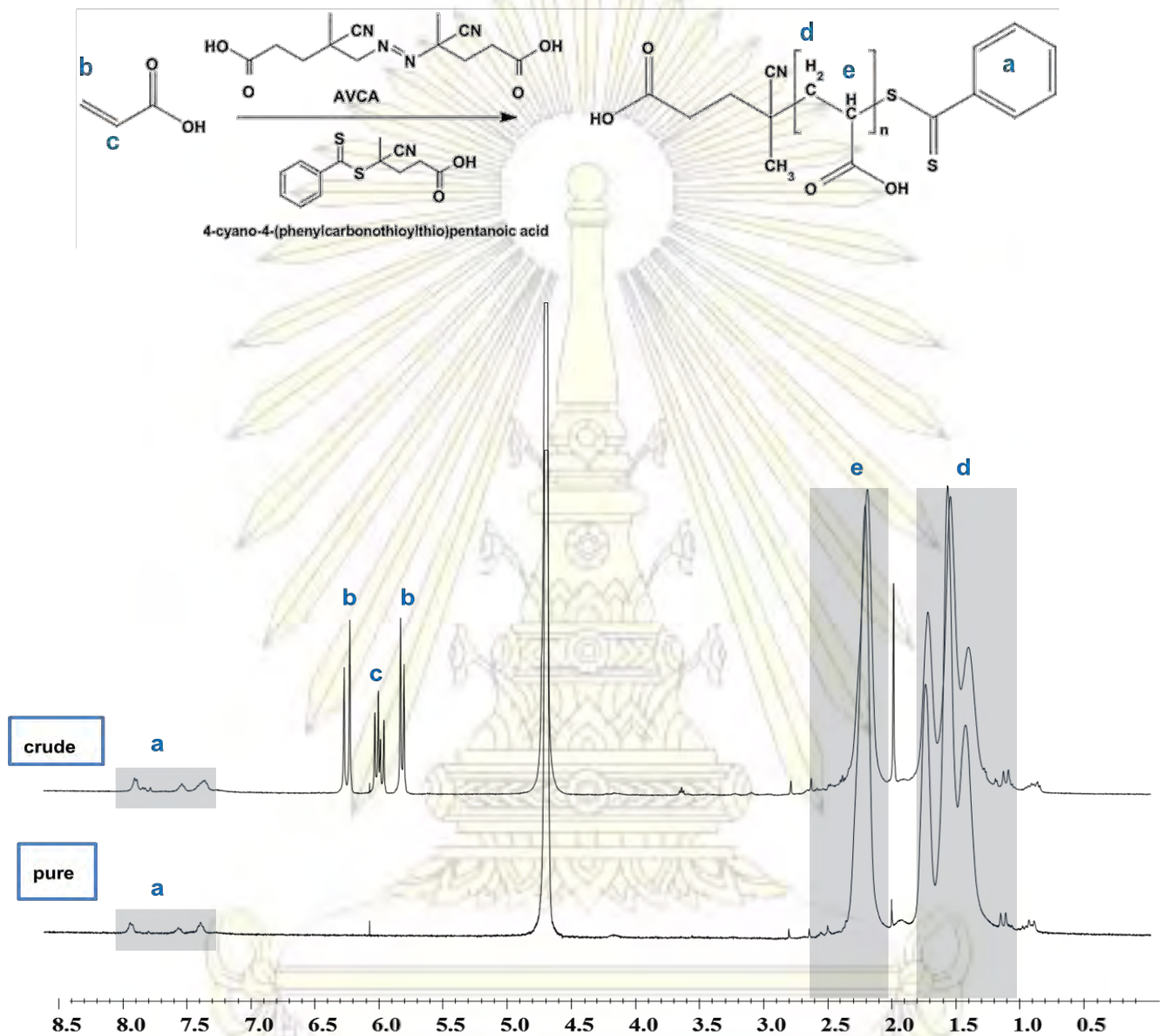
3.1 การสังเคราะห์พอลิแอคริลิกแอซิดผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization



รูปที่ 3.1 สมการแสดงการสังเคราะห์ PAA ในสารละลายด้วย RAFT polymerization

จากรูปที่ 3.1 ทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอคริลิกแอซิด (AA) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพบว่าได้สารละลายใสสีส้ม จากนั้นแบ่งพอลิแอคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid) (PAA)) ที่สังเคราะห์ได้ (crude) ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ เพื่อหาค่า % conversion (พิจารณา $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของ crude ในรูปที่ 3.2) และส่วนที่เหลือทำให้บริสุทธิ์โดยการทำให้ dialysis ใน DI water เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล (พิจารณา $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัม ของ pure ในรูปที่ 3.2) จะพบสัญญาณ chemical shift ของโปรตอนในโครงสร้างของพอลิเมอร์ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3.1

เมื่อพิจารณา $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของ pure จะพบสัญญาณที่ค่า chemical shift 2.2 และ 1.0 – 1.8 ppm ของโปรตอนที่ตำแหน่ง e และ d ในโครงสร้าง PAA ที่อยู่ในสายโซ่พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ จึงสามารถยืนยันการเกิด PAA นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้ว่าพอลิเมอร์ดังกล่าวถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการทำให้ dialysis เนื่องจากไม่พบสัญญาณโปรตอนของมอนอเมอร์ (โปรตอน b และ c) ในสเปกตรัมของ pure PAA ทั้งนี้จะพบสัญญาณโปรตอนของวงแหวนอะโรมาติกที่ตำแหน่ง a ใน $^1\text{H NMR}$ ของทั้ง pure และ crude แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของหมู่ปลายที่เป็นไดไทโอเบนโซเอตที่มาจากสารถ่ายโอนโซ่หรือ CTA



รูปที่ 3.2 ¹H-NMR สเปกตรัมของ PAA ก่อน (crude) และหลัง (pure) การทำให้บริสุทธิ์โดย dialysis ในการทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันใช้ความเข้มข้น AA 1 M และ CTA : Initiator เป็น 4 : 1 และทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 Chemical shift ของ PAA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR

Chemical shift (ppm)	ตำแหน่ง ¹ H
1.0 – 1.8	d
2.2	e
5.8 – 6.3	b
6.0	c
7.3 – 8.0	a

สามารถใช้ข้อมูลจากสเปกตรัมของ crude ในการคำนวณ % conversion โดยอาศัยสัญญาณโปรตอนของมอนอเมอร์ ตำแหน่ง b และ c ที่ค่า chemical shift 5.8 – 6.3 ppm และอาศัยสัญญาณโปรตอนของพอลิเมอร์ตำแหน่ง d และ e ที่ค่า chemical shift 1.0 – 2.2 ppm สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ conversion} = \frac{\int H_{(e,d)}}{\int H_{(e,d)} + \int H_{(b,c)}} \times 100\% \quad (3.1)$$

ซึ่งพบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้ % conversion ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 97.1 % ซึ่งมีค่าที่สูง

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ PAA ที่สังเคราะห์ได้โดยสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ PAA ได้จากสมการ

$$M_n = [(M_w \text{ acrylic acid} \times \text{Degree of Polymerization (DP)}) + 279.38 (M_w \text{ CTA})] \times \% \text{ conversion} \quad (3.2)$$

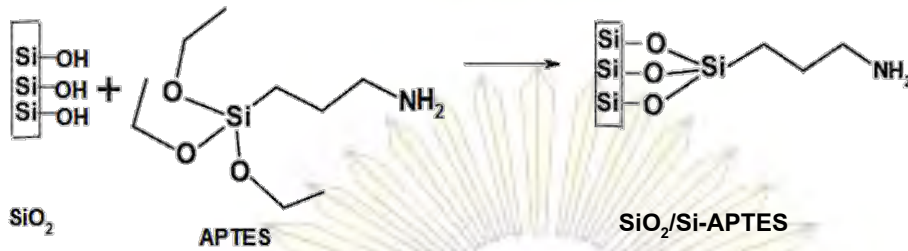
ทั้งนี้สามารถคำนวณ Degree of polymerization (DP) ได้จากสเปกตรัม $^1\text{H NMR}$ ของ pure โดยสามารถหาได้จากสมการ

$$\text{Degree of Polymerization (DP)} = \frac{\int H_{(e,d)}}{\frac{\int H_{(a)}}{5}} \quad (3.3)$$

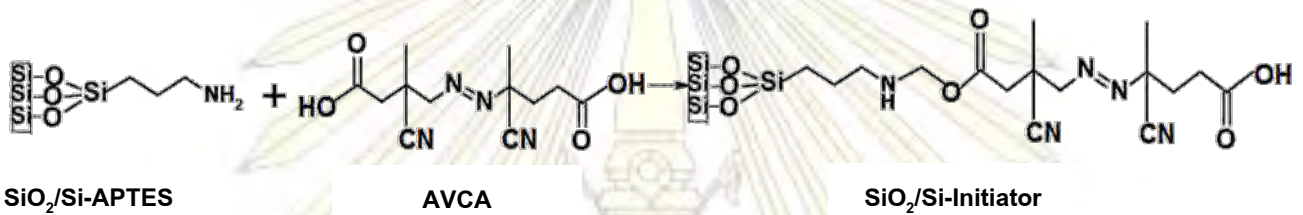
จากสมการ 3.3 สามารถคำนวณหาค่า DP ได้เท่ากับ 87 และสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ PAA ตามสมการ 3.2 ได้เท่ากับ 6,358 ซึ่งในการสังเคราะห์ PAA ตามทฤษฎีใช้ DP เท่ากับ 100 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 7,268 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับทฤษฎี แสดงว่า สามารถควบคุมค่า DP และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยา RAFT polymerization ได้ดี

3.2 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันเริ่มจากพื้นผิวบนแผ่นกระจกและอนุภาคซิลิกา

ในการกราฟต์พอลิเมอร์บนพื้นผิวของ PAA ลงบนแผ่นกระจกจะเริ่มจากการติดหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันลงบนพื้นผิวก่อน ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (AVCA) แต่การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแผ่นกระจกซึ่งเป็นสารอนินทรีย์กับตัวริเริ่มซึ่งเป็นสารอินทรีย์ ทำให้พันธะที่เกิดขึ้นไม่เสถียร จึงจำเป็นต้องทำปฏิกิริยาผ่านสารประกอบ silane โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) เนื่องจากมีหมู่ปลายแอมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของตัวริเริ่มได้เกิดเป็นพันธะเอไมด์ โดยเริ่มจากการทำความสะอาดแผ่นกระจกด้วยพลาสมาเป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดสารอินทรีย์บนผิวกระจกและทำให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) จากนั้นติด APTES ลงบนแผ่นโดยอาศัยปฏิกิริยาแบบ vapor phase ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 3.3) แล้วนำแผ่นไปล้างด้วย toluene, acetone และ DI water และทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นนำแผ่นกระจกที่ติด APTES ไปติดตัวริเริ่ม โดยใช้ N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบเพื่อเชื่อมระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของตัวริเริ่มและหมู่แอมิโนของ APTES (รูปที่ 3.3)

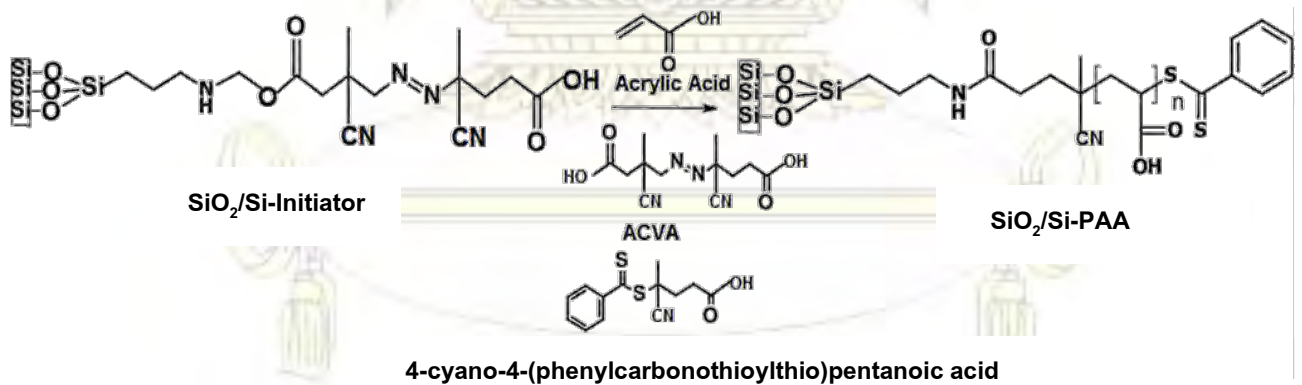


รูปที่ 3.3 สมการแสดงการติด APTES ลงบนแผ่นกระจก



รูปที่ 3.4 สมการแสดงการติด 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) ลงบนแผ่นกระจกที่ผ่านการติด APTES

เมื่อติดตัวริเริ่มบนแผ่นกระจกเป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย DMF และ ethanol ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นนำแผ่นกระจกที่ได้ไปกราฟต์ PAA ด้วยทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวทันที เนื่องจากตัวริเริ่มไม่เสถียร สามารถแตกตัวเป็นแรดิคัลได้ง่าย ดังรูปที่ 3.5 เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ล้างแผ่นกระจกด้วย acetone, ethanol และ DI water ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นนำไปวัดมุมสัมผัสของน้ำ ดังแสดงผลในตารางที่ 3.2



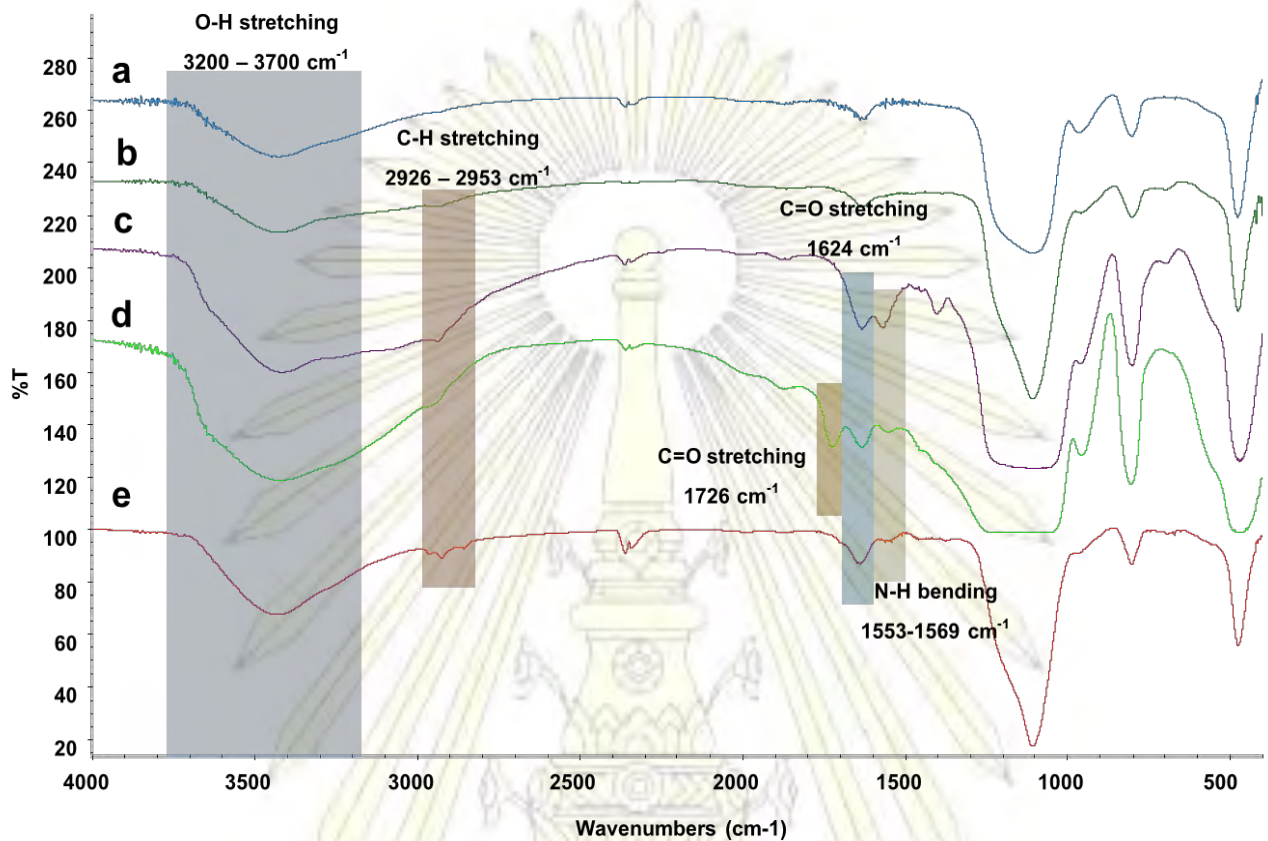
รูปที่ 3.5 สมการแสดงปฏิกิริยาการกราฟต์ PAA บนพื้นผิวกระจก

ตารางที่ 3.2 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนแผ่นกระจกหลังจากทำปฏิกิริยาต่างๆ

Sample	ค่ามุมสัมผัสของน้ำ (องศา)	
	$\theta_{\text{advancing}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{receding}} (^{\circ})$
SiO ₂ /Si-OH	N/A	N/A
SiO ₂ /Si-APTES	82.3 ± 1.3	52.3 ± 3.2
SiO ₂ /Si-Initiator	80.5 ± 3.3	49.4 ± 4.6
SiO ₂ /Si-PAA	40.4 ± 3.9	N/A
SiO ₂ /Si-PAA-OPN	56.1 ± 4.5	35.3 ± 5.6

N/A: ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากพื้นผิวเปียกน้ำ

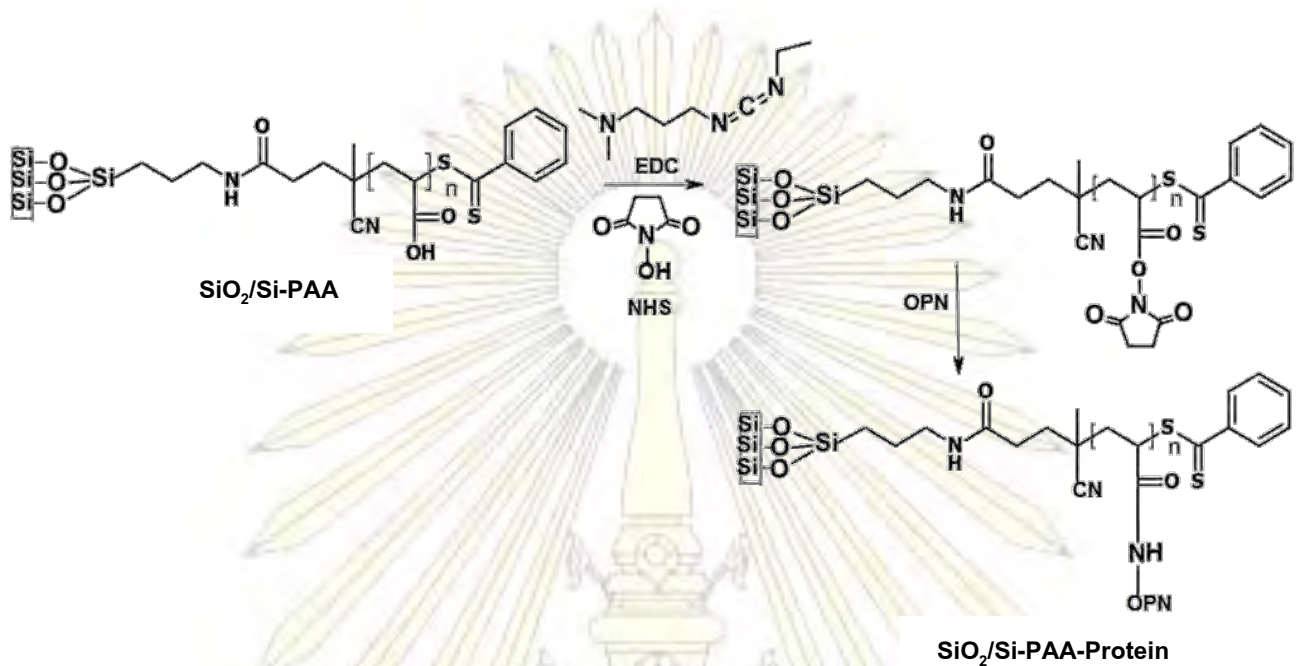
จากตารางที่ 3.2 พบว่าแผ่นกระจกที่ติด APTES มีค่า advancing contact angle ($\theta_{\text{advancing}}$) เท่ากับ $82.3 \pm 1.3^{\circ}$ มีค่า receding contact angle (θ_{receding}) เท่ากับ $52.3 \pm 3.2^{\circ}$ เมื่อนำแผ่นกระจกไปติด initiator พบว่า มีค่า $\theta_{\text{advancing}}$ เท่ากับ $80.5 \pm 3.3^{\circ}$ มีค่า θ_{receding} เท่ากับ $49.4 \pm 4.6^{\circ}$ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันและมีค่าสูง แสดงว่าแผ่นกระจกมีสมบัติความไม่ชอบน้ำ ทั้งนี้แผ่นกระจกหลังจากทำความสะอาดจะไม่สามารถวัดค่ามุมสัมผัสของน้ำได้เนื่องจากพื้นผิวมีความชอบน้ำสูงมาก น้ำจึงเปียกผิวทั้งหมด เมื่อนำแผ่นกระจกไปติด PAA พบว่า มีค่า $\theta_{\text{advancing}}$ เท่ากับ $40.4 \pm 3.9^{\circ}$ และไม่สามารถวัดค่า θ_{receding} แสดงว่าแผ่นกระจกมีสมบัติความชอบน้ำสูง จึงทำให้ค่ามุมสัมผัสของน้ำต่ำลง จึงยืนยันได้ว่าสามารถติด PAA บนแผ่นกระจกได้ จากนั้นนำแผ่นกระจกไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR พบว่าไม่สามารถเห็นสัญญาณได้อย่างชัดเจน เนื่องจากความหนาของชั้นพอลิเมอร์น้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจวัดของเทคนิค ATR-FTIR ผู้วิจัยจึงเลือกทำปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนบนอนุภาคซิลิกา ซึ่งมีพื้นที่ผิวสูง ทำให้มีปริมาณพอลิเมอร์ที่มากพอที่จะพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ด้วยเทคนิค FTIR ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 FT-IR สเปกตรัมของอนุภาคซิลิกา: a) SiO₂/Si-OH, b) SiO₂/Si-APTES, c) SiO₂/Si-initiator, d) SiO₂/Si-PAA และ e) SiO₂/Si-PAA-OPN

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ดังแสดงผลในรูปที่ 3.6 พบสัญญาณของ OH stretching ที่ wavenumber 3200 - 3700 cm⁻¹ เป็นของหมู่ไฮดรอกซิลของอนุภาคซิลิกา พิจารณา peak b เป็นของ Si-APTES พบ peak ของ C-H stretching ที่ 2926 cm⁻¹ ของ APTES แสดงว่าสามารถติด APTES ลงบนอนุภาคได้ เมื่อพิจารณา peak c พบ C=O stretching ที่ 1624 cm⁻¹ และ N-H bending ที่ 1569 cm⁻¹ เป็นของพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่เอมีนของ APTES และหมู่คาร์บอกซิลของตัวริเริ่ม พิจารณา peak d พบ C=O stretching ที่ 1726 cm⁻¹ ของหมู่คาร์บอกซิลของ PAA แสดงว่าสามารถสังเคราะห์ PAA และติด PAA ลงบนอนุภาคซิลิกาได้

3.3 การตรึง OPN บนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดบรัช



รูปที่ 3.7 สมการแสดงการตรึง OPN บนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดบรัช

จากการนำแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วย PAA ไปตรึง OPN โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบเพื่อกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลของ PAA ให้เป็นหมู่เอสเทอร์ซึ่งว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากขึ้น จากนั้นจึงใส่ OPN แล้วทำปฏิกิริยาการตรึง OPN เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงล้างแผ่นกระจกที่ตรึง OPN เรียบร้อยแล้วด้วยสารละลาย PBS จำนวน 5 ครั้ง แล้วจากนั้นนำไปวัดมุมสัมผัสของน้ำ ดังแสดงผลในตารางที่ 3.2

จากตารางที่ 3.2 พบว่า แผ่นกระจกที่ติด PAA มีค่า advancing contact angle ($\theta_{\text{advancing}}$) เท่ากับ $40.4 \pm 3.9^\circ$ และไม่มีค่า receding contact angle (θ_{receding}) เมื่อนำแผ่นกระจกไปตรึง OPN พบว่า มีค่า $\theta_{\text{advancing}}$ เท่ากับ $56.1 \pm 4.5^\circ$ มีค่า θ_{receding} เท่ากับ $35.3 \pm 5.6^\circ$ ซึ่งมีค่าสูงขึ้น แสดงว่า พื้นผิวของวัสดุที่ตรึงโปรตีนแล้วมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เป็นการยืนยันว่าสามารถตรึง OPN บนแผ่นกระจกได้

นอกจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการตรึงโปรตีน OPN บนอนุภาคซิลิกาที่ติดพอลิแอคริลิกแอซิดบรัช แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค FT-IR ดังแสดงผลในรูปที่ 3.6 จากสเปกตรัมสามารถยืนยันการติดโปรตีน OPN ได้ โดยสังเกตได้จากการหายไปของ peak ของ C=O stretching ที่ 1726 cm^{-1} ซึ่งเป็นของหมู่คาร์บอกซิลของ PAA และพบ peak ของ C=O stretching ของเอไมด์ของโปรตีน OPN ที่ 1636 cm^{-1} แสดงถึงสามารถตรึงโปรตีน OPN ลงบนอนุภาคซิลิกาได้สำเร็จ นอกจากนั้นยังสามารถยืนยันผลการตรึง OPN บนแผ่นกระจกที่ติดพอลิแอคริลิกแอซิดบรัชได้ด้วยเทคนิค X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) ดังแสดงผลในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุบนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอสคริลิกแอซิดบรัชและตรึงด้วย OPN ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเทคนิค XPS

Sample	C	O	N	S
SiO ₂ /SiPAA	63.63	33.51	2.59	0.27
SiO ₂ /Si-PAA ที่ตรึงด้วย OPN ความเข้มข้น 0.1 mg/ml	69.62	24.80	5.30	0.28
SiO ₂ /Si-PAA ที่ตรึงด้วย OPN ความเข้มข้น 0.5 mg/ml	66.23	26.81	6.60	0.35
SiO ₂ /Si-PAA ที่ตรึงด้วย OPN ความเข้มข้น 5.0 mg/ml	65.35	27.16	7.24	0.24

จากข้อมูลเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุต่างๆ บนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วยพอลิแอสคริลิกแอซิดบรัชและตรึงด้วย OPN โดยใช้เทคนิค XPS พบว่า แผ่นกระจกที่ตรึง OPN จะมีปริมาณธาตุไนโตรเจนที่สูงกว่าแผ่นกระจกที่ติดพอลิแอสคริลิกแอซิดบรัช เนื่องจากมีปริมาณหมู่เอมีโนของโปรตีนที่สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน OPN ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของธาตุไนโตรเจนบนแผ่นกระจกก็มีค่าเพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่าพอลิแอสคริลิกแอซิดบรัชสามารถตรึง OPN บนพื้นผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.4 การตอบสนองของเซลล์ MC-3T3-E1 บนแผ่นกระจกที่ตรึง OPN

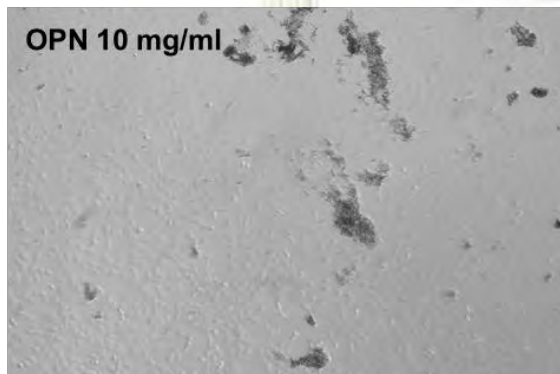
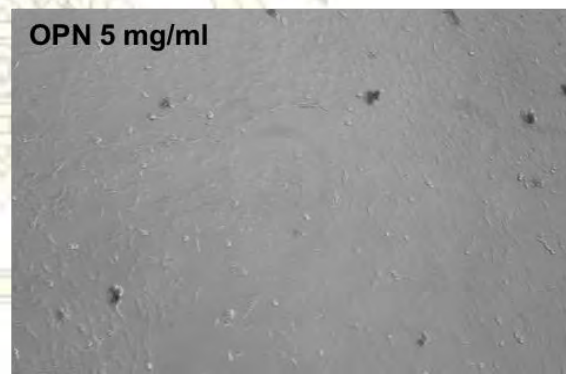
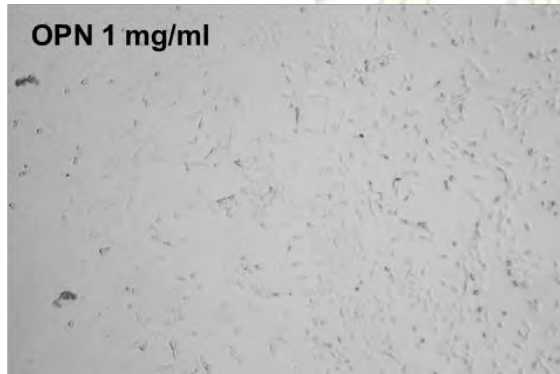
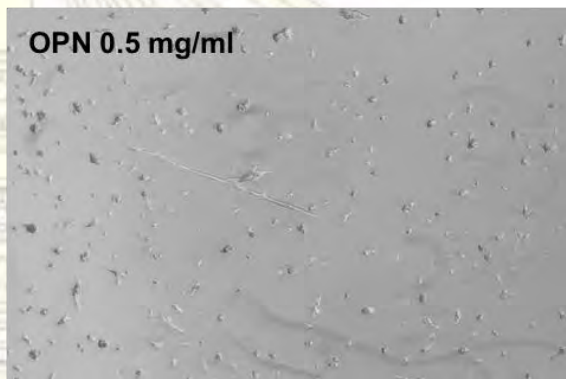
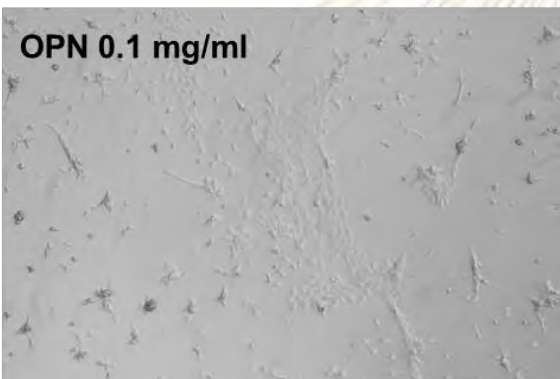
3.4.1 การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation)

การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation) เป็นการทดสอบปริมาณเซลล์ที่มายึดเกาะบนพื้นผิวที่ตรึงด้วย OPN โดยใช้เซลล์ MC-3T3-E1 ซึ่งเป็นเซลล์อ่อนของการสร้างเซลล์กระดูก (osteoprogenitor) ที่พัฒนามาจากหนู mice โดยมีผลการทดสอบเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงและ 3 วัน ใน media ชนิด Growth medium ดังรูปที่ 3.8



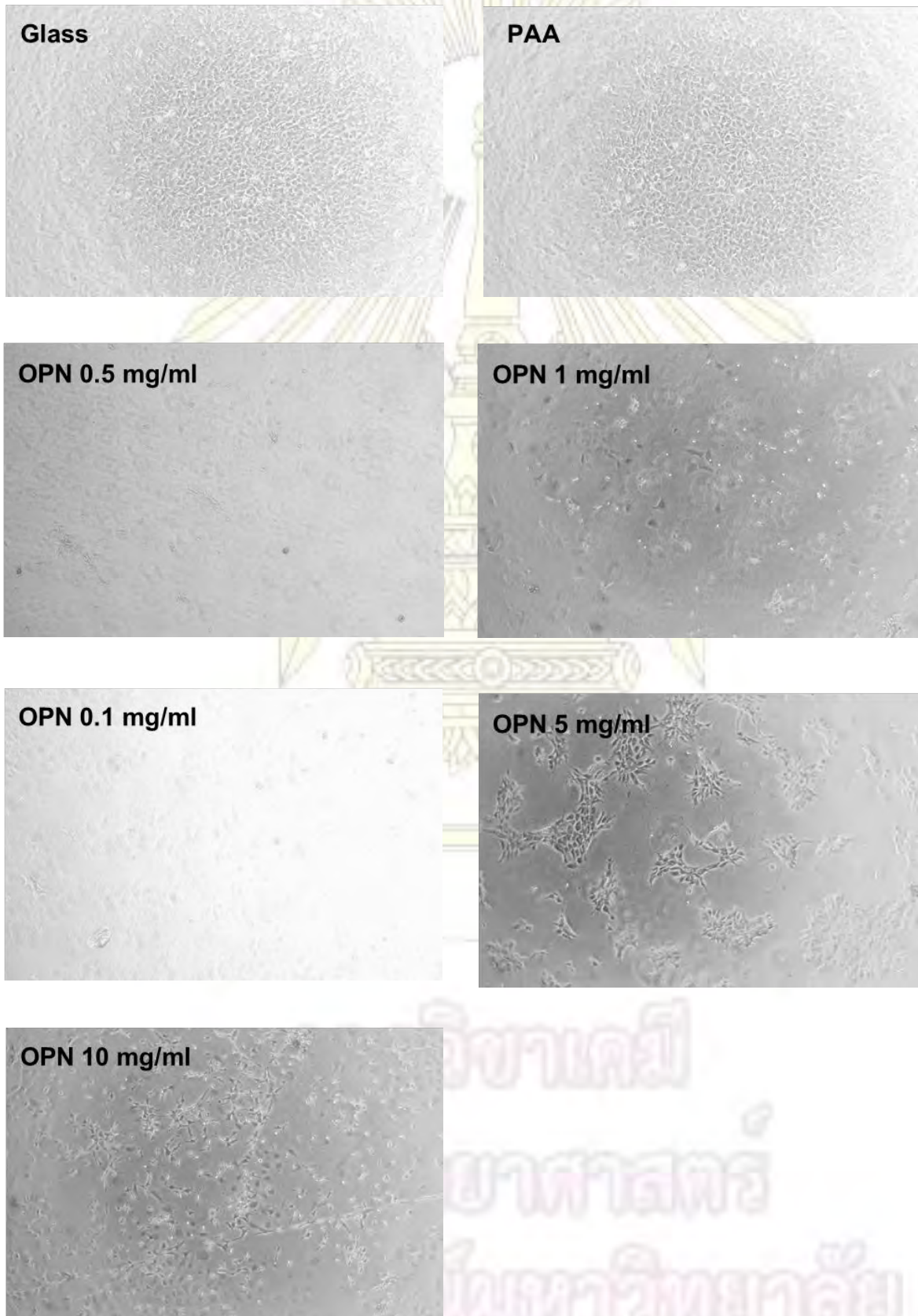
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A)



วิชาเคมี
ยาเสพติด
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

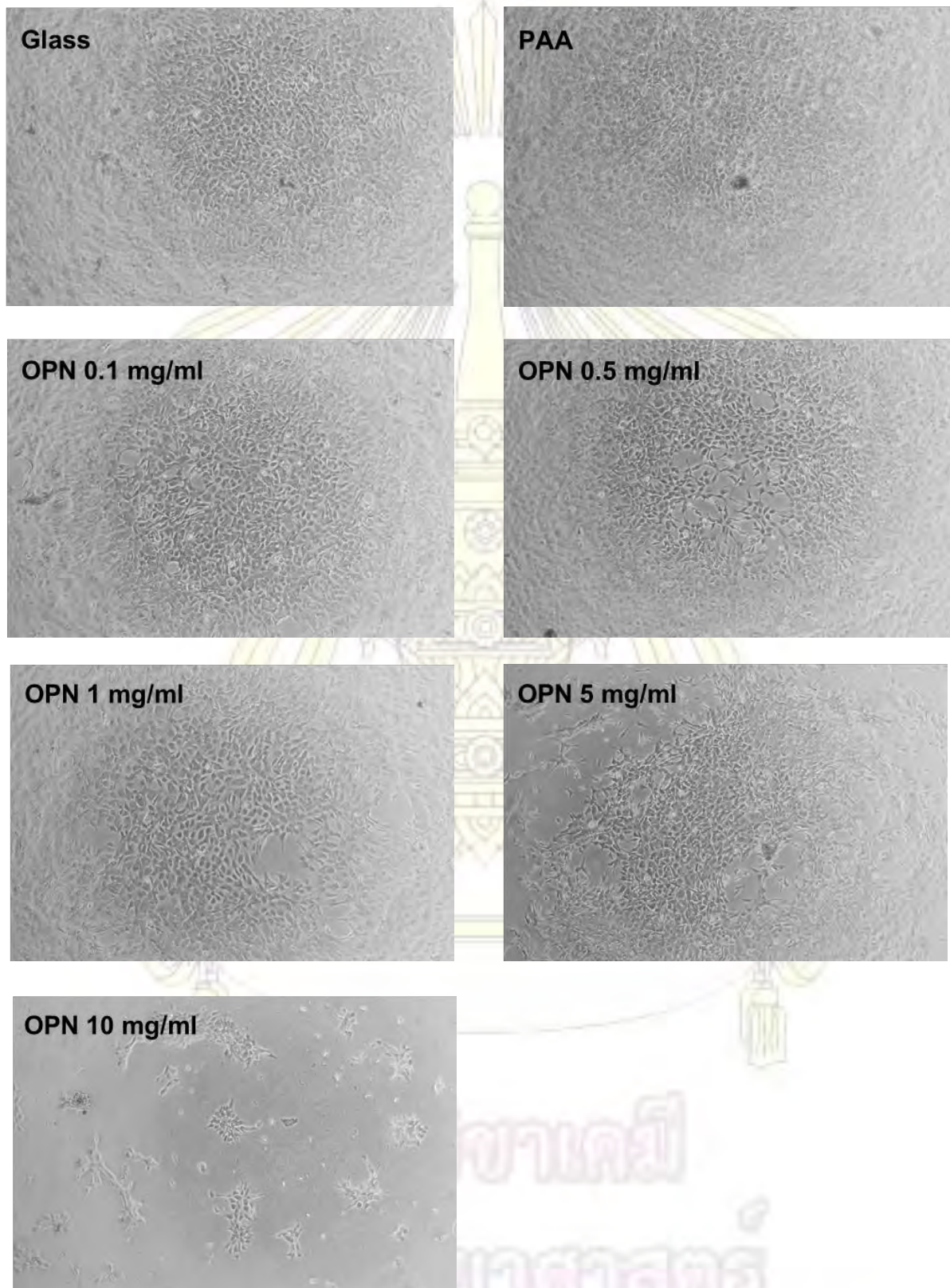
B)



รูปที่ 3.8 แสดงผลการทดสอบ Cell Proliferation ที่เวลา A) 24 ชั่วโมง B) 3 วัน ใน Growth medium

จากรูปที่ 3.8 เมื่อพิจารณารูป A ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ยึดเกาะบนแผ่นกระจกเปล่าและแผ่นกระจกที่ติด PAA อยู่กันอย่างหนาแน่น ในขณะที่เซลล์ที่อยู่บนแผ่นกระจกที่ตรึง OPN มีจำนวนน้อยกว่า เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเมื่อเพิ่มเวลาการทดสอบเป็น 3 วันดังรูป B พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวมากยิ่งขึ้น แสดงว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตตามปกติ เมื่อพิจารณารูป B ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนแผ่นกระจกตรึง OPN พบว่า ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนผิวมีปริมาณน้อยกว่าแผ่นกระจกเปล่าและแผ่นกระจกที่ติดเฉพาะ PAA ความเป็นไปได้ประการหนึ่ง คือ การตรึงโอพีเอ็นบน PAA ที่ติดอยู่บนแผ่นกระจก อาจทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไปและไม่ส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว ส่งผลให้ปริมาณเซลล์บนพื้นผิวมีค่าน้อยลงเมื่อเทียบกับแผ่นกระจกเปล่าและแผ่นกระจกที่ติดเฉพาะ PAA

ในการทดลองต่อมา ได้ทดลองเปลี่ยน media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์จาก growth medium (GM) เป็น osteogenic medium (OM) ซึ่งเป็น medium ที่ช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ differentiation ไปเป็น osteoblast cell หรือเซลล์กระดูก โดยผลการทดสอบปริมาณการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ที่เวลา 3 วันแสดงไว้ในรูปที่ 3.9



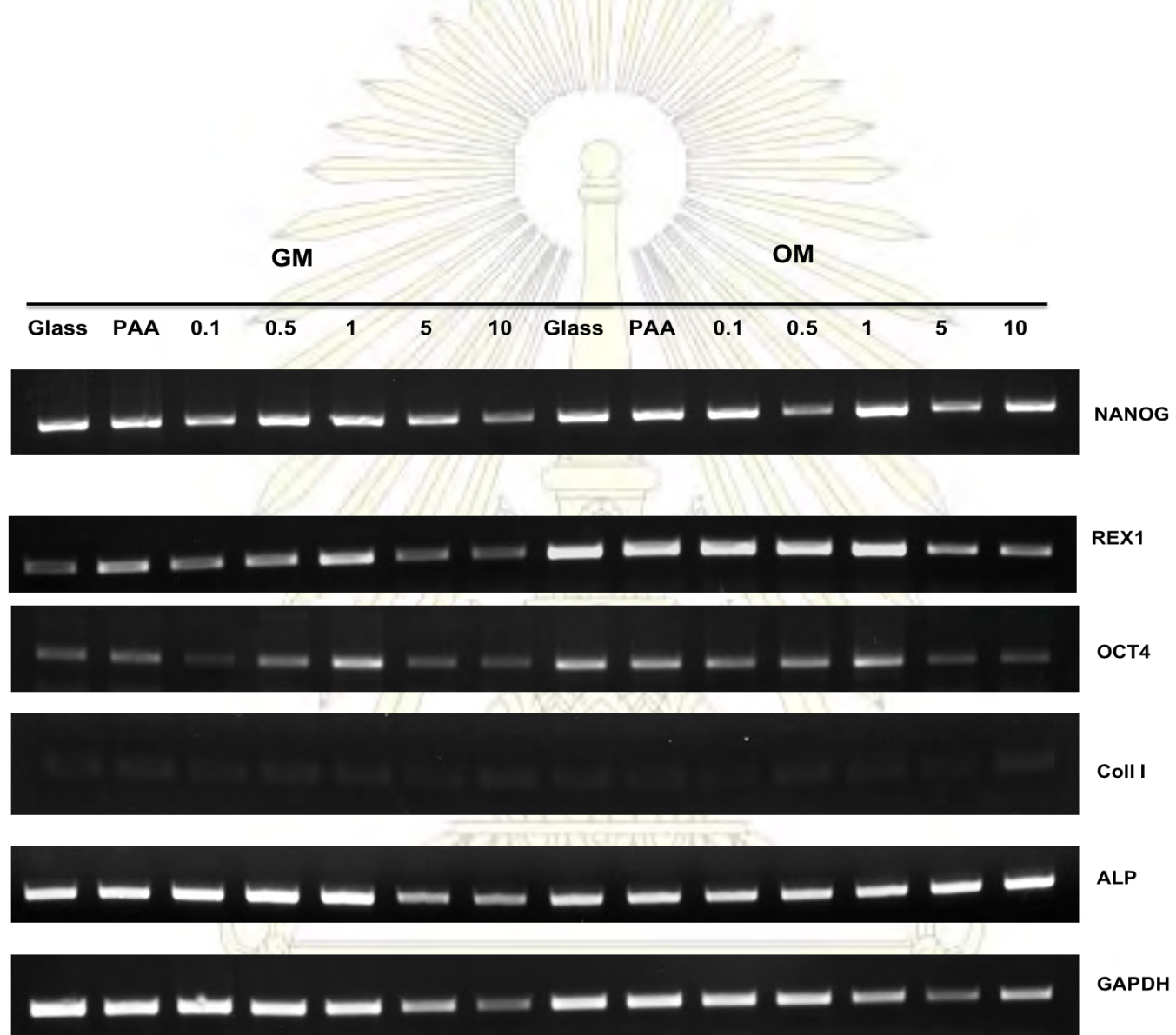
รูปที่ 3.9 แสดงผลการทดสอบ Cell Proliferation ที่เวลา 3 วันใน osteogenic medium (OM)

จากรูปที่ 3.9 พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ใน OM เป็นเวลา 3 วัน ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวที่ตรึง OPN จะมีจำนวนมากขึ้นเมื่อเทียบกับเลี้ยงเซลล์ใน media ชนิด GM แสดงว่าเมื่อเซลล์อยู่ใน media ชนิด OM ที่สามารถช่วยให้เซลล์เกิดกระบวนการ differentiation ไปเป็นเซลล์กระดูก สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดีกว่าเลี้ยงเซลล์ใน media ชนิด GM นั่นคือ medium ชนิด OM ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นกระจกที่ตรึง OPN ได้ดีขึ้น และเมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวที่ตรึงเปรียบเทียบกับแผ่นกระจกเปล่าและแผ่นกระจกที่ติดเฉพาะ PAA พบว่าจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้เป็นการศึกษาการตอบสนองของเซลล์เบื้องต้น ซึ่งจะต้องทำการศึกษาในส่วนของ การแสดงออกของยีนที่ช่วยควบคุมการเจริญของเซลล์ไปเป็นเซลล์กระดูกต่อไป

3.4.2 การทดสอบการแสดงออกของยีน (gene expression)

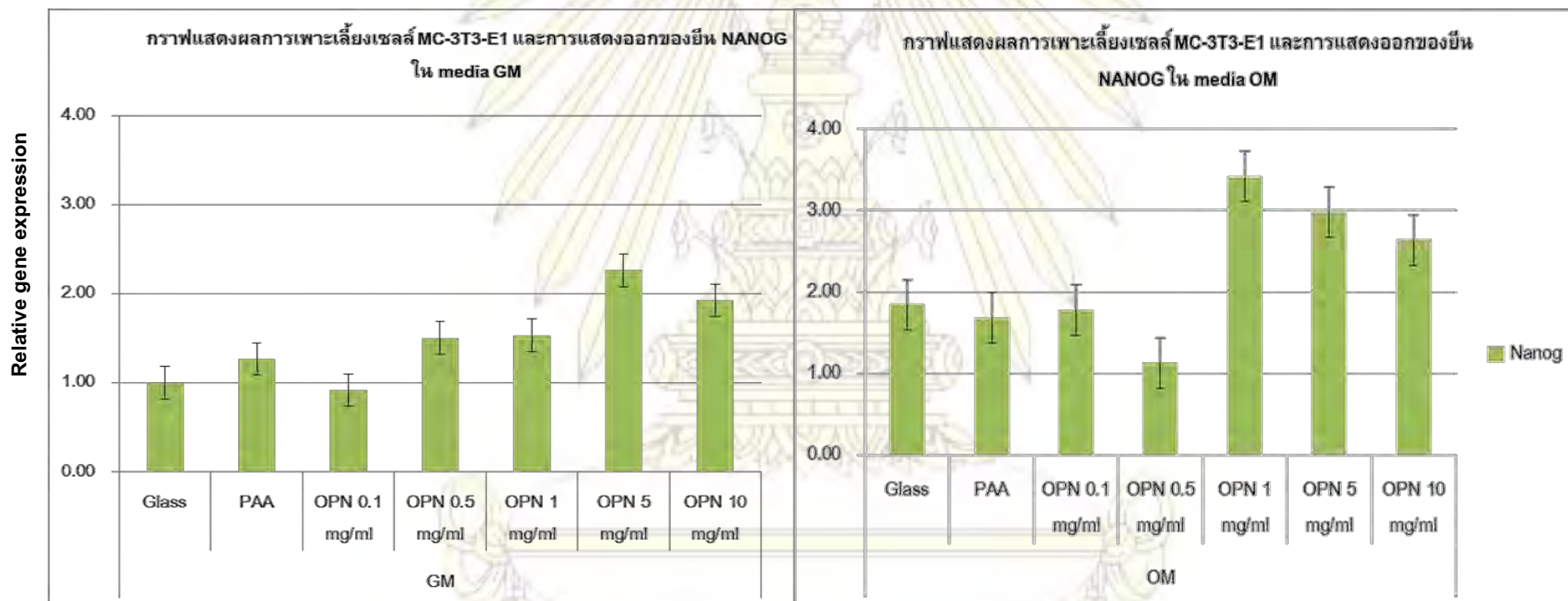
การทดสอบการแสดงออกของยีน (gene expression) โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน NANOG, Reduced expression 1 (REX1), Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), collagen I (Coll I), Alkaline phosphatase (ALP) โดยยีน NANOG, REX1, OCT4 เป็นยีนที่เป็น marker ของ stem cell และยีน Coll I, ALP เป็นยีนที่เป็น marker ที่แสดงความเป็นเซลล์กระดูก นั่นคือในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MC-3T3-E1 เป็นเซลล์กระดูก จะมีการลดการแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และเพิ่มการแสดงออกของยีน Coll I และ ALP ซึ่งแสดงถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์อ่อนไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenic differentiation)

เนื่องจากเซลล์ MC-3T3-E1 เมื่อเลี้ยงในจานเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OM จะใช้เวลาประมาณ 15 วันในการเกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูกโดยสมบูรณ์ (mature osteoblast) ซึ่งในกรณีนี้ ผู้วิจัยจะตรวจสอบการแสดงออกของยีน Coll I และ ALP ในระยะแรกและระยะกลาง ดังนั้น จึงจะทำการตรวจสอบการแสดงออกของ Coll I และ ALP เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ดังแสดงในรูปที่ 3.10

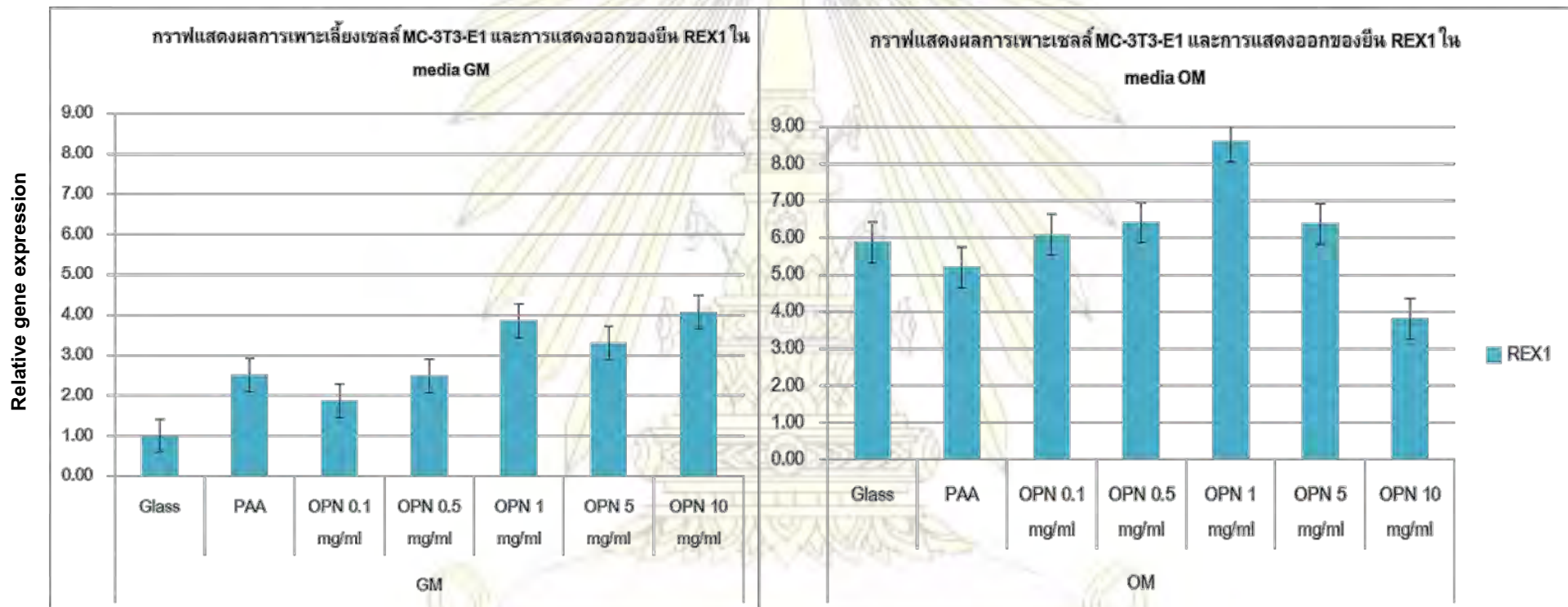


รูปที่ 3.10 ปริมาณยีนต่างๆ ที่เซลล์ MC-3T3-E1 แสดงออกมาในเวลา 7 วัน บนพื้นผิวแผ่นกระจกเปล่า แผ่นกระจกที่ติด PAA แผ่นกระจกที่ตรึง OPN ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml

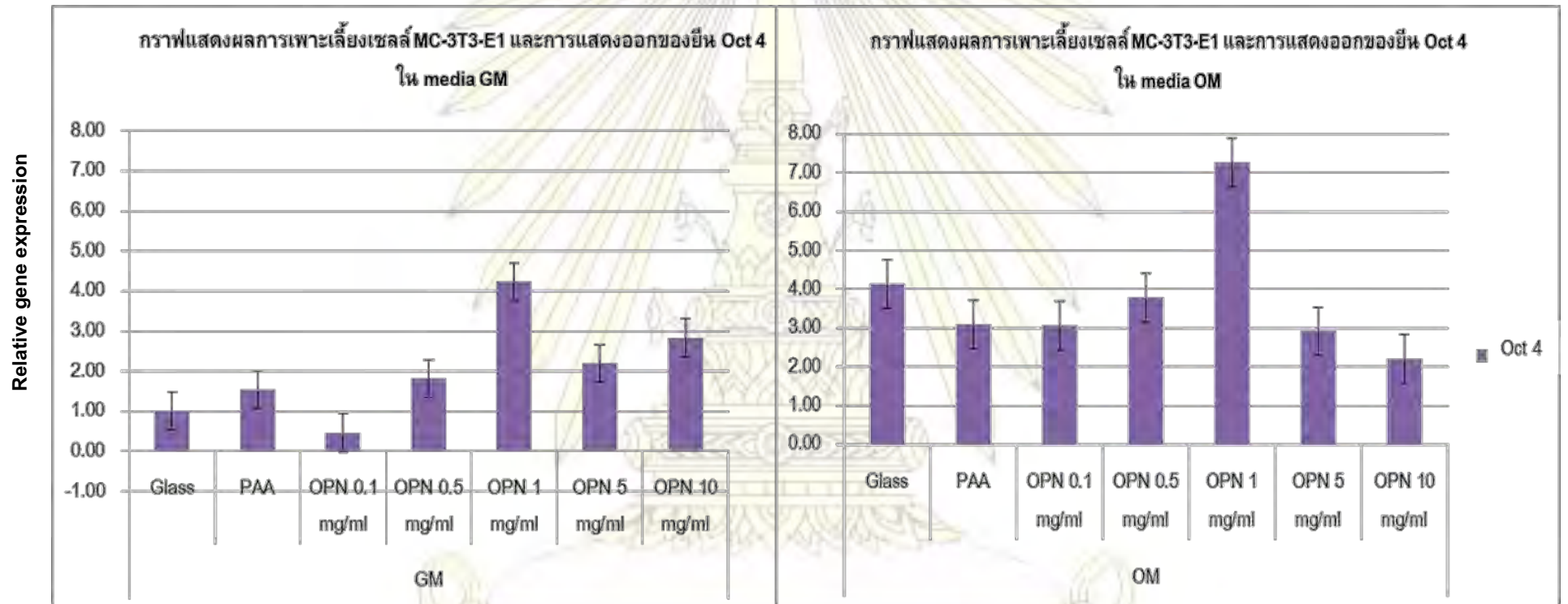
ปริมาณของยีนที่เซลล์แสดงออกมาเมื่อเลี้ยงใน media ชนิด GM และ OM สามารถวิเคราะห์ได้โดยการอ่านค่าความเข้มของ PCR product ใน agarose gel แล้วนำมา normalized ต่อการแสดงออกของ GAPDH ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกคงที่ (house keeping gene) จากนั้นจึงแสดงในรูปแผนภูมิโดยแสดงปริมาณยีนในหน่วย Relative gene expression ดังรูปที่ 3.11-3.15



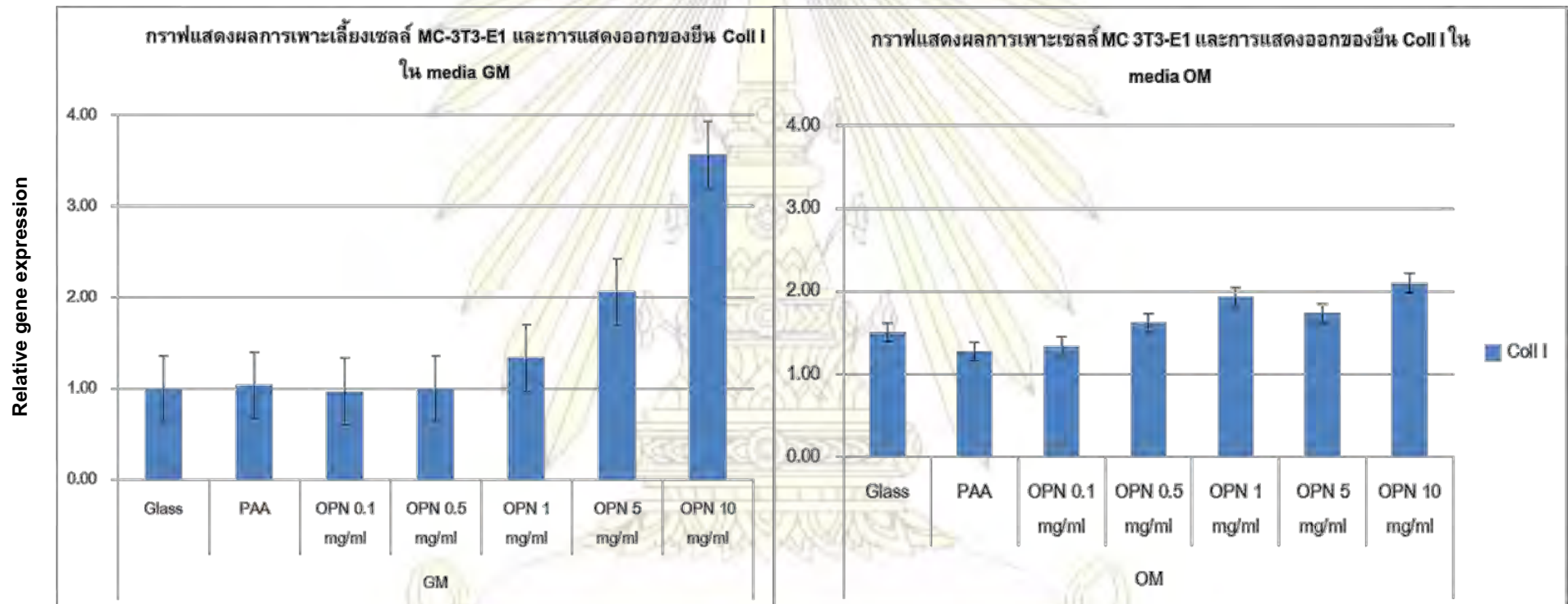
รูปที่ 3.11 แสดงปริมาณยีน NANOG ที่เซลล์แสดงออกมาบนพื้นผิวต่างๆ



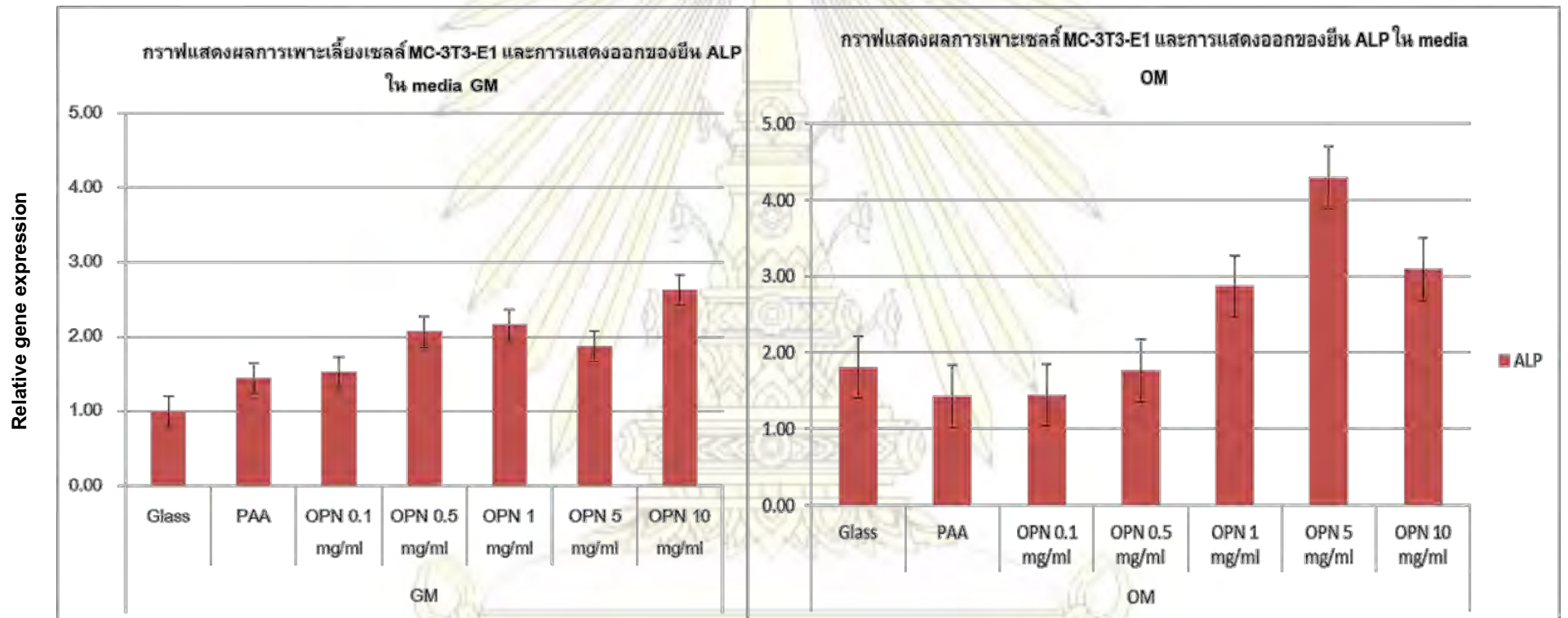
รูปที่ 3.12 แสดงปริมาณยีน REX1 ที่เซลล์แสดงออกมานบนพื้นผิวต่างๆ



รูปที่ 3.13 แสดงปริมาณยีน OCT4 ที่เซลล์แสดงออกมานบนพื้นผิวต่างๆ



รูปที่ 3.14 แสดงปริมาณยีน Coll I ที่เซลล์แสดงออกมานบนพื้นผิวต่างๆ



รูปที่ 3.15 แสดงปริมาณยีน ALP ที่เซลล์แสดงออกมาบนพื้นผิวต่างๆ

เมื่อพิจารณารูปที่ 3.11 การแสดงออกของยีน NANOG ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ในสภาวะที่เลี้ยงใน media ชนิด OM พบว่า ส่วนใหญ่จะมีระดับที่สูงกว่าระดับที่พบในเซลล์ที่เลี้ยงใน media ชนิด GM และเมื่อพิจารณาภายในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย media ชนิด OM พบว่า เซลล์ที่เลี้ยงบนแผ่นกระจกที่ตรึง OPN ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 mg/ml มีการแสดงออกของยีน NANOG สูงกว่าแผ่นกระจกเปล่าและแผ่นกระจกที่ติดเฉพาะ PAA โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ส่งผลให้มีปริมาณยีน NANOG สูงที่สุดคือ 1 mg/ml

ส่วนผลการศึกษารูปที่ 3.12 และในรูปที่ 3.13 ซึ่งเป็นการศึกษาการแสดงออกของยีน REX1 และ OCT4 ตามลำดับนั้น ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกับ NANOG ทั้ง REX1 และ OCT4 เป็นยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเช่นเดียวกับ NANOG และพบว่า ในสภาวะที่เลี้ยงใน OM เซลล์จะมีการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ สูงกว่าระดับที่พบในเซลล์ที่เลี้ยงใน GM และเมื่อพิจารณาภายในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย OM พบว่า เซลล์ที่เลี้ยงบนแผ่นกระจกที่ตรึง OPN ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5 mg/ml มีการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิด สูงกว่าแผ่นกระจกเปล่าและแผ่นกระจกที่ติดเฉพาะ PAA โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ส่งผลให้มีปริมาณยีน REX1 และ OCT4 สูงที่สุดคือ 1 mg/ml

จากผลการทดสอบดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ตัวซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้ถึงสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจำเป็นสำหรับกระบวนการ differentiation ไปเป็นเซลล์กระดูกซึ่งจะต้องมีการพิสูจน์ต่อไป

เมื่อพิจารณารูปที่ 3.14 ยีน Coll I เป็นยีนที่ควบคุมกระบวนการ differentiation จากเซลล์ MC-3T3-E1 ไปเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งพบว่าโดยเฉลี่ยแล้ว เมื่อเลี้ยงเซลล์ใน media ชนิด OM เป็น media ที่ช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ differentiation เซลล์จะสามารถปล่อยยีนดังกล่าวได้มากกว่า และพบว่า เมื่อตรึง OPN บนพื้นผิวที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 mg/ml ปริมาณยีน Coll I สูงกว่าแผ่นกระจกเปล่าและแผ่นกระจกที่ติด OPN โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่กระตุ้นให้เซลล์ปล่อยยีน Coll I คือ OPN ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml และในรูปที่ 3.15 การแสดงออกของยีน ALP ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมกระบวนการ differentiation จากเซลล์ MC-3T3-E1 ไปเป็นเซลล์กระดูกเช่นเดียวกับยีน Coll I พบว่ารูปแบบการแสดงออกคล้ายกับที่พบใน Coll I แต่สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่กระตุ้นให้เซลล์มีการแสดงออกของยีน ALP คือ OPN ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ใน media ชนิด OM ส่วนใหญ่แล้วเซลล์จะมีการแสดงออกของยีนที่ใช้ควบคุมกระบวนการ differentiation ใน media ชนิด OM ได้มากกว่า โดยแผ่นกระจกที่ตรึง OPN บนพื้นผิวที่ความเข้มข้น 10 mg/ml จะช่วยส่งเสริมให้มีปริมาณยีน Coll I และเมื่อพิจารณาปริมาณยีน ALP พบว่าแผ่นกระจกที่ตรึง OPN ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ส่งเสริมให้เซลล์มีปริมาณยีนสูงที่สุด แสดงว่า OPN สามารถกระตุ้นกระบวนการ differentiation ไปเป็นเซลล์กระดูกได้ ซึ่งการที่เซลล์มีการแสดงออกของยีนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นของ OPN ต่างกัน มีความเป็นไปได้ว่า การตรึง OPN บนแผ่นกระจกที่ความเข้มข้นต่างกัน ทำให้รูปแบบการกระจายตัวของ OPN บนแผ่นกระจกไม่เหมือนกัน ซึ่งพิสูจน์ได้โดยใช้เทคนิค Atomic force microscopy (AFM) นอกจากนั้นยีนแต่ละชนิดอาจตอบสนองต่อความเข้มข้น OPN ที่ต่างกัน ซึ่งจะต้องทำการพิสูจน์ต่อไป

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองพบว่า สามารถกราฟต์ PAA บนพื้นผิวกระจกได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวผ่านกลไกแบบ RAFT polymerization เมื่อนำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ในสารละลายไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ทำให้สามารถคำนวณหาค่า DP ได้เท่ากับ 87 และมี % conversion เท่ากับ 97.1 % และคำนวณหาโมเลกุลของ PAA ได้เท่ากับ 6,358 ซึ่งใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลของ PAA ทางทฤษฎี คือ 7,268 ยืนยันการกราฟต์ PAA บนแผ่นกระจกด้วยการวัดมุมสัมผัสของน้ำ พบว่า มีค่า $\theta_{\text{advancing}}$ เท่ากับ $40.4 \pm 3.9^\circ$ แสดงว่าสามารถติด PAA บนแผ่นกระจกได้ และยืนยันการติด PAA บนอนุภาคซิลิกาได้โดยเทคนิค FT-IR โดยพบพีค C=O stretching ที่ 1726 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอกซิลของ PAA

ในส่วนการตรึงโปรตีน OPN บนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วย PAA สามารถตรวจสอบผลการตรึงด้วยการวัดมุมสัมผัสของน้ำพบว่า มีค่า $\theta_{\text{advancing}}$ เท่ากับ $56.1 \pm 4.5^\circ$ และมีค่า θ_{receding} เท่ากับ $35.3 \pm 5.6^\circ$ แสดงว่าพื้นผิวของวัสดุที่ตรึงโปรตีนแล้วมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นเป็นการยืนยันว่าสามารถตรึง OPN บนแผ่นกระจกได้ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) ยังพบการเพิ่มขึ้นของ % N เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของ OPN ที่ใช้ในการตรึงและจากการวิเคราะห์อนุภาคซิลิกากราฟต์ด้วย PAA และติดด้วย OPN ด้วยเทคนิค FT-IR พบพีค C=O stretching ของเอไมด์ของโปรตีน OPN ที่ 1636 cm^{-1} ที่แสดงการติดของ OPN ด้วย

สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ MC-3T3-E1 บนแผ่นกระจกที่กราฟต์ด้วย PAA และตรึงด้วย OPN พบว่าเมื่อเซลล์อยู่ใน media ชนิด OM ที่สามารถช่วยให้เซลล์เกิดกระบวนการ differentiation ไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน media ชนิด GM จากนั้นเมื่อนำไปทดสอบการแสดงออกของยีน NANOG, REX1, OCT4, Coll I, ALP พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีนใน media ชนิด OM ดีกว่า media ชนิด GM โดยมีการแสดงออกของยีน NANOG, REX1, OCT4 มากที่สุดที่ความเข้มข้น OPN ที่ตรึงบนพื้นผิว 1 mg/mL และเซลล์มีการแสดงออกของยีน Coll I, ALP มากที่สุดที่ความเข้มข้น 10 mg/ml และ 5 mg/ml ตามลำดับ แสดงว่า OPN ที่ตรึงบนแผ่นกระจกสามารถกระตุ้นกระบวนการ differentiation ไปเป็นเซลล์กระดูกได้ นอกจากนี้การที่เซลล์มีการแสดงออกของยีนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นของ OPN ต่างกัน มีความเป็นไปได้ว่าการตรึง OPN บนแผ่นกระจกที่ความเข้มข้นต่างกัน ทำให้รูปแบบการกระจายตัวของ OPN บนแผ่นกระจกไม่เหมือนกัน ซึ่งน่าจะพิสูจน์ได้โดยใช้เทคนิค atomic force microscopy (AFM) นอกจากนี้ยืนยันแต่ละชนิดอาจตอบสนองต่อความเข้มข้น OPN ที่ต่างกัน ซึ่งจะต้องทำการพิสูจน์ต่อไป

หากได้ผลการศึกษาที่เหมาะสมจากการใช้กระจกเป็นแบบจำลองแล้ว งานวิจัยที่ควรจะดำเนินการต่อไปในอนาคตจะเป็นการศึกษาการกราฟต์ PAA และตรึงด้วย OPN บนวัสดุที่เป็นไททาเนียม และทำการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Yang, W.; Xi, X.; Si, Y.; Huang, S.; Wang, J.; Cai, K. Surface Engineering of Titanium Alloy Substrates with Multilayered Biomimetic Hierarchical Films to Regulate the Growth Behavior of Osteoblasts. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 4525-4536.
2. Raines, A. L.; Olivares-Navarrete, R.; Wieland, M.; Cochran, D. L.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D. Regulation of Angiogenesis During Osseointegration by Titanium Surface Microstructure and Energy. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4909-4917.
3. Raynor, J. E.; Petrie, T. A.; Fears, K. P.; Latour, R. A.; Garcia, A. J.; Collard, D. M. Saccharide Polymer Brushes to Control Protein and Cell Adhesion to Titanium. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 748-755.
4. Ren, X.; Wu, Y.; Cheng, Y.; Ma, H.; Wei, S. Fibronectin and Bone Morphogenetic Protein-2-Decorated Poly(OEGMA-*r*-HEMA) Brushes Promote Osseointegration of Titanium Surfaces. *Langmuir* **2011**, *27*, 12069-12073.
5. Muir, B. V. O.; Myung, D.; Knoll, W.; Frank, C. W. Grafting of Cross-Linked Hydrogel Networks to Surfaces. *Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 958-966.
6. Kim, S. E.; Kim, C.; Yun, Y.; Yang, D. H.; Park, K.; Kim, S. E.; Jeong, C.; Huh, J. Improving Osteoblast Functions and Bone Formation Upon BMP-2 Immobilization on Titanium Modified with Heparin. *Carbohydrate Polymer* **2014**, *114*, 123-132.
7. Martin, S. M.; Ganapathy, R.; Kim, T. K.; Leach-Scampavia, D.; Giachelli, C. M.; Ratner, B. D. Characterization and Analysis of Osteopontin-immobilized Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Surface. *J. Biomed. Mater. Res A.* **2003**, *67A*, 334-343.
8. Liu, L.; Chen, S.; Giachelli, C. M.; Ratner, B. D.; Jiang, S. Controlling Osteopontin Orientation on Surface to Modulate Endothelial Cell Adhesion. *J. Biomed. Mater. Res A.* **2005**, *74A*, 23-31.
9. Naruapai, B. Protein Patterning on Polymer Brushes of Copolymer between N-acryloxysuccinimide and Poly(ethylene glycol) methacrylate, senior project, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา **2554**.
10. Barbey, R.; Lavanant, L.; Paripovic, D.; Schuwer, N.; Sugnaux, C.; Tugula, S.; Klok, H. Polymer Brushes via Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: Synthesis, Characterization, and Application. *Chem. Rev* **2009**, *109*, 5437-5527.

11. Olivier, A.; Meyer, F.; Raquez, J.-M.; Damman, P.; Dubois, P. Surface-Initiated Controlled Polymerization as a Convenient Method for Designing Functional Polymer Brushes: From Self-Assembled Monolayers to Patterned Surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 157-181.
12. Navarro, M.; Benetti, E.M.; Zapotoczny, S.; Planell, J.A.; Vancso, G.J. Buried. Covalently Attached RGD Peptide Motifs in Poly(methacrylic) Brush Layers: The Effect of Brush Structure on Cell Adhesion. *Langmuir* **2008**, *24*, 10996 – 11002.
13. Audouin, F.; Larragy, R.; Fox, M.; Connor, B.; Heise, A. Protein Immobilization onto Poly(acrylic acid) Functional Macroporous PolyHIPE Obtained by Surface-initiated ARGET ATRP. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3787-3794.
14. Qu, Z.; Hu, F.; Chen, K.; Duen, Z.; Gu, H.; Xu, H. A Facile Route to the Synthesis of Spherical Poly(acrylic acid) Brushes via RAFT Polymerization for High-Capacity Protein Immobilization. *J Colloid Interf. Sci.* **2013**, *398*, 82-87.
15. Wang, Y.; Cui, Y.; Cheng, Z.; Song, L.; Wang, Z.; Han, B. Poly(acrylic acid) brushes pattern as a 3D function biosensor surface for microchips. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *266*, 313-318.



ประวัติผู้วิจัย

นางสาวพณิฏฐา ดำสงแสง เกิดเมื่อวันที่ 3 กันยายน 2535 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) ๔ เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาคือ 42/83 ถนนฉลองกรุง แขวงลำผักชี เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

นางสาวอหทัย จิระรัตนโพธิ์ชัย เกิดเมื่อวันที่ 30 ธันวาคม 2535 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนหอวัง เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาคือ 99/43 หมู่ที่ 2 ซอย 6/8 หมู่บ้านชัยพฤกษ์แจ้งวัฒนะ-ราชพฤกษ์ ถนนราชพฤกษ์ ตำบลบางพลับ อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย