

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน



นายนราวุธ ทองมะโรงสี

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

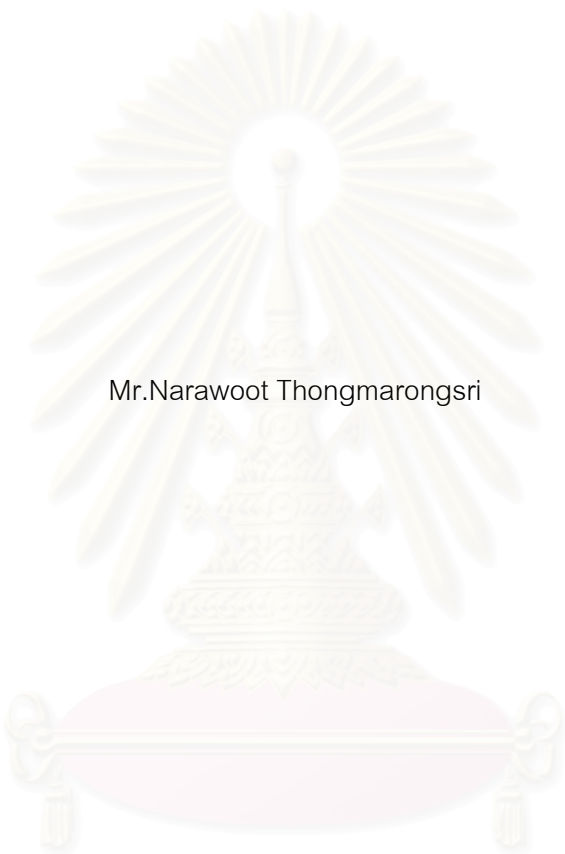
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-5567-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIODEGRADABLE SCAFFOLD FABRICATION FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING



Mr.Narawoot Thongmarongsri

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-5567-8

|                      |   |
|----------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์    | การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน |
| โดย                  | นายนราวุธ ทองมะโรงสี  |
| สาขาวิชา             | วิศวกรรมเคมี  |
| อาจารย์ที่ปรึกษา     | อาจารย์ ดร.ไตรดา กนกพานนท์  |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | อาจารย์ นายแพทย์ถนอม บรรณประเสริฐ   |

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ ตัณฑะพานิชกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(อาจารย์ ดร.ไตรดา กนกพานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(อาจารย์ นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เหมื่อนเดือน พิศาลพงศ์)

นราวุธ ทองมะโรงสี : การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน. (BIODEGRADABLE SCAFFOLD FABRICATION FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING) อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร.ศรดา กนกพานนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ, 105หน้า. ISBN 974-17-5567-8.

โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีความสำคัญในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยทำหน้าที่เป็นโครงที่ให้เซลล์มายึดเกาะ เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเนื้อเยื่อตามชนิดของเซลล์ที่นำมาเลี้ยง งานวิจัยนี้ทำการศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์ชนิด Poly-ε-caprolactone (PCL) ซึ่งเป็นวัสดุสังเคราะห์จำพวกพอลิเอสเทอร์ที่มีความเข้ากันได้กับร่างกายและย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบพูนด้วยการหล่อ (Casting) โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในคลอโรฟอร์มที่ 20, 25 และ 30% (w/v) และใช้สารที่ทำให้เกิดรูพูนได้แก่การใช้เกลือและผงซุสในอัตราส่วนของเกลือ:ผงซุส:PCL ที่ 7.5:7.5:1 และ การใช้เกลือเพียงอย่างเดียวที่อัตราส่วนเกลือ:PCL ที่ 15:1 โดยน้ำหนัก

โครงเลี้ยงเซลล์ PCL ที่ผลิตได้มีค่าความเค้นแรงดึงในช่วง 0.0147 – 0.0784 MPa, ขนาดของรูพูนในช่วง 105 – 205 ไมครอน, ค่าความพูนในช่วง 78.44-85.72% อัตราการย่อยสลายใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่ 0.28% (โดยน้ำหนัก) ต่อสัปดาห์, ในสารละลายเอนไซม์ไคเลสที่ความเข้มข้น 30 U/l ที่ 1.68% (โดยน้ำหนัก) ต่อสัปดาห์ การทดสอบการย่อยสลายในร่างกายโดยการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ในสัตว์ทดลองพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ย่อยสลายไป 53.29% (โดยน้ำหนัก) ในเวลา 3 เดือน ความเข้มข้นของสารละลาย PCL และชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพูนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย

นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการผลิตเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของมนุษย์ (Human Cartilage) ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบพูนรูปใบหูที่ใช้เกลือและผงซุสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพูน (Porogen) โดยใช้เจลของ Calcium Alginate เป็นตัวกระจายเซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte) ในโครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปเลี้ยงภายนอกร่างกายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ามีเซลล์สามารถยึดติดกับโครงเลี้ยงเซลล์ได้ จากนั้นนำไปปลูกถ่ายได้ผิวหนังของสัตว์ทดลอง ในเวลา 6 เดือน พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์นี้สามารถนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้

สงวนลิขสิทธิ์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา .....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4570375421 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: POLYCAPROLACTONE / POROUS SCAFFOLD / CARTILAGE / HUMAN CHONDROCYTE

NARAWOOT THONGMARONGSRI : BIODEGRADABLE SCAFFOLD FABRICATION FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING. THESIS ADVISOR : SORADA KANOKPANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR : TANOM BUNAPRESERT, M.D., 105 pp. ISBN 974-17-5567-8.

Biodegradable scaffold is a very important part of tissue engineering that facilitates cell growth, adhesion, proliferation and differentiation into functional tissue. Porous biodegradable scaffolds composed of a synthetic polymer, poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), were fabricated by solvent casting method, using polymer concentration of 20%, 25% and 30% (w/v). Monosodium glutamate (MSG) and sodium chloride (NaCl) were used as porogens at a ratio of 7.5:7.5:1 (MSG:NaCl:PCL) by weight, or using of NaCl alone as porogen, at a ratio of 15:1 (NaCl:PCL) by weight.

The PCL porous scaffolds have pore size in the range of 105 – 205 micrometers, porosity of 78.44-85.72%, and tensile stress of 0.0147 – 0.0784 MPa. Their degradation rate in phosphate buffer saline (PBS) was approximately 0.28%(wt) per week. The rate was accelerated to 1.68%(wt) in presence of lipase (30/UI). For *in vivo* degradation, the scaffolds degraded by 53.29% (wt) within 3 months. Polymer concentration and type of porogen had no effects on their biodegradabilities.

Ear-shaped porous PCL scaffolds (30% w/v) were used for regeneration of human cartilage in animals. Chondrocyte cells were distributed throughout PCL scaffold in CaCl<sub>2</sub>-crosslinked alginate gel. After 1 week of *In vitro* culture, the cells were found to attach and proliferate well on scaffolds. The scaffolds were then implanted into nude mice. After 6 months of implantation, histological results showed the mature cartilage were formed. This indicated a potential use of PCL/Alginate scaffold for tissue engineering applications.

Department.....Chemical Engineering      Student's signature.....  
Field of study.....Chemical Engineering.      Advisor's signature.....  
Academic year.....2004.....      Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ดร.โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, อ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม, รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, ผศ.ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์, ผศ.ดร.พิชญ์ ศุภผล และ ดร.รัฐพล รังกุพันธ์ เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัยได้อย่างมีถูกต้อง

ขอขอบคุณ ท่านหัวหน้าภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รศ.เสาวรจณ์ ช่วยจุลจิตร์, ผศ.ดร.ศราวุธ ริมดุสิต, ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข, ศุภณ์เครื่องมือ วิเคราะห์และห้องปฏิบัติการเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี, นิสิตห้องปฏิบัติการและวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์ คุณสุจินดา จิตต์ใจฉ่ำ, คุณชิตชนก มิตรอุปถัมภ์ และ คุณสมพงษ์ ชุตินกุลสวัสดิ์ ในการแนะนำให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.พญ.วรรณช ธนากิจ และบุคคลากร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ในการวิเคราะห์ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้

ขอขอบคุณ คุณสุปราณี บุรณประดิษฐ์กุล ที่ให้คำแนะนำในด้านความรู้พื้นฐานของเซลล์ เทคนิคในการเลี้ยงเซลล์ รวมทั้งอนุเคราะห์ในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย, คุณธเนศ ปิติธรรมภรณ์ ที่ให้คำแนะนำในด้านความรู้พื้นฐานด้าน Histology และเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย และ คุณโสภณ ทองอินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณ คุณณัฐพันธ์ ศรีรัตน์ ที่ให้คำแนะนำในการสร้างแบบจำลอง, คุณปณิตาน ชุณหสวัสดิกุล ที่ให้คำแนะนำด้านความรู้พื้นฐานของพอลิเมอร์ และคุณ ปัทม์, คุณ พาน ที่กรุณาผลิตแม่พิมพ์ในการหล่อโครงเลี้ยงเซลล์และให้คำแนะนำในการผลิตแม่พิมพ์

ขอบคุณมากๆ สำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี, ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมเคมีสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย, ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์, ห้องปฏิบัติการ Cellular Immunology Lab, ห้องปฏิบัติการพอลิเมอร์ วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี, น้องๆ G8 และเพื่อนๆ น้องๆ ทีมงานไอทีเว็บไซต์ ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

# สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย .....                                      | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....                                   | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ .....                                      | ฉ    |
| สารบัญ .....   | ช    |
| สารบัญตาราง .....  | ญ    |
| สารบัญภาพ .....  | ฎ    |
| บทที่  |      |
| 1. บทนำ .....  | 1    |
| 1.1 ที่มาของงานวิจัย .....                                 | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....                          | 2    |
| 1.3 ขอบเขตงานวิจัย .....                                   | 2    |
| 2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....                     | 3    |
| 2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ .....                               | 3    |
| 2.2 เซลล์กระดูกอ่อนและเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน .....           | 5    |
| 2.2.1 Hyaline Cartilage .....                              | 5    |
| 2.2.1.1 Hyaline Cartilage's Matrix .....                   | 6    |
| 2.2.2 Elastic Cartilage .....                              | 7    |
| 2.2.3 Fibrocartilage .....                                 | 7    |
| 2.2.4 การเกิดและการเจริญเติบโตของกระดูกอ่อน .....          | 8    |
| 2.3 โครงเลี้ยงเซลล์.....                                   | 8    |
| 2.3.1 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Alginate .....                    | 19   |
| 2.3.2 โครงเลี้ยงเซลล์โคไโตซาน.....                         | 20   |
| 2.3.3 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polycaprolactone .....            | 21   |
| 2.3.4 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polyglycolic acid .....           | 22   |
| 2.3.5 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polylactic acid .....             | 24   |
| 2.3.6 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polylactic co glycolic acid ..... | 25   |
| 2.3.7 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polypropylene fumarate .....      | 26   |
| 2.3.8 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polyethylene oxide .....          | 27   |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.9 โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์อื่นๆ .....                 | 27 |
| 2.4 การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ .....             | 28 |
| 3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย .....                        | 29 |
| 3.1 เซลล์และสัตว์ทดลอง .....                                 | 29 |
| 3.2 เคมีภัณฑ์ .....  | 29 |
| 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย .....                         | 31 |
| 3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง .....                 | 32 |
| 3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบตัวอย่าง .....                    | 32 |
| 3.5.1 กล้องจุลทรรศน์ .....                                   | 32 |
| 3.5.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด .....              | 32 |
| 3.5.3 สไลด์นับเซลล์ .....                                    | 33 |
| 3.5.4 เครื่อง Universal Testing Machine .....                | 33 |
| 3.5.5 เครื่อง Thermogravimetric Analysis .....               | 33 |
| 3.5.6 เครื่อง Differential Scanning Calorimetry .....        | 33 |
| 3.6 ขั้นตอนการทดลอง .....                                    | 34 |
| 3.6.1 การสกัดแยกเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ..... | 34 |
| 3.6.2 การเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ .....                   | 34 |
| 3.6.3 การสร้างโครงเลี้ยงเซลล์PCL แบบพูน .....                | 35 |
| 3.6.4 วิธีการเพาะเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate.....  | 37 |
| 3.6.5 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย .....     | 37 |
| 3.6.6 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง .....      | 37 |
| 3.6.7 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ .....                       | 38 |
| 3.6.8 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ .....                     | 39 |
| 3.6.8.1 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย.....       | 39 |
| 3.6.8.1.1 การย่อยสลายในสารละลาย PBS .....                    | 39 |
| 3.6.8.1.2 การย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปส.....             | 40 |
| 3.6.8.2 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายในร่างกาย .....       | 41 |
| 3.6.9 การตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยการย้อมสี.....                  | 41 |
| 4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง .....                    | 42 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.1 การขยายปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในงานเลี้ยงเซลล์..... | 43  |
| 4.2 การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL.....                | 44  |
| 4.2.1 ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ .....                  | 45  |
| 4.2.2 ขนาดของรูพรุนและความพรุน .....                  | 45  |
| 4.2.2.1 ขนาดของรูพรุน .....                           | 46  |
| 4.2.2.2 ค่าความพรุน .....                             | 49  |
| 4.2.3 ค่าความเค้นแรงดึงของโครงเลี้ยงเซลล์ .....       | 51  |
| 4.2.4 การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ .....    | 52  |
| 4.2.4.1 การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย .....       | 52  |
| 4.2.4.2 การย่อยสลายทางชีวภาพภายในร่างกาย .....        | 58  |
| 4.3 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ .....             | 66  |
| 4.3.1 การเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย .....               | 66  |
| 4.3.2 การเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกาย .....                | 67  |
| 5. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ .....                 | 72  |
| 5.1 สรุปผลการทดลอง .....                              | 72  |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ .....                                  | 73  |
| 5.3 งานวิจัยต่อไปในอนาคต .....                        | 74  |
| รายการอ้างอิง .....                                   | 75  |
| ภาคผนวก .....   | 84  |
| ภาคผนวก ก .....                                       | 85  |
| ภาคผนวก ข .....                                       | 87  |
| ภาคผนวก ค .....                                       | 90  |
| ภาคผนวก ง .....                                       | 91  |
| ภาคผนวก จ .....                                       | 93  |
| ภาคผนวก ฉ .....                                       | 95  |
| ภาคผนวก ช .....                                       | 99  |
| ภาคผนวก ซ .....                                       | 101 |
| ภาคผนวก ฌ.....  | 103 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....                      | 105 |

## สารบัญตาราง

| ตาราง  | หน้า |
|--|------|
| 2.1 เทคโนโลยีในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ .....  | 10   |
| 2.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ...                        | 11   |
| 4.1 ขนาดของผลึกของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน .....  | 44   |
| 4.2 คุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุน .....  | 46   |
| 4.3 ค่าความเค้นแรงดึงของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุน .....   | 51   |
| 4.4 เปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในสัตว์ทดลองระหว่างงานวิจัยนี้<br>และงานวิจัยของ Honda M. และคณะ ..... | 70   |



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

| ภาพประกอบ   | หน้า |
|---|------|
| 2.1 หลักการของงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ .....   | 4    |
| 2.2 เซลล์กระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน .....   | 5    |
| 2.3 Hyaline Cartilage ขยาย 400 เท่า ทำการย้อมสีโดยใช้ Hematoxylin & Eosin .....   | 6    |
| 2.4 ภาพแสดงการเกิด Hyaline Cartilage .....  | 6    |
| 2.5 Elastic Cartilage ขยาย 400 เท่า ทำการย้อมสีโดยใช้ Hematoxylin & Eosin .....   | 7    |
| 2.6 Fibrocartilage ขยาย 400 เท่า ทำการย้อมสีโดยใช้ Hematoxylin & Eosin .....  | 7    |
| 2.7 โครงสร้างของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆที่นำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ .....   | 18   |
| 3.1 กระดูกอ่อนบริเวณซี่โครงของมนุษย์ .....  | 30   |
| 3.2 หนูทดลอง Nude Mouse (BALB/c-nu) เพศเมียอายุ 5 สัปดาห์ .....   | 30   |
| 3.3 รูปแบบแบบในการหล่อโครงเลี้ยงเซลล์และโครงเลี้ยงเซลล์ .....   | 36   |
| 3.4 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย .....  | 38   |
| 3.5 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายในสัตว์ทดลอง .....  | 38   |
| 4.1 แผนผังการทดสอบคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ .....   | 43   |
| 4.2 เซลล์กระดูกอ่อนที่กำลังขยาย 400 เท่า .....  | 44   |
| 4.3 โครงเลี้ยงเซลล์แบบพูนที่ผลิตได้ .....   | 45   |
| 4.4 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพูน<br>โดยมีเกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพูน .....   | 47   |
| 4.5 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพูน<br>โดยมีเกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพูน .....  | 48   |
| 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความพูนและ ความเข้มข้นของสารละลาย PCL<br>ของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพูน.....  | 50   |
| 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเค้นแรงดึงและความเข้มข้นของสารละลาย<br>PCL ของโครงเลี้ยงเซลล์ .....   | 52   |
| 4.8 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ปลูกถ่ายได้ผิวหนังสัตว์ทดลองที่เวลา 5 เดือน .....   | 52   |
| 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนักที่หายไปต่อเวลา การย่อยสลาย<br>ทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL โดยใช้เกลือและผงชูรส<br>เป็นสารทำให้เกิดรูพูน ..... | 54   |

| บทที่   | หน้า |
|---|------|
| 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนักที่หายไปต่อเวลา ของการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกในร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพูน โดยใช้เกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพูน.....  | 55   |
| 4.11 กราฟการดูดความร้อนที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์แบบแผ่นหนาจากโครงเลี้ยงเซลล์ PCL (30% w/v) แบบพูนโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพูน หลังจากการย่อยสลายในสารละลายไอโซโอสโมติกที่เวลาต่างๆ.....       | 57   |
| 4.12 กราฟการวิเคราะห์การสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL (30%w/v) แบบพูนรูปไบโหูดโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพูน โดยใช้เครื่อง TGA หลังจากการย่อยสลายภายในร่างกายที่เวลาต่างๆ.....   | 59   |
| 4.13 กราฟแสดงร้อยละของน้ำหนักที่หายไปต่อเวลาของการของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพูนจาก PCL (30%w/v) รูปไบหูดต่อเวลา ที่มีการย่อยสลายในร่างกายของสัตว์ทดลอง โดยมีเกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพูน .....  | 60   |
| 4.14 กราฟการวิเคราะห์การสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate ที่มีการใช้โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์เป็นเวลา 6 เดือนโดยเครื่อง TGA โครงเลี้ยงเซลล์ PCL (30%w/v) แบบพูนรูปไบโหูดโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพูน ..... | 61   |
| 4.15 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของจาย่อยสลายภายในร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL (30% w/v) แบบพูนรูปไบหูดที่ความเข้มข้นสารละลายโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพูน.....   | 63   |
| 4.16 กราฟการดูดความร้อนที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์รูปไบหูดจาก PCL (30%w/v) แบบพูนโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพูน หลังจากการย่อยสลายในร่างกายสัตว์ทดลองที่เวลาต่างๆ .....                           | 64   |
| 4.17 กราฟแสดงค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์รูปไบหูดจาก PCL (30%w/v) แบบพูนโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพูน หลังจากการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ.....   | 65   |
| 4.18 กราฟแสดงค่าร้อยละของโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์รูปไบหูดจาก PCL (30%w/v) แบบพูนโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพูน หลังจากการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ .....  | 65   |
| 4.19 เซลล์กระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์หลังทำการเลี้ยงภายนอกในร่างกายนาน 1 สัปดาห์ .....  | 66   |
| 4.20 ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการเลี้ยงในสัตว์ทดลอง .....   | 67   |

บทที่

หน้า

4.21 ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ในสัตว์ทดลองที่ผ่านการย้อมสี

แบบ H&E ..... 69



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาของงานวิจัย

งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เป็นศาสตร์ที่นำหลักการของวิศวกรรม และ ชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูรักษา และพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อ (Tissue Function) ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจ จากการประมาณการของกระทรวงสาธารณสุขของประเศสหรัฐอเมริกา ค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยที่สูญเสียอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่างๆ มีค่าใช้จ่ายประมาณ 400,000 ล้านดอลลาร์ต่อปี หรือประมาณ 17.5 ล้านดอลลาร์บาท (Langer R., 2000; Nettle D.L., 2001) ของผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งนับว่าเป็นจำนวนเงินที่มากที่ไม่อาจมองข้ามได้

ประเทศไทยมีปริมาณการใช้เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Cartilage) ที่สามารถนำมาใส่ทดแทนของเดิม เช่น ในการรักษาโรคไขข้อ หรืออุบัติเหตุ ที่ทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกอ่อน ในปริมาณที่มีการเพิ่มขึ้นทุกปี ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีความจำเป็นในระบบการเคลื่อนไหวของร่างกาย เช่น ในข้อต่อต่างๆ อีกทั้งยังใช้ในงานศัลยกรรมต่างๆ อีกด้วย ซึ่งปริมาณของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง เวชภัณฑ์และสารเคมี ที่มีการใช้มีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก จึงทำให้ประเทศไทยต้องเสียดุลการค้า ซึ่งจากข้อมูลของกรมศุลกากร มูลค่าการนำเข้ารวมของสารเคมี ยา และเวชภัณฑ์ ในปี พ.ศ. 2545 มีปริมาณสูงถึง 852,209,666 บาท (กรมศุลกากร, 2546)

ในประเทศไทยนั้น งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เป็นศาสตร์ในแขนงที่ยังใหม่อยู่เนื่องจากเทคโนโลยีที่นำมาใช้ประยุกต์กับงานด้านนี้นั้น ดังที่กล่าวไว้ในข้างต้นแล้วว่า เป็นศาสตร์ที่นำชีววิทยามาประยุกต์ใช้ด้วยนั้น ผู้คนโดยส่วนมากจึงเข้าใจว่า ศาสตร์ด้านนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับเฉพาะสายงานด้านแพทยศาสตร์เท่านั้น ในความเป็นจริงแล้วงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อันเป็นส่วนหนึ่งของงานทางด้านวิศวกรรมการแพทย์ (Biomedical Engineering) เป็นศาสตร์ที่ต้องนำความรู้ทางด้าน วิศวกรรมศาสตร์มาผนวกกับความรู้ทางด้านแพทยศาสตร์ เพื่อศึกษาค้นคว้า และรังสรรค์ผลงานต่างๆ อันที่จะช่วยให้การรักษาทางด้านการแพทย์ได้ก้าวหน้าและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อออกแบบและผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของมนุษย์ โดยใช้วัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) โดยมีวัตถุประสงค์จำเพาะดังต่อไปนี้

1. สร้างโครงเลี้ยงเซลล์ จากพอลิเมอร์ตามธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์ ที่มีความเหมาะสมในการย่อยสลายภายในร่างกาย
2. ศึกษาและทดสอบคุณสมบัติด้านกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ทำการเลี้ยงบนเซลล์โครงเลี้ยงเซลล์
2. การทดสอบคุณสมบัติเชิงกายภาพ ศึกษาจากความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ ในรูปของขนาดของรูพรุน ความพรุน และการทนต่อแรงดึง (Tensile Stress) ของโครงเลี้ยงเซลล์
3. ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้น
4. ทดสอบการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้นในสัตว์ทดลอง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อมีจุดประสงค์หลักในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ทดแทนของเดิม ในปัจจุบันงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีการพัฒนาและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องดังเห็นได้จากงานวิจัยทางด้านนี้ที่มีการตีพิมพ์อย่างมากมาย

งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เริ่มต้นในทศวรรษที่ 1930 โดย Bisceglie ซึ่งนำเซลล์เนื้องอกของหนูมาเลี้ยงในเยื่อแผ่นของพอลิเมอร์ (Polymer Membrane) แล้วทำการใส่เข้าไปที่ช่องว่างบริเวณท้องของหนู และจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่ใส่เข้าไปนั้นสามารถอยู่รอดได้โดยไม่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกัน จากการทดลองครั้งนี้เป็นตัวอย่างของการห่อหุ้มเซลล์ (Cell Encapsulation) ในยุคแรกๆ ซึ่งการห่อหุ้มนั้นจะยอมให้สารอาหาร และของเสียสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) และป้องกันเซลล์ภูมิคุ้มกัน (Immune Cell) และ แอนติบอดี (Antibody) ไม่ให้ทำลายเซลล์ (Langer R., 2000)

ในทศวรรษ 1970 มีการพัฒนาแผ่นเยื่อ ในรูปของเยื่อเลือกผ่าน (Semi-permeable membrane) โดยการทดสอบกับเซลล์ตับอ่อน (Islet Cell) ในปลายทศวรรษ 1970 มีการนำแผ่นคอลลาเจนหรือวัสดุประกอบต่างของคอลลาเจนกับไกลโคซามิโนไกลแคน (Collagen-glycosaminoglycan (GAGs) composite) มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผิวหนัง ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก แผ่นคอลลาเจนนี้ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ 2 มิติ อีกทั้งแผ่นคอลลาเจนได้จากธรรมชาติ จึงไม่เกิดอาการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกัน (Langer R., 2000)

ต่อมาได้มีการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ 3 มิติ ซึ่งสามารถเลี้ยงเซลล์ได้ปริมาณมากและสามารถจัดเรียงตัวเป็นเนื้อเยื่อที่มีรูปแบบตามที่ต้องการได้ง่าย (Koch R.J. and Gorti G.K., 2002) อีกทั้งมีความเหมาะสมในด้านความแข็งแรง ความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการย่อยสลายทางชีวภาพ (Langer R., 2000)

หลักการของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีขั้นตอนโดยทั่วไป ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 2.1)

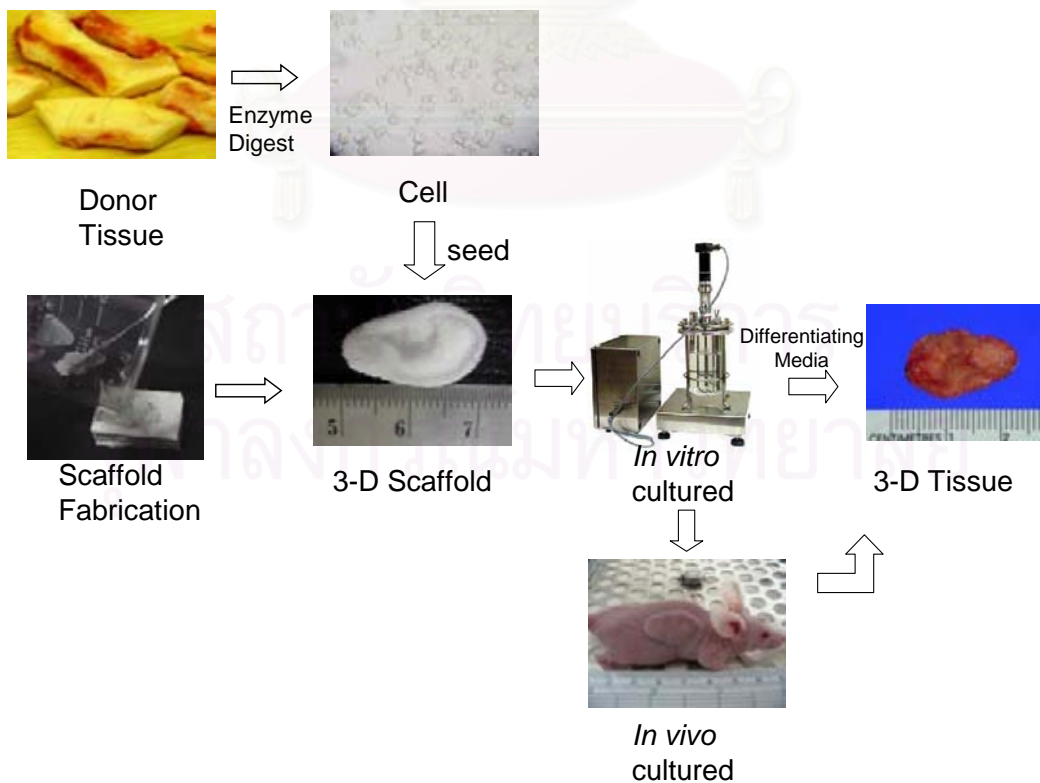
1. สกัดเซลล์จากเนื้อเยื่อจากผู้บริจาคโดยใช้เอนไซม์ในการย่อยเนื้อเยื่อให้เป็นเซลล์
2. ออกแบบและผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความเหมาะสมกับเซลล์และรูปแบบของเนื้อเยื่อจากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ



3. นำเซลล์ที่สกัดออกมาได้ (จากข้อ 1) เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยอาจจะมีการขยายจำนวนเซลล์ในห้องปฏิบัติการก่อนแล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อในสิ่งมีชีวิต ในส่วนที่ต้องการให้เกิดเนื้อเยื่อใหม่
4. เมื่อเซลล์เจริญเติบโตและมีการขยายตัวอย่างเต็มที่ กลุ่มเซลล์จะจัดรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อที่มีคุณสมบัติที่เหมือนกับเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้บริจาค

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีหลักการสำคัญ 3 ประการดังนี้

1. เซลล์ที่มีความเหมาะสมจะต้องบ่งบอกได้ว่าเป็นเซลล์ชนิดใด และสามารถแยก (Isolation) เซลล์จากเนื้อเยื่อได้
2. วัสดุที่นำมาใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ จะต้องสามารถผลิตหรือสังเคราะห์ขึ้นมาได้ สามารถขึ้นรูปให้มีรูปร่างและขนาดตามที่ต้องการได้ และอัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์จะต้องมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเติบโตของเนื้อเยื่อ
3. การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ จะต้องเพาะ (seed) เซลล์อย่างเป็นระเบียบบนวัสดุที่ใช้ และเลี้ยงเซลล์ให้ขยายจำนวนหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiate) ในห้องปฏิบัติการหรือถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) หรืออาจจะปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเติบโตในจำนวนที่เหมาะสมลงในสิ่งมีชีวิตให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อที่ทำงานได้



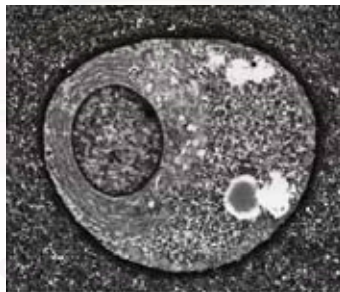
รูปที่ 2.1 หลักการของงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

## 2.2 เซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte) และเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Cartilage)

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ประกอบด้วยเซลล์กระดูกอ่อนที่มีลักษณะยึดหยุ่นและแข็งแรง ซึ่งฝังตัวอยู่ในเนื้อของกระดูกอ่อนที่เรียกว่า extracellular matrix (ECM) เป็นสารจำพวกคอลลาเจน ชนิด II, IX และ XI, chondroitin sulfate (Silver F. and Doillion C., 1989) โดยปกติ เซลล์กระดูกอ่อนนี้จะมีรูปร่างกลมยกเว้นที่ขอบจะมีรูปร่างแบน และมีคุณสมบัติในการยึดติดกับพื้นผิวสูง (รูปที่ 2.2) หน้าที่โดยทั่วไปของกระดูกอ่อน คือ เป็นโครงร่างของตัวอ่อน ให้ความยืดหยุ่นกับโครงร่างนั้น และเป็นตัวรองรับแรงที่เกิดขึ้นบริเวณข้อต่อ

โดยทั่วไปกระดูกอ่อนแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ตามชนิดและปริมาณของ Intercellular Fibers ได้แก่

1. Hyaline Cartilage คือ กระดูกอ่อนที่มีลักษณะกึ่งโปร่งแสง มีสีนํ้านม และมี Matrix ของ โปรตีน, Hyaluronic acid และ คอลลาเจน อยู่บริเวณรอบๆ เซลล์
2. Elastic Cartilage คือ กระดูกอ่อนที่ประกอบด้วยเส้นใย Elastin เป็นส่วนมาก และมีเส้นใย คอลลาเจน จำนวนน้อย
3. Fibrocartilage คือ กระดูกอ่อนที่ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่จัดเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นเป็นจำนวนมาก และมีเส้นใย Elastin จำนวนน้อย



รูปที่ 2.2 เซลล์กระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน  
ที่มา Archer C.W. and Francis-West P., 2003

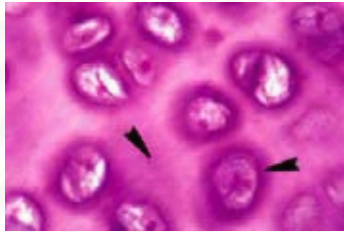
### 2.2.1 Hyaline Cartilage

พบมากที่พื้นผิวบริเวณข้อต่อ โดยที่เซลล์กระดูกอ่อนจะพบอยู่โดดเดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่มๆ ซึ่งอยู่ในช่องว่างที่เรียกว่า Lacunae ที่ฝังอยู่ในเนื้อของกระดูกอ่อน กระดูกอ่อนประเภทนี้รับสารอาหารโดยวิธีการแพร่จากเส้นเลือดที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มกระดูกอ่อน (Perichondrium) เนื่องจากเซลล์กระดูกอ่อนชนิดนี้ไม่มีเส้นเลือดและเส้นประสาทมาหล่อเลี้ยง (รูปที่ 2.3)

### 2.2.1.1 Hyaline Cartilage's Matrix (รูปที่ 2.3)

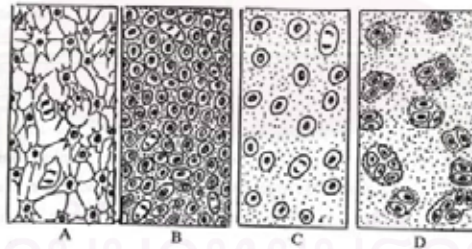
ประกอบด้วย ส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ 75% และ สารอนินทรีย์ 25% โดยทั่วไปแบ่ง Matrix เป็น 2 ส่วนคือ

1. Collagen Fibrils ส่วนมากเรียงตัวเป็นร่างแห มีขนาดบาง และเป็นคอลลาเจนชนิด II
2. Ground Substance เป็นส่วนที่ทำให้มีคุณสมบัติแข็ง พบอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์กระดูกอ่อน (Intercellular Space) ประกอบด้วย Glycosaminoglycan 3 ชนิด คือ Hyaluronic Acid, Chondroitin Sulfate และ Keratan Sulfate



รูปที่ 2.3 Hyaline Cartilage ขยาย 400 เท่า ทำการย้อมสีโดยใช้ Hematoxylin & Eosin (H&E staining)

ที่มา [http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c\\_5.html](http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c_5.html)



รูปที่ 2.4 ภาพแสดงการเกิด Hyaline Cartilage

A: Mesenchymal cell เริ่มต้น

B: Mesenchymal cell แบ่งตัวมากขึ้น ซึ่งอยู่ชิดกันมีลักษณะกลมและไม่มีแขนง เรียกว่า เซลล์กระดูกอ่อน

C: เซลล์กระดูกอ่อนสร้าง Matrix ออกนอกเซลล์ (Extracellular Matrix) ทำให้เซลล์ แยกกัน

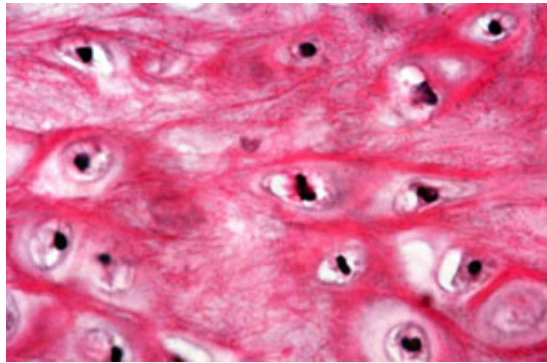
D: เซลล์กระดูกอ่อนแบ่งตัวอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยมี Matrix ซึ่งเป็น Collagen type II

(Archer C.W. and Francis-West P., 2003; Silver F. and Doillion C., 1989) ที่อยู่ติดเซลล์ นั้นเป็นเปลือกหุ้ม

ที่มา วินิตาและคณะ (บรรณานุกรม), 2535

### 2.2.2 Elastic Cartilage

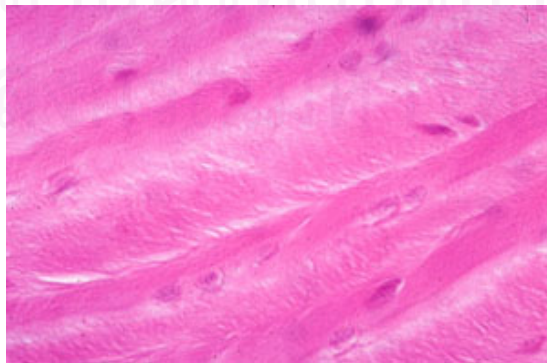
ลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนคล้าย Hyaline Cartilage แต่เส้นใยบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ประกอบด้วยคอลลาเจนและเส้นใย Elastic และมีเส้นใย Elastic เป็นองค์ประกอบที่มีอัตราสูงกว่า ในรูปมัดของเส้นใย Elastic ที่จัดเรียงตัวเป็นโครงข่าย (รูปที่ 2.5) มักพบในโครงสร้างที่มีความยืดหยุ่นสูง เช่น ไบหู



รูปที่ 2.5 Elastic Cartilage ขยาย 400 เท่า ทำการย้อมสีโดยใช้ Hematoxylin & Eosin ที่มา [http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c\\_18.html](http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c_18.html)

### 2.2.3 Fibrocartilage

ลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนคล้าย Hyaline Cartilage แต่ช่องว่างระหว่างเซลล์ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเส้นใย (Fibrous Tissue) เป็นส่วนใหญ่ และไม่พบเยื่อหุ้มกระดูกอ่อนในกระดูกอ่อนชนิดนี้ ซึ่ง Fibrocartilage มีหน้าที่ยึดโครงสร้างต่างๆ โดยที่มีความแข็งแรงสูง พบที่บริเวณรอยต่อระหว่างเยื่อเยื่อกระดูกอ่อนและเนื้อเยื่อรองรับ เช่น ในแผ่นรองกระดูกสันหลังและกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 Fibrocartilage ขยาย 400 เท่า ทำการย้อมสีโดยใช้ Hematoxylin & Eosin ที่มา [http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c\\_21.html](http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c_21.html)

#### 2.2.4 การเกิดและการเจริญเติบโตของกระดูกอ่อน

โครงร่างของกระดูกอ่อนเกิดจากการรวมตัวของ Mesenchymal Cells ซึ่งจะกลายเป็นเซลล์กระดูกอ่อนในเวลาต่อมา จากนั้นเซลล์ที่อยู่ภายในจะผลิตสารและสร้างเมทริกซ์ทำให้เซลล์แยกตัวห่างกัน ต่อมาเซลล์กระดูกอ่อนทำการแบ่งตัวภายในเมทริกซ์เกิด Isogenic Group หรือเรียกว่า Capsule และ Mesenchymal Cells ด้านนอกทำการสร้างเยื่อหุ้มกระดูกอ่อนควบคู่กันไป จากพฤติกรรมของเซลล์กระดูกอ่อนนั้น สามารถสรุปได้ว่าพื้นผิวและรูปร่างของโครงสร้างที่เซลล์กระดูกอ่อนสามารถเกาะติดได้ดีควรมีพื้นที่ผิวในการยึดเกาะสูง ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์โดยส่วนมากมักมีลักษณะเป็นรูพรุน (Porous) และมีลักษณะที่เป็นเส้นใย (Fibers) บ้างขึ้นอยู่กับชนิดลักษณะการใช้งานและหน้าที่ของกระดูกอ่อน

### 2.3 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold)

ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนส่วนประกอบสำคัญที่ใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เป็นเนื้อเยื่อบนโครงสร้างนั้น ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยส่วนมากผลิตมาจากวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Koch R.J. and Gorti G.K., 2002) และวัสดุที่นำมาใช้เป็นโครงสร้างนั้นจะต้องสามารถขึ้นรูปเป็นโครงสร้าง 3 มิติที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอวัยวะที่ทำการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อที่จะนำไปใช้ทดแทน (Langer R., 2000) และเมื่อเซลล์ที่ทำการเลี้ยง (Culture) เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์จนมีปริมาณมากพอ และมีความสมบูรณ์ของเซลล์ จึงทำการเลี้ยงเซลล์เหล่านั้นบนโครงเลี้ยงเซลล์ ให้เจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทำการออกแบบไว้แล้ว จากนั้นจึงทำการใส่เข้าไปแทนที่อวัยวะที่ต้องการ และปล่อยให้กลุ่มเซลล์ที่อยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์เจริญเติบโตเป็นเนื้อเยื่อที่ทดแทนของเดิม ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ก็ถูกย่อยสลายไป (Atala A. and Lanza R.P., 2002) สิ่งที่สำคัญที่สุดคือต้องมีความเหมาะสมทางชีวภาพ (Biocompatibility) คือ สามารถใส่เข้าไปในร่างกายแล้วไม่เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกัน หรืออีกนัยหนึ่งคือโครงเลี้ยงเซลล์นี้ต้องไม่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Boyan B.D. et al., 1999 ;Lu L. et al., 2001; ฤทัย (บรรณารักษ์), 2537)

ในการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ จำต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติที่เหมาะสมที่ใช้กับเซลล์แต่ละชนิด หน้าที่ และโครงสร้าง แต่โดยทั่วไปนั้น คุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีค่าโมดูลัสความยืดหยุ่น (Elastic Modulus) สูงเนื่องจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีค่าโมดูลัสการอัด (Compressive Modulus) ประมาณ 0.79 MPa, โมดูลัสเฉือน (Shear Modulus) ประมาณ 0.68 MPa และ โมดูลัสดึง (Tensile Modulus) ระหว่าง 0.32 – 10.2 MPa (Lu L. et al., 2001) และต้องมีที่ว่างมากพอสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ มีพื้นที่ผิวมาก และมีความพรุนสูง เพื่อเป็นที่ว่างสำหรับการสร้าง

Extracellular Matrix ของเซลล์กระดูกอ่อน โดยทั่วไปโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมมีค่าความพรุน (Porosity) ประมาณ 78% (Lu L. et al., 2001) มีขนาดของรูพรุน (Pore Size) ประมาณ 50 – 300 ไมครอน (Boyan B.D. et al., 1999) และมีการย่อยสลายที่ 6 – 12 เดือน (Lu L. et al., 2001)

ด้านคุณสมบัติเชิงกลนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีคุณสมบัติที่แข็งแรงและคงทนต่อแรง (Load) ที่ได้รับ โดยปราศจากรอยร้าวหรือการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง ดังนั้นปัญหาที่สำคัญในการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์อีกประการหนึ่งคือโครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้นั้นจะต้องมีความแข็งแรงเพียงพอ และวัสดุที่นำมาใช้นั้นจะต้องมีแรงยึดเหนี่ยวภายในและระหว่างโมเลกุล (Intramolecular and Intermolecular bonding) ของพอลิเมอร์ที่มากพอเพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงเพียงพอ แต่ถึงกระนั้นวัสดุเหล่านี้จะต้องมีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ภายในระยะเวลาที่กำหนด (Boyan B.D. et al., 1999; Cancedda R. et al., 2002; Koch R.J. and Gorti G.K., 2002)

ในการผลิตเนื้อเยื่อเพื่อทำการปลูกถ่ายนั้น ประเด็นสำคัญที่ไม่ควรมองข้ามคือ เรื่องของ ที่ว่างที่ใช้ในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ เช่น การแลกเปลี่ยนก๊าซหรือของเหลว, การหายใจ, การกินอาหาร และ ผลกระทบจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้จะใช้สื่อกลางในการแลกเปลี่ยนสารต่างๆ ซึ่งสื่อกลางนี้คือเลือด ดังนั้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อบางชนิดจำเป็นต้องมีการสร้างทางเดินของเลือดด้วย ซึ่งเส้นเลือดระหว่างเซลล์นั้นมีขนาดประมาณ 100 ไมครอน (Hutmacher D.W., 2000; วินิตาและคณะ (บรรณานุกรม), 2535) ดังนั้นในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดของรูพรุนต่ำ จึงต้องนำเรื่องนี้มาพิจารณาด้วย

การสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบัน ได้มีเทคโนโลยีในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีรูปร่าง โครงสร้าง และรูปแบบตามที่ต้องการ รวมทั้งการกำหนดคุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ ในด้านของพื้นที่ผิว ความพรุน ของโครงเลี้ยงเซลล์และขนาดของรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งสามารถผลิตได้จากวัสดุที่มีคุณสมบัติ ด้านการย่อยสลายและการยึดเกาะพื้นผิวของเซลล์จากการศึกษาของ Hutmacher (Hutmacher D.W., 2000) พบว่า วิธีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ มีมากมายหลายวิธีและแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เนื่องจากชนิด วัสดุ รูปร่าง และ โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ ดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เทคโนโลยีในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์<sup>1</sup>

| เทคโนโลยี                                    | ขนาดของรูพรุน<br>( $\mu\text{m}$ ) | ความพรุน (%) |
|--|------------------------------------|--------------|
| การหล่อ (Solvent casting)                    | 30 – 300                           | 20 – 50      |
| เยื่อแผ่นบางแบบซ้อนทับ (Membrane lamination) | 30 – 300                           | < 85         |
| การหลอม (Melt-molding)                       | 50 – 500                           | < 80         |
| การรีด (Extrusion)                           | < 100                              | < 84         |
| การระเหิดแห้ง (Freeze dry)                   | < 200                              | < 97         |
| ของไหลเหนือวิกฤติ (Supercritical-fluid)      | < 100                              | 10 - 30      |

ที่มา Hutmacher, D.W., 2000

สารต่างๆ ที่นำมาใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้ในทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ที่นิยมในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ในยุคแรกๆ คือ วัสดุประกอบแต่งของคอลลาเจนกับโกลโคซามีนโกลแคน จากนั้นได้มีการพัฒนามาใช้ Injectable calcium alginate matrices และใช้ Fibrin Glue (Koch R.J. and Gorti G.K., 2002) ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีข้อจำกัดในด้านการใช้งาน เช่น เรื่องของความแข็งแรง ระยะเวลาในการสลายตัว และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์อีกหลายชนิด เช่น Polycaprolactone, polyorthoester, polyglycolic acid (PGA) poly-L-lactic acid หรือ Polylactide (PLLA) และ Poly-D,L-lactide เป็นต้น (Boyan B.D. et al., 1999; Hutmacher D.W., 2000; Lu L. et al., 2001) รวมทั้งมีการใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น Hyaluronic acid, fibrinogen-fibrin และ Chitosan เป็นต้น (Boyan B.D. et al., 1999; Cancedda R. et al., 2002; Koch R.J. and Gorti G.K., 2002; Lu L. et al., 2001; Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

โดยมากพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาตินั้น มีโครงสร้างที่มีความพรุนสูง ดังนั้นพอลิเมอร์เหล่านี้จึงเป็นที่นิยมในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุน ในทางกลับกันพอลิเมอร์สังเคราะห์ มักมีความพรุนต่ำ แต่มีความสามารถในการยัดให้เป็นเส้นใย (Fiber) ได้ดีกว่า พอลิเมอร์จากธรรมชาติ ดังนั้น พอลิเมอร์ชนิดนี้จึงเป็นที่นิยมในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบเส้นใย (Hutmacher D.W., 2000; Lu L. et al., 2001)

<sup>1</sup> แสดงเพียงบางเทคนิคที่ใช้ และที่ีมีความเหมาะสมกับเครื่องมือที่มีอยู่

ตารางที่ 2.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

| No. | ชนิดของพอลิเมอร์   | วิธีการขึ้นรูป  | ชนิดของเซลล์ที่ใช้         | วิธีการเลี้ยงเซลล์ / เวลา                        | จำนวนเซลล์เริ่มต้น   | ผลการเลี้ยงเซลล์   | สถาบันของผู้ทำวิจัย      | เอกสารอ้างอิง                    |
|-----|--------------------|-----------------|----------------------------|--|--|--|--------------------------|----------------------------------|
| 1   | Alginate           | Ionic Crosslink | Human Chondrocyte          | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 14 วัน    | $4 \times 10^6$ เซลล์ต่อมล. และ $40 \times 10^3$ เซลล์ต่อเม็ด ขนาด 3 – 5 มม. | GAGs เกิดขึ้นและจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $125 \times 10^3$ เซลล์/เม็ด                         | Rush Med College/ USA    | Schluzer M. et al., 2000         |
| 2   | Alginate           | Ionic Crosslink | Bovine Articular Cartilage | <i>in vitro</i> : ใน 24-well plate นาน 14 วัน    | $40 \times 10^3$ เซลล์ต่อเม็ดขนาด 3 มม.                                      | มี ECM เกิดขึ้น ทั้งคอลลาเจนและ GAGs   | Rush Med College/ USA    | Masuda K. et al., 2003           |
| 3   | Alginate           | Ionic Crosslink | MC3T3-E1 Osteoblast        | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 3 สัปดาห์ | $6.7 \times 10^6$ เซลล์ต่อมล.  | ศึกษาการกระจายตัวของเซลล์ โดยใช้วิธีการย้อมสีโดยวิธี H&E พบว่าเซลล์กระจายตัวอย่างเป็นระเบียบ | U of Michigan/ USA       | Kuo C.K. and Ma P.X., 2001       |
| 4   | Alginate           | Ionic Crosslink | Human demal fibroblast     | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 5 วัน     | $200 \times 10^3$ เซลล์ต่อเม็ดขนาด 5 มม.                                     | เซลล์ Fibroblast เปลี่ยนรูปเป็นทรงกลมและมีการเพิ่มของเซลล์                                   | U of Negev/ Israel       | Shapiro L. and Cohen S., 1997    |
| 5   | Cell culture Plate | -               | Human Articular Cartilage  | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 3 สัปดาห์ | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$                                     | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $20 \times 10^3$ cell/ $\text{cm}^2$                                      | Adv Tissue Sci Inc./ USA | Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999 |



|    |                      |                            |  |  |   |  |                             |                                  |
|----|----------------------|----------------------------|--|--|---|--|-----------------------------|----------------------------------|
| 6  | Chitosan             | Freeze dry                 | Pig Cartilage                            | <i>in vitro</i> : ใน bioreactor semi-rotating wall นาน 4 สัปดาห์ | 500x10 <sup>3</sup> เซลล์ต่อมล.                             | มี GAGs และ คอลลาเจน เกิดขึ้น โดยตรวจจากการย้อมสีโดยวิธี H&E                                     | U of Mississippi State/ USA | Nettles D.L., 2001               |
| 7  | Network PCL          | UV Photopolymerization     | Human MG63 Osteoblast                    | <i>in vitro</i> : ใน 12-well plate นาน 4 วัน                     | 1.5x10 <sup>5</sup> เซลล์ต่อมล.                             | เซลล์สามารถแบ่งตัวได้มากขึ้น ถึง 2.67-4.51 รอบ   | Seoul National U/ Korea     | Kweon H.Y., et al., 2003         |
| 8  | PCL                  | Fused deposition modelling | Human fibroblast                         | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 4 สัปดาห์                 | 15x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อมล.                              | มี ECM เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2  | Nation U of Singapore       | Hutmacher D.W., et al., 2001     |
| 9  | PCL                  | Extrusion and knit         | Human craniofacial osteoblast-like cells | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 1 วัน                     | 40x10 <sup>3</sup> เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ขนาด 80x30x3 มม. | ดูการจัดเรียงตัวของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเซลล์มีรูปร่างเรียวยาวและจัดตัวเป็นกลุ่มแบบก้อนหอย | U of Nottingham UK          | Corden T.J., et al., 2000        |
| 10 | PCL Film             | Solvent Casting            | Human Articular Cartilage                | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 3 สัปดาห์                 | 6.5x10 <sup>3</sup> เซลล์ต่อ ซม. <sup>2</sup>               | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 10x10 <sup>3</sup> เซลล์ต่อ ซม. <sup>2</sup>                                  | Adv Tissue Sci Inc./ USA    | Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999 |
| 11 | 50/50 PCL-PLA Sponge | Freeze dry                 | Lewis Rats Cartilage                     | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ 3 สัปดาห์                     | 10x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อมล.                              | เป็นกระดูกอ่อน โดยตรวจจากการย้อมสี   | Nagoya University/ Japan    | Honda M., et al., 2000           |

|    |                     |                 |                           |  |  |  |                          |                                  |
|----|---------------------|-----------------|---------------------------|--|--|--|--------------------------|----------------------------------|
|    |                     |                 |                           | <i>in vivo</i> : ฝังใต้ผิวหนังของ Nude mouse           |  | โดย Hematotoxin & Eosin  |                          |                                  |
| 12 | PDLA Film           | Solvent Casting | Human Articular Cartilage | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 3 สัปดาห์       | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$ | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $24 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$                   | Adv Tissue Sci Inc./ USA | Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999 |
| 13 | 9/91 PDLA-PCL Film  | Solvent Casting | Human Articular Cartilage | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 3 สัปดาห์       | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$ | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $10.4 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$                 | Adv Tissue Sci Inc./ USA | Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999 |
| 14 | 90/10 PDLA-PCL Film | Solvent Casting | Human Articular Cartilage | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 3 สัปดาห์       | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$ | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $18.8 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$                 | Adv Tissue Sci Inc./ USA | Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999 |
| 15 | PDO Film            | Solvent Casting | Human Articular Cartilage | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยงเซลล์ นาน 3 สัปดาห์       | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$ | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $18 \times 10^3$ เซลล์ต่อ $\text{cm}^2$                   | Adv Tissue Sci Inc./ USA | Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999 |
| 16 | PEO Gel             | Gelation        | Calf Articular Cartilage  | <i>in vivo</i> : ฉีดเข้าไปใน Nude Mouse นาน 12 สัปดาห์ | $10 \times 10^6$ เซลล์ต่อมล.             | เป็นกระดูกอ่อน โดยตรวจจากการย้อมสีโดยวิธี H&E และมีการเกิดขึ้นของ GAGs 3.54% | Harvard Med School/ USA  | Sims C.D., et al., 1996          |

|    |                     |                 |                            |  |   |   |                          |                                   |
|----|---------------------|-----------------|----------------------------|--|---|---|--------------------------|-----------------------------------|
| 17 | PEO Gel             | UV Crosslink    | Bovine Articular Cartilage | <i>in vivo</i> : ฉีดเข้าไปใน Nude Mouse นาน 7 สัปดาห์                  | 50x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อมล.  | จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 30-40% มี Proteoglycan สะสม ในอัตรา 1.5-2.8% และ Collagen 5-6.5%                                    | MIT/ USA                 | Elisseeff J., et al., 1999        |
| 18 | Fiber PGA           | Extrusion       | Bovine Articular Cartilage | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง เซลล์ โดยมี Orbital Shaker นาน 8 สัปดาห์ | 5x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ หรือ 1.25x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อมล. | 7.65 - 10.7 x 10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์   | MIT/ USA                 | Freed L.E. et al., 1994           |
| 19 | Fiber PGA           | Extrusion       | Bovine Articular Cartilage | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง เซลล์และ Spinner flask นาน 8 สัปดาห์     | 7x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 5 มม. | ใน Petridish 11.5 x 10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ใน Spinner flask 21x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ | MIT/ USA                 | Vunjak-Novakovic G., et al., 1996 |
| 20 | PGA Film            | Solvent Casting | Human Articular Cartilage  | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง เซลล์ นาน 3 สัปดาห์                      | 6.5x10 <sup>3</sup> เซลล์ต่อ ซม. <sup>2</sup>                                   | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 29.6x10 <sup>3</sup> เซลล์ต่อ ซม. <sup>2</sup>   | Adv Tissue Sci Inc./ USA | Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999  |
| 21 | Porous 97% PGA Mesh | -               | Cow Articular Cartilage    | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง เซลล์ โดยมี Orbital Shaker นาน 6 สัปดาห์ | 15x10 <sup>6</sup> เซลล์ต่อมล.  | มี GAGs เกิดขึ้น 21.6% โดยน้ำหนักแห้ง และคอลลาเจน 8.2%  | Adv Tissue Sci Inc./ USA | Schrieber R.E., et al., 1999      |

|    |                    |                         |   |  |   |   |                             |   |
|----|--------------------|-------------------------|---|--|---|---|-----------------------------|---|
| 22 | 67/33<br>PGTMC     | Solvent Casting         | Human Articular<br>Cartilage                            | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์ นาน 3 สัปดาห์   | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ<br>ชม. <sup>2</sup>  | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น<br>$30 \times 10^3$ เซลล์ต่อชม. <sup>2</sup>                               | Adv Tissue Sci<br>Inc./ USA | Ishuag-<br>Riley, S.L.,<br>et al., 1999 |
| 23 | PLA                | Custom coring<br>device | New Zealand White<br>Rabbits Rib<br>Perichondrium       | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์ 4 วัน<br><i>in vivo</i> : สัตว์ทดลอง<br>1 ปี                            | $100-150 \times 10^3$<br>เซลล์ต่อมล.  | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 110 -<br>$165 \times 10^3$ เซลล์ต่อมล.<br>และมีปริมาณ<br>Collagen ถึง 75 % | U of CA San<br>Diego/ USA   | Douchis<br>J.S., et al.,<br>2000        |
| 24 | PLA (ADD™<br>Cube) | -                       | New Zealand Rabbit<br>costal Perichondrium<br>Allogenic | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์นาน 3 สัปดาห์  | $6 \times 10^6$ เซลล์<br>ต่อมล.   | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1.2 -<br>$2 \times 10^6$ เซลล์ต่อโครง<br>เลี้ยงเซลล์                       | U of CA San<br>Diego/ USA   | Chu C.R,<br>et al., 1995                |
| 25 | PLA (ADD™<br>Cube) | -                       | Rabbit Costal<br>Perichondrium                          | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์ นาน 3 สัปดาห์<br><i>in vivo</i> : ในกระท้าย<br>ขานิวซีแลนด์ นาน<br>1 ปี | $1 \times 10^6$ เซลล์<br>ต่อมล. หรือ<br>$200 \times 10^3$ เซลล์ต่อ<br>โครงเลี้ยงเซลล์ | มี Collagen Type II<br>เป็น 82% จากก่อนการ<br>ทดลองมีปริมาณ 19%                               | U of CA San<br>Diego/ USA   | Chu C.R.,<br>et al., 1997               |
| 26 | PLA Film           | Solvent Casting         | Human Articular<br>Cartilage                            | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์ นาน 3 สัปดาห์   | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ<br>ชม. <sup>2</sup>  | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น<br>$9.6 \times 10^3$ เซลล์ต่อชม. <sup>2</sup>                              | Adv Tissue Sci<br>Inc./ USA | Ishuag-<br>Riley, S.L.,<br>et al., 1999 |
| 27 | 85/15PLGA<br>Film  | Solvent Casting         | Human Articular<br>Cartilage                            | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์ นาน 3 สัปดาห์   | $6.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อ<br>ชม. <sup>2</sup>  | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น<br>$18.8 \times 10^3$ เซลล์ต่อชม. <sup>2</sup>                             | Adv Tissue Sci<br>Inc./ USA | Ishuag-<br>Riley, S.L.,<br>et al., 1999 |

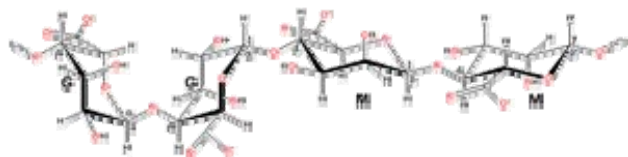
|    |   |                              |  |  |  |   |   |  |
|----|---|------------------------------|--|--|--|---|---|--|
| 28 | PLGA  | Direct<br>Condensation       | NIH-3T3 mouse<br>Fibroblast            | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์นาน 2 วัน      | $1.77 \times 10^4$ เซลล์ต่อ<br>ชม. <sup>2</sup>                                    | เซลล์เกาะที่พื้นผิว<br>$1.5 \times 10^4$ เซลล์ต่อชม. <sup>2</sup>           | Tokyo Med and<br>Dental U/ Japan        | Iwasaki Y.,<br>et al., 2002              |
| 29 | PLGA/PMEH                                       |                              | NIH-3T3 mouse<br>Fibroblast            | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์นาน 2 วัน      | $1.77 \times 10^4$ เซลล์ต่อ<br>ชม. <sup>2</sup>                                    | เซลล์เกาะที่พื้นผิว 8-<br>$11 \times 10^3$ เซลล์ต่อชม. <sup>2</sup>         | Tokyo Med and<br>Dental U/ Japan        | Iwasaki Y.,<br>et al., 2002              |
| 30 | Polyrotaxane/<br>Cholesterol                    | Polymerization<br>in Solvent | Rabbit Cartilage                       | <i>in vitro</i> : ใน 24-well<br>plate นาน 28 วัน     | $100 \times 10^3$ เซลล์ต่อ<br>โครงเลี้ยงเซลล์                                      | เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $1.1-2 \times 10^6$ เซลล์ต่อโครง<br>เลี้ยงเซลล์          | Japan Science<br>and Technology<br>Corp | Tachaboon<br>yakiat, W.,<br>et al., 2003 |
| 31 | PPF/B-TCP                                       | Ionic Crosslink              | Sprange-Dawley rat's<br>femur & tibias | <i>in vitro</i> : ในจานเลี้ยง<br>เซลล์ นาน 4 สัปดาห์ | $53 \times 10^3$ เซลล์<br>ต่อมล.   | เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น<br>$130 \times 10^6$ เซลล์ต่อมล.<br>และมี GAGs เกิดขึ้น | Rice University/<br>USA                 | Kuo C.K.<br>and Ma<br>P.X., 2001         |
| 32 | Starch/Cellulose<br>Acetate<br>(SCA)            | -                            | L929 Mouse<br>Fibroblast               | <i>in vitro</i> : ใน 6-well<br>plate นาน 7 วัน       | $33 \times 10^3$ เซลล์<br>ต่อมล. ใส่ไป 5<br>มล. ทั้งหมด<br>$165 \times 10^3$ เซลล์ | จำนวนเซลล์ที่สามารถ<br>เกาะได้ $116 \times 10^3$ เซลล์                      | U of Minho<br>Portugal                  | Marques<br>A.P., et al.,<br>2002         |
| 33 | Starch/ethylene<br>vinyl<br>alcohol<br>(SEVA-C) | -                            | L929 Mouse<br>Fibroblast               | <i>in vitro</i> : ใน 6-well<br>plate นาน 7 วัน       | $33 \times 10^3$ เซลล์<br>ต่อมล. ใส่ไป 5<br>มล. ทั้งหมด<br>$165 \times 10^3$ เซลล์ | จำนวนเซลล์ที่สามารถ<br>เกาะได้ $110 \times 10^3$ เซลล์                      | U of Minho<br>Portugal                  | Marques<br>A.P., et al.,<br>2002         |

|    |                     |                             |                   |   |   |  |  |                           |
|----|---------------------|-----------------------------|-------------------|---|---|--|--|---------------------------|
| 34 | Polyethylene glycol | Crosslink with polyrotaxane | NIH3T3 Fibroblast | <i>in vitro</i> : ใน Petri Dish นาน 3 วัน | $5 \times 10^4$ เซลล์ต่อ ซม. <sup>2</sup> | จำนวนเซลล์ที่สามารถเกาะได้ $3.2 \times 10^4$ เซลล์ต่อ ซม. <sup>2</sup> | Japan Advanced Institute of Science and Technology | Watanabe J., et al., 2002 |
|----|---------------------|-----------------------------|-------------------|---|---|--|--|---------------------------|

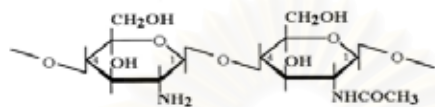
หมายเหตุ สภาวะในการเลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5%



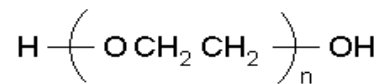
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



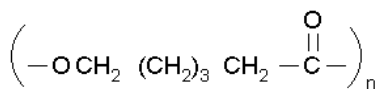
Alginate



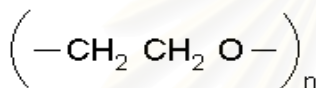
Chitosan



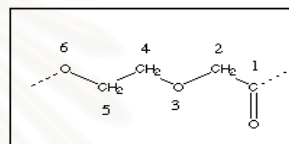
Polyethylene Glycol (PEG)



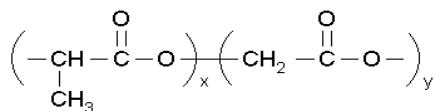
Polycaprolactone (PCL)



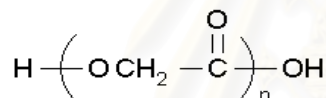
Polyethylene Oxide (PEO)



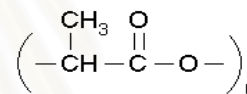
Polydioxanone (PDO)



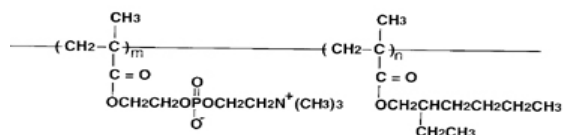
Poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA)



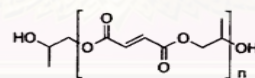
Polyglycolide (PGA)



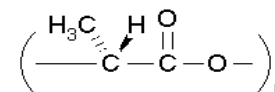
Poly-DL-lactide (PDLA)



2-metacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer (PMEH)



Polypropylene Fumarate (PPF)



Poly-L-lactide (PLA)

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆที่นำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ (Sigma-Aldrich, 2002, Chaplin M., 2003, Iwasaki Y., et. al., 2002)

### 2.3.1 โครงสร้างเชิงเซลล์ Alginate (Alginate-based Scaffold)

Alginate เป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (Brown Algae) ซึ่ง Alginate ที่ใช้เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยบล็อกของ 1,4-linked  $\beta$ -D-mannuronic (M) และ  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) (รูปที่ 2.7) ในอัตราส่วนของ  $\beta$ -D-mannuronic acid ต่อ  $\alpha$ -L-guluronic acid มีค่าประมาณ 30:70 (Shapiro L. and Cohen S., 1997) ซึ่งในการจำหน่ายเชิงการค้าจะอยู่ในรูปของเกลือของกรด Alginic เช่น Sodium Alginate

โดยปกติ Alginate มีมวลโมเลกุลประมาณ 5,000 – 200,000 (Eiselt P. et al., 2000) โดยความหนืด ( $\eta$ ) แปรผันตามมวลโมเลกุลของ Alginate ดังสมการ

$$[\eta] = 2.0 \times 10^{-5} M \quad \text{----- (6)}$$

เมื่อ M คือมวลโมเลกุลของ Alginate (Kuo C.K. and Ma P.X., 2001)

ในด้านการใช้งาน Alginate จะใช้งานในรูปแบบของ Hydrogel ที่มีขนาดของรูพรุนต่ำซึ่งทำหน้าที่ตรึงเซลล์ให้อยู่กับที่ โดยยอมให้อาหาร น้ำ และของเสียแพร่ผ่านไป (Eiselt P. et al., 2000) ส่วนมากจะใช้งานที่ความเข้มข้น 0.5% - 4% (w/v) ในน้ำ (Kuo C.K. and Ma P.X., 2001; Masuda K. et al., 2003; Schulze M. et al., 2000) ซึ่ง Alginate มีสภาพขั้วลบที่แรง ดังนั้นสามารถเกิดการเชื่อมโยง (Crosslink) กับ สารที่มีสภาพขั้วบวกในการเกิดเป็นเจลได้ โดยมากนิยมใช้  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นตัวเชื่อมโยง (Eiselt P. et al., 2000; Kuo C.K. and Ma P.X., 2001; Masuda K. et al., 2003; Shapiro L. and Cohen S., 1997) ทำให้เกิดเป็นเจลที่ไม่ละลายน้ำ (Shapiro L. and Cohen S., 1997) ซึ่งใช้เวลาในการเกิดเจล (Gelation time) ใช้เวลาประมาณ 20 - 60 วินาที ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างของเจลและความเข้มข้นของ  $\text{Ca}^{2+}$  ในสารละลาย (Kuo C.K. and Ma P.X., 2001)

การเกิดเจลของ Alginate กับ  $\text{Ca}^{2+}$  เกิดขึ้นโดยหมู่ Carboxylic ของทั้ง 1,4-linked  $\beta$ -D-mannuronic และ  $\alpha$ -L-guluronic acid ซึ่งจับโมเลกุลของน้ำให้อยู่ในรูปแบบของ  $\text{H}_3\text{O}^+$  ซึ่งส่งผลให้เกิดพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond หรือ H-bond) ที่หมู่ Carboxylate ที่เกิดขึ้นของ 1,4-linked  $\beta$ -D-mannuronic และ  $\alpha$ -L-guluronic acid ในรูปของไดเมอร์ (Dimer) ซึ่ง  $\text{Ca}^{2+}$  จะเข้าแทนที่พันธะไฮโดรเจนของโมเลกุล Guluronate ได้ แต่  $\text{Ca}^{2+}$  ไม่สามารถแทนที่พันธะไฮโดรเจนของโมเลกุล Mannuronate ได้ ดังนั้น Alginate ที่มีปริมาณของ  $\alpha$ -L-guluronic acid สูงจะสามารถเกิดเจลได้ง่ายกว่า Alginate ที่มีปริมาณของ  $\alpha$ -L-guluronic acid ต่ำ (Chaplin, M., 2003)

ด้านคุณสมบัติเชิงกล Alginate ที่มีมวลโมเลกุลสูง จะมีคุณสมบัติในการรับแรงได้ดีกว่า Alginate ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เนื่องจากพันธะโควาเลนต์ภายในโมเลกุล (Intra-molecular covalent bond) ของ Alginate มีผลต่อความแข็งแรงของพอลิเมอร์มากกว่าผลจากพันธะไอออนิก ระหว่าง



โมเลกุล (Inter-molecular ionic bond) ที่เกิดจากการ Crosslink ของ  $Ca^{2+}$  (Kuo C.K. and Ma P.X., 2001)

คุณสมบัติด้านชีวภาพ Alginate มีความคล้ายคลึงกับคอลลาเจนซึ่งมีการนำ Alginate มาใช้งานในด้านต่างๆ เช่น การตกแต่งแผล การส่งผ่านยาในรูปแบบของ Injectable Calcium Alginate เป็นต้น Alginate ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและ สหภาพยุโรป ในด้านการเข้ากันได้ทางชีวภาพ ในขณะที่การย่อยสลายนั้น Alginate 1% ที่ Crosslink ด้วยสารละลาย  $CaCl_2$  ที่ความเข้มข้น 102 mM มีระยะเวลาในการย่อยสลายประมาณ 90 วันในอาหารเลี้ยงเซลล์จาก Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) และ Fetal Calf Serum (FCS) 10% (Shapiro L. and Cohen S., 1997)

มีรายงานถึงการทดลอง โดยใช้ Alginate เป็นโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน เป็นระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เซลล์กระดูกอ่อนมีการสร้าง Matrix ภายนอกเซลล์ ในรูปของคอลลาเจนชนิด II และ Proteoglycan ในสัปดาห์ที่สองเซลล์กระดูกอ่อนมีการจัดเรียงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างสมบูรณ์ (Schulze M., et al., 2000, Masuda K., et al., 2003)

### 2.3.2 โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน (Chitosan-based scaffold)

ไคโตซานเป็นสารประเภท linear aminopolysaccharide ที่มีโครงสร้างเป็น  $\beta(1\rightarrow4)$ -linked glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine (รูปที่ 2.7) ซึ่งเป็นสารที่เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เป็นสารในโครงสร้างของร่างกายของสัตว์จำพวก Arthropod ที่มีเปลือกแข็งหุ้มร่างกาย

ไคโตซานมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50,000 – 1,000,000 คุณสมบัติโดยทั่วไป คือ มีโครงสร้างเป็นโครงร่างผลึก (Crystalline) เป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติประเภทย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีความสามารถในการละลายในสารละลายที่เป็นกรด ที่มีค่า pH < 6 และไม่ละลายในสารละลายที่มีค่า pH > 7 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไคโตซานจัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการละลายแบบที่ขึ้นกับค่า pH (pH-dependent soluble) (Francis-Suh J.-K. and Matthew H.W.T., 2000) เมื่อนำไคโตซานมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า มีขนาดของรูพรุนระหว่าง 1 – 250 ไมครอน (Madihally S.V. and Matthew H.W.T., 1999) และมีโมดูลัสความยืดหยุ่น ตั้งแต่ 0.03 – 7 MPa (Francis-Suh J.-K. and Matthew H.W.T., 2000) และสามารถทนความเครียด (Strain) ได้ 30% - 110% ซึ่งขึ้นอยู่กับรูปร่างและโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่จะนำไปใช้ (Madihally S.V. and Matthew H.W.T., 1999) ซึ่งความแข็งแรงในระดับนี้ นับว่ามีความเพียงพอสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อในการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (Lu L. et al., 2001)

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซาน โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการระเหิดแห้ง (Freeze dry) ที่อุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง -78 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีการเตรียมในลักษณะนี้ จะได้ขนาดรูพรุน (เส้น

ผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุน) ในโครงเลี้ยงเซลล์ประมาณ 100 – 230 ไมครอน ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไคโตซานและ อุณหภูมิในการ Freeze-dry ถ้าหากอุณหภูมิที่ใช้ต่ำ ขนาดของรูพรุนมีขนาดเล็กตามไปด้วย (Madihally S.V. and Matthew H.W.T., 1999; Nettles D.L., 2001)

ด้านคุณสมบัติด้านชีวภาพ ไคโตซานมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ประเภท Glycosaminoglycan ซึ่งพบใน Hyaline Cartilage's Matrix ดังนั้น ปัญหาทางด้านความเข้ากันได้กับร่างกาย และ กิจกรรมทางชีวภาพ (Bioactivity) ต่างๆ จึงไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญในด้านการผลิต (Francis-Suh J.-K. and Matthew H.W.T., 2000; Madihally S.V. and Matthew H.W.T., 1999)

ในปัจจุบัน ประเทศไทยสามารถผลิตไคโตซานในระดับที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร (Food Grade) ที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่า %DAC (Percent of Deacetylated) ตั้งแต่ 0% ถึง 95% ซึ่งค่า %DAC ใช้บ่งบอกถึงความเป็นผลึกของไคโตซานโดยที่ 0 %DAC หรือ ไคติน คือมีหมู่ Acetyl อยู่ในโครงสร้างทั้งหมด และที่ 100 %DAC หรือไคโตซาน คือ ไม่มีหมู่ Acetyl ในโครงสร้าง

ในการใช้ไคโตซานเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า ในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนที่ความเข้มข้น  $6 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไปได้ 1 สัปดาห์ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นถึง  $66 \pm 28\%$  ในขณะที่ปริมาณของ Proteoglycan ที่เกิดขึ้นที่ผิวของไคโตซานมีปริมาณ  $2580 \pm 460$  cpm/ $10^6$  เซลล์ (Francis-Suh J.-K. and Matthew H.W.T., 2000)

### 2.3.3 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polycaprolactone (PCL Scaffold)

PCL (รูปที่ 2.7) เป็น พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสายโซ่ตรงยาว (Aliphatic Polymer) จัดอยู่ในกลุ่ม Polyester (Kweon H.Y. et al., 2003) ผลิตจากมอนอเมอร์ที่มีชื่อว่า 2-methylene-1,3-dioxepane (Elfick A.P.D., 2002) และอาศัยปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) ในการเกิดเป็น PCL ซึ่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน เกิดที่  $80^{\circ}\text{C}$  ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน และใช้ diethyl-zinc เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Corden T.J. et al., 2000)

PCL ที่นำมาใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีมวลโมเลกุลประมาณ 25,000 – 75,000 (Corden T.J. et al., 2000; Hutmacher D.W. et al., 2001; Kweon H.Y. et al., 2003) มีจุดหลอมเหลว ( $T_m$ ) ที่  $50 - 60^{\circ}\text{C}$  ความหนาแน่นที่ 1.145 กรัมต่อมิลลิลิตร (ที่มวลโมเลกุล 60,000) (Corden T.J. et al., 2000) ค่าพลังงานหลอมเหลวของโครงสร้างผลึก (Heat of Fusion –  $\Delta H_f$ ) ประมาณ 135.44 – 135.56 จูลต่อกรัม ที่โครงสร้างผลึกสมบูรณ์ (Fully Crystalline) แต่ในการใช้งานตามปกติมีค่า พลังงานหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกที่ 62.2 – 73.2 จูลต่อกรัม (Corden T.J. et al., 2000; Kweon H.Y. et al., 2003) ในขณะที่ PCL มีความพรุนที่ 55 – 61% (Hutmacher D.W. et al., 2001) มีค่าโมดูลัสแรงดึง (Tensile Modulus) ที่ 400 – 600 MPa

(Corden T.J. et al., 2000) และมีค่าของโมดูลัสการอัด (Compressive Modulus) ที่ 1.58 – 6.9 MPa (Kweon H.Y. et al., 2003)

คุณสมบัติเชิงชีวภาพของ PCL มีระยะเวลาในการย่อยสลายที่ 24 – 36 เดือนในสารละลายที่มีเซลล์ Fibroblast อยู่ (Hutmacher D.W., 2000) โดยที่การสลายตัวของ PCL จะได้มอนอเมอร์ชื่อว่า Caproic Acid โดย PCL ได้รับการรับรองจาก องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาในด้านการใช้งานด้านการแพทย์ ดังนั้นในการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน จึงสามารถใช้ ได้ โดยไม่มีผลจากปัญหาด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Corden T.J. et al., 2000; Kweon H.Y. et al., 2003; Gunatillake P.A., 2003)

การประยุกต์ใช้งาน PCL ในด้านงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน มีรูปแบบการใช้งานในช่วงแรกเป็นแผ่นฟิล์มบาง ซึ่งใช้ช่วยในการเพิ่มการยึดติดของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในบริเวณข้อต่อ ต่อมามีการพัฒนาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำซึ่งเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PCL และ Poly-L-lactide (Lu L. et al., 2001) และมีการนำเทคนิค Microfabricate ในการผลิต ซึ่งให้โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะเป็นระเบียบ เช่น รูปร่างขี้ผึ้ง ที่มีความแข็งแรงสูง แต่มีข้อเสียในด้านต้นทุนในการผลิตสูง (Hutmacher et al., 2001)

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL มักผลิตจากพอลิเมอร์ผสม คือ นำ PCL ไปผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น เพื่อลดระยะเวลาในการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์และเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก PCL เพียงอย่างเดียวจะใช้เวลาในการย่อยสลายประมาณ 24 - 36 เดือนในสารละลาย Fibroblast ดังที่กล่าวไว้ในตอนต้นแล้ว แต่เมื่อใช้พอลิเมอร์ผสม เช่น ผสมกับ Poly-D,L-Lactide จะใช้ระยะเวลาในการย่อย สลายเริ่มต้นที่ประมาณ 3 เดือน (Elfick A.P.D., 2002; Hutmacher D.W., 2000; Hutmacher et al., 2001; Lu L. et al., 2001; Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003)

ในการใช้ PCL เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเลี้ยง Fibroblast ที่ความเข้มข้น  $15 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในสัปดาห์แรก Fibroblast มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และเซลล์มีการจัดเรียงตัวแบบ Multilayer และในสัปดาห์ที่สอง Fibroblast เริ่มสร้างเมตริกซ์ภายนอกเซลล์ และเริ่มจัดเรียงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อ และมีการจัดเรียงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อโดยสมบูรณ์ เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 4 (Hutmacher et al., 2001)

#### 2.3.4 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polyglycolic acid (Polyglycolic acid scaffold)

Polyglycolic acid (รูปที่ 2.7) พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสายโซ่ตรงยาว (Aliphatic Polymer) จัดอยู่ในกลุ่มพอลิเอสเตอร์ (Lu L. et al., 2001) ผลิตได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของ cyclic

glycolide ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงของไดเมอร์ของ glycolic acid ที่  $175^{\circ}\text{C}$  โดยมี Stannous octoate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003)

Polyglycolic acid ที่นำมาใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 (Ishuag-Riley S.L., et al., 1999) มีจุดหลอมเหลว ( $T_m$ ) ที่  $225 - 230^{\circ}\text{C}$  (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003) ในขณะที่ Polyglycolic acid มีความพรุนที่ 50 - 97% (Schreiber R.E., et al., 1999) มีค่าโมดูลัสแรงดึง (Tensile Modulus) ที่ 7000 MPa ซึ่งขึ้นกับวิธีการขึ้นรูปของโครงเลี้ยงเซลล์ (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003)

คุณสมบัติเชิงชีวภาพของ Polyglycolic acid มีระยะเวลาในการย่อยสลายที่ 6 - 12 เดือนในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยที่การสลายตัวของ Polyglycolic acid จะได้มอนอเมอร์ชื่อว่า Glycolic Acid ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ตามธรรมชาติ ดังนั้นในการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน จึงสามารถใช้ได้ โดยไม่มีผลจากปัญหาด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003)

การใช้งานของ Polyglycolic acid มักนำไปใช้ในรูปแบบของ โคพอลิเมอร์กับ Polylactic acid มากกว่าที่จะใช้งานในรูปแบบของ Polyglycolic acid อย่างเดียว เนื่องจาก โครงสร้างที่เป็นผลึกสูงและยากต่อการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์โดยทั่วไป ซึ่ง Polyglycolic acid สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนในโครงสร้างเป็นจำนวนมากเช่น Hexafluoro Isopropanol โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก Polyglycolic acid จะให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วงต้นและสร้าง Extracellular Matrix ที่สูงและมีการส่งเสริมการเปลี่ยนรูป (Differentiate) ของเซลล์กระดูกอ่อน (Lu L. et al., 2001)

จากการศึกษาของ Freed L.E. และคณะ (ตารางที่ 2.2) ทำการศึกษาการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนโดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก Polyglycolic acid โดยเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่  $6 \times 10^6$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น  $7.65 - 10.7 \times 10^6$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ในเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งทำการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์บน Orbital shaker (Freed L.E., et al., 1994)

จากการศึกษาของ Vunjak-Novakovic G. และคณะ ทำการศึกษาการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนโดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก Polyglycolic acid เช่นเดียวกับ Freed L.E. โดยเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่  $7 \times 10^6$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งทำการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์และ Spinner Flask ปรากฏว่าในเวลา 8 สัปดาห์ เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเป็น  $11.5 \times 10^6$  และ  $21 \times 10^6$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับการเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์และ Spinner Flask ตามลำดับ (Vunjak-Novakovic G., et al., 1996)

จากการศึกษาของ Ishuag-Riley S.L. และคณะ ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนบนแผ่นฟิล์ม Polyglycolic acid และ Polyglycolic-co-trimethylene carbonate นาน 3 สัปดาห์ พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่เกาะบนแผ่นฟิล์ม  $29.6 \times 10^3$  และ  $30 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $6.5 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Ishuag-Riley S.L., et al., 1999)

จากการศึกษาของ Schreiber R.E. และคณะ ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่  $15 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุน 97% เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า มี Glycosaminoglycan เกิดขึ้น 21.6% โดยน้ำหนักแห้ง และมีคอลลาเจนเกิดขึ้น 8.2% โดยน้ำหนักแห้ง (Schreiber R.E., et al., 1999)

### 2.3.5 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polylactic acid (Polylactic acid Scaffold)

Polylactic acid (รูปที่ 2.7) พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสายโซ่ตรงยาว (Aliphatic Polymer) จัดอยู่ในกลุ่มพอลิเอสเตอร์ (Lu L. et al., 2001) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแบบ D และ L ที่เกิดจาก Stereo isomer ซึ่งผลิตได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของ cyclic lactide ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงของไดเมอร์ของ lactic acid ที่  $175^{\circ}\text{C}$  โดยมี Stannous octoate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003) เช่นเดียวกับ polyglycolic acid

Polylactic acid ที่นำมาใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน มีจุดหลอมเหลว ( $T_m$ ) ที่  $173 - 178^{\circ}\text{C}$  (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003) มีค่าโมดูลัสแรงดึง (Tensile Modulus) ที่ 2000 - 3000 MPa ซึ่งขึ้นกับวิธีการขึ้นรูปของโครงเลี้ยงเซลล์ (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003)

คุณสมบัติเชิงชีวภาพของ Polyglycolic acid มีระยะเวลาในการย่อยสลายที่ 36 - 48 เดือน ในสารละลาย PBS (Hutmacher D.W., 2000; Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003) โดยที่การสลายตัวของ Polylactic acid จะได้มอนอเมอร์ชื่อว่า lactic Acid ซึ่งเป็นสารเมตาบอลิท์ตามธรรมชาติ ดังนั้นในการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อีกทั้งได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาในการใช้งานด้านการแพทย์ จึงสามารถใช้ได้ โดยไม่มีผลจากปัญหาด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

ในด้านการประยุกต์ใช้งานของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก Polylactic acid นั้นมักใช้งานเหมือนกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก Polyglycolic acid แต่ให้คุณสมบัติการแบ่งเซลล์ดีกว่า polyglycolic acid และเนื่องด้วยคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกัน จึงเหมาะกับการรักษากระดูกอ่อนในร่างกายเพียงแต่การย่อยสลายของ Polylactic acid นานกว่า polyglycolic acid เนื่องจากโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำมากกว่า Polyglycolic acid จึงมักนำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับกระดูกอ่อนข้อต่อเพื่อให้รูปร่างยังคงอยู่ (Lu L. et al., 2001)

จากการศึกษาของ Chu C.R. และคณะ ทำการเลี้ยง Perichondrium ในโครงเลี้ยงเซลล์ จาก Poly-lactic acid (ADD Cube) ในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้นเซลล์ เริ่มต้น  $800 \times 10^3$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ปรากฏว่าจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น  $1.2 - 2 \times 10^6$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ และทำการทดลองอีกครั้งโดยเลี้ยงในกระต่ายต่ออีกเป็นเวลา 1 ปี โดยความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่  $200 \times 10^3$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากการเลี้ยงในกระต่ายเป็นเวลา 1 ปี พบว่า ปริมาณของ คอลลาเจนชนิด II เพิ่มขึ้นจาก 19% เป็น 82% โดยน้ำหนักแห้ง (Chu C.R., et al., 1995, 1997)

จากการศึกษาของ Ishuag-Riley S.L. และคณะ ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนบนแผ่นฟิล์ม Poly-lactic acid และ poly-D,L-lactic acid นาน 3 สัปดาห์ พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่เกาะบนแผ่นฟิล์ม  $9.6 \times 10^3$  และ  $24 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $6.5 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และทำเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม Poly-lactic acid co polycaprolactone ในอัตราส่วน poly-lactic acid ต่อ polycaprolactone ที่ 9:91 และ 90:10 พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่เกาะบนแผ่นฟิล์ม  $10.4 \times 10^3$  และ  $18.8 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $6.5 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Ishuag-Riley S.L., et al., 1999)

จากการศึกษาของ Douchis J.S. และคณะ ทำการเลี้ยง Perichondrium ในโครงเลี้ยงเซลล์จาก poly-lactic acid (ADD™ Cube) เช่นเดียวกัน โดยที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่  $100 - 150 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 วัน และทำการเลี้ยงในสัตว์ทดลองเป็นเวลา 1 ปี ปรากฏว่า จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น  $110 - 165 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณของคอลลาเจนชนิด II เพิ่มขึ้นเป็น 75% ของปริมาณของคอลลาเจนชนิด II ในกระดูกอ่อนปกติ (Douchis J.S. et al., 2000)

### 2.3.6 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Poly-lactic co glycolic acid (Poly-lactic co glycolic acid scaffold)

เป็นโคพอลิเมอร์ของ poly-glycolic acid และ poly-lactic acid ในอัตราส่วนต่างๆ (ถ้าต้องการให้มีระยะเวลาในการย่อยสลายนานอัตราส่วนของ poly-lactic acid จะมากกว่า poly-glycolic acid) โดยโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้เป็นการรวมข้อดีของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดนี้ คือ มีความแข็งแรงสูง ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการสร้าง ECM

ด้านคุณสมบัติต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้อยู่ระหว่าง poly-glycolic acid และ poly-lactic acid ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดในโครงเลี้ยงเซลล์

จากตารางที่ 2.2 จากการศึกษาของ Ishuag-Riley S.L. และคณะ ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนบนแผ่นฟิล์ม Polyactic co glycolic acid ที่อัตราส่วนระหว่าง Polyglycolic acid ต่อ polyactic acid ที่ 15:85 นาน 3 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น  $6.5 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่เกาะบนแผ่นฟิล์ม  $18.8 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Ishuag-Riley S.L., et al., 1999)

จากการศึกษาของ Iwasaki Y. และคณะ ทำการเลี้ยง Fibroblast ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น  $17.7 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ทำการเลี้ยงบนแผ่น Polyactic co glycolic acid ในจานเลี้ยงเซลล์นาน 2 วัน ปรากฏว่ามีจำนวนเซลล์ที่เกาะบนแผ่นลดลงเป็น  $15 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และเมื่อทำการเลี้ยงบนแผ่น Polyactic co glycolic acid co 2-metacryloyloxyethyl phosphorylcholine ปรากฏว่า จำนวนเซลล์ที่เกาะลดลงเป็น  $8 - 11 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Iwasaki Y. et al., 2002)

### 2.3.7 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polypropylene fumarate (Polypropylene fumarate)

Polypropylene fumarate (รูปที่ 2.7) เป็น พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสายโซ่ตรงยาว (Aliphatic Polymer) จัดอยู่ในกลุ่มพอลิเอสเตอร์ที่มีความไม่อิ่มตัว (Unsaturated) ที่หมู่ของ Fumarate ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์หรือโมเลกุลชนิดอื่นได้ เช่น Polyethylene glycol,  $\beta$ -tricalcium phosphate ซึ่งการใช้งานจะอยู่ในรูปของเจล

คุณสมบัติของ Polypropylene fumarate มีค่าโมดูลัสการอัดที่ 2 – 30 MPa มีระยะเวลาในการย่อยสลายเริ่มต้นที่ 3 เดือน ในสารละลาย PBS (Gunatillake P.A. and Adhikari R., 2003) โดยที่การสลายตัวของ Polypropylene fumarate จะได้มอนอเมอร์ชื่อว่า Fumaric acid, Propylene glycol และ polyacrylic acid-co-fumaric acid ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ตามธรรมชาติ ดังนั้นในการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อีกทั้งได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาในด้านการใช้งานด้านการแพทย์ จึงสามารถใช้ได้ โดยไม่มีผลจากปัญหาด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

จากตารางที่ 2.2 จากการศึกษาของ Peter S.J. และคณะ ได้ทำการเลี้ยง Sprange-Dawley rat's femur & tibias ในโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ โดยที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่  $53 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร และทำการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏว่า จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น  $103 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร และมี Glycosaminoglycan เกิดขึ้น (Peter S.J. et al., 2000)

### 2.3.8 โครงเลี้ยงเซลล์จาก Polyethylene Oxide (Polyethylene Oxide Scaffold)

Polyethylene Oxide (รูปที่ 2.7) เป็น พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสายโซ่ตรงยาว (Aliphatic Polymer) จัดอยู่ในกลุ่ม Polyether ซึ่งการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อใช้ที่มวลโมเลกุล 20,000 – 100,000 และใช้งานในรูปแบบของของเจล โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ซึ่งการขึ้นรูปเจลนั้นทำโดยการ Crosslink กับสารอื่น เช่นเดียวกับ Polypropylene fumarate การย่อยสลายของ Polyethylene oxide นั้นสามารถย่อยสลายได้โดยการดูดซับจากเนื้อเยื่อภายในเวลา 6 – 8 สัปดาห์ (Sims C.D., et al., 1996)

จากตารางที่ 2.2 จากการศึกษาของ Sims C.D. และคณะ (Sims C.D., et al., 1996) ได้ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนจากลูกวัว โดยผสมกับ Polyethylene oxide แล้วฉีดเข้าไปใน Nude Mouse เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน และมี Glycosaminoglycan เกิดขึ้น คิดเป็น 3.54% ของน้ำหนักรวม เมื่อความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่  $10 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาของ Elisseeff J. และคณะ ได้ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนจากวัว โดยทำการผสมกับเจลของ Polyethylene Oxide ที่ความเข้มข้น  $50 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่ามีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 30 – 40% มีอัตราสะสมของ Proteoglycan และ Collagen ที่ 1.5 – 2.8% และ 5 – 6.5% ตามลำดับ (Elisseeff J., et al., 1999)

### 2.3.9 โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์อื่นๆ

นอกจากพอลิเมอร์ที่กล่าวมาแล้ว ยังมีพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ แต่ไม่ได้มีการใช้งานอย่างแพร่หลาย เช่น Polydioxanone, Polyethylene glycol และ Polyrotaxane

Polydioxanone ใช้งานในรูปแบบของแผ่นฟิล์มที่มีเซลล์เกาะอยู่ที่ฟิล์มและจากการศึกษาของ Ishuag-Riley ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนบนแผ่นฟิล์ม Polydioxanone นาน 3 สัปดาห์ พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่เกาะบนแผ่นฟิล์ม  $29.6 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $6.5 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Ishuag-Riley S.L., et al., 1999)

Polyethylene glycol โดยมากมักเป็นวัสดุที่ใช้ในการเคลือบเม็ดยา ซึ่งในด้านการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะอยู่ในรูปของเจลโดยการ Crosslink กับสารอื่น จากการศึกษาของ Watanabe J. และคณะ ได้ทำการเลี้ยง Fibroblast ใน Polyethylene glycol ที่ Crosslink กับ Polyrotaxane ในงานเลี้ยงเซลล์นาน 3 วัน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น  $50 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ปรากฏว่ามีจำนวนเซลล์ที่เกาะบนเจลลดลงเป็น  $32 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Watanabe J. et al., 2002)



Polyrotaxane เป็นพอลิเมอร์ของ  $\alpha$ -Cyclodextrin ที่มาต่อกันเป็นสายสร้อยโดย  $\alpha$ -Cyclodextrin เปรียบเหมือนเม็ดลูกปัดในสายสร้อย จากการศึกษาของ Tachaboonyakiat W. และคณะ ได้ทำการเลี้ยงกระดูกอ่อนของกระต่าย โดยใช้ Cholesterol เป็นโมเลกุลยึดเกาะ (Adhesion Molecule) ให้เซลล์เข้ามาเกาะที่โครงเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น  $100 \times 10^3$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 28 วัน ปรากฏว่ามีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น  $1 - 1.2 \times 10^6$  เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ (Tachaboonyakiat W. et al., 2003)

## 2.4 การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพนั้นถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) (Liu L., et al., 2000, Li S., et al., 2002, and, Lanza R.P., Langer R., and Vacanti P., ) กล่าวคือ โมเลกุลของน้ำไปลดขนาดของพอลิเมอร์ให้มีขนาดเล็กลงและย่อยเป็นมอนอเมอร์ในที่สุด ซึ่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนี้สามารถเกิดขึ้นได้เองแต่จะใช้เวลาในการเกิดนาน (Kweon H.Y. et al., 2003) แต่โดยมากแล้วปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นภายในร่างกายหรือจากการย่อยสลายโดยใช้จุลชีพ ปฏิกิริยาจะถูกเร่งโดยใช้เอนไซม์ที่อยู่ในร่างกายหรือในจุลชีพนั้นๆ โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะทำการย่อยพอลิเมอร์แต่ละชนิดที่มีโครงสร้างแตกต่างกันไปเช่น Lysozyme สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไคโตซานได้แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาของ Poly- $\epsilon$ -caprolactone ได้ ซึ่งการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Poly- $\epsilon$ -caprolactone สามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ Lipase เป็นต้น

การย่อยสลายทางชีวภาพของ PCL นั้นจากการศึกษาของ Hutmacher D.W. และ Kweon H.Y. และคณะ พบว่าอัตราการย่อยสลายของ PCL โดยไม่ใช้เอนไซม์มีอัตราการย่อยสลายอยู่ที่ 24 – 36 เดือน (Kweon H.Y. et al., 2003) ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นแล้ว แต่ในกรณีที่ใช้เอนไซม์ ซึ่งทำการศึกษาโดย Liu L. และคณะ และ Li S. และคณะ) พบว่าการย่อยสลายของฟิล์ม PCL โดยใช้เอนไซม์ Lipase จาก *Pseudomonas* ที่ความเข้มข้น 8,000 U/l สามารถย่อยสลายได้ถึง 78.4 – 80% ภายในเวลา 48 – 72 ชั่วโมง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Lipase นี้สามารถลดระยะเวลาการย่อยสลายของ PCL ได้อย่างมาก (Liu L., et al., 2000, Li S., et al., 2002) โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ทำการทดลองมีค่ามากกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่อยู่ในร่างกายมนุษย์ถึง 270 เท่าโดยประมาณ ในขณะที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ Lipase ในเลือดมีค่าอยู่ที่ 30 U/l (Burtis C.A. and Ashwood E.R., 1994)

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เซลล์และสัตว์ทดลอง

1. เซลล์กระดูกอ่อนของผู้บริจาคบริเวณซี่โครง (Rib cartilage) ที่เสียชีวิตแล้วไม่เกิน 8 ชั่วโมง (รูปที่ 3.1)
2. หนูทดลองชนิด Nude mouse (BALB/C-nu) อายุ 4 – 5 สัปดาห์เพศเมีย จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (รูปที่ 3.2)

#### 3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดแอสติติกเข้มข้น จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
2. Antibiotic (L-Glutamine /Penicillin/Streptomycin)<sup>†</sup> จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3. Antifungal (Fungizone)
4. Calcium Chloride จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
5. Calf Skin Collagen<sup>†</sup> จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
6. Cloxa M.H. (Antibiotics) จากบริษัท M&H Manufacturing, Samutprakarn, Thailand
7. Collagenase Type II<sup>†</sup> จากบริษัท Invitrogen Corp., Auckland, NZ
8. Ethanol 70% จากฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
9. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), trisodium salt จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10. Fetal Bovine Serum (FBS) จากบริษัท Invitrogen Corp., Paisley, UK
11. Fibroblast Growth Factor (FGF) จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
12. Gentamycin (Antibiotics) จากบริษัท M&H Manufacturing, Samutprakarn, Thailand

---

<sup>†</sup> ดูหมายเหตุของเคมีภัณฑ์และหมายเลขสารเคมี (Catalog Number) ที่ภาคผนวก ก.



รูปที่ 3.1 กระดูกอ่อนบริเวณซี่โครงของมนุษย์



รูปที่ 3.2 หนูทดลอง Nude Mouse (BALB/c-nu) เพศเมียอายุ 5 สัปดาห์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. Glutaraldehyde จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
14. HAM – F12 (Nutrient Mixer)<sup>†</sup> จากบริษัท Invitrogen Corp., Auckland, NZ
15. L-Ascorbic Acid จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
16. Lipase จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
17. Magnesium Chloride hexahydrate จากบริษัท Carlo Erba, Italy
18. Normal Saline Solution (NSS) จากบริษัท General Hospital Products, Patumthani, Thailand
19. Paraformaldehyde จากบริษัท Sigma Chem, St. Louis, USA
20. Phosphate Buffer Saline (PBS)<sup>†</sup> จากบริษัท Invitrogen Corp., Paisley, UK
21. Polycaprolactone (MW = 65,000) จากบริษัท Aldrich Chemical Corp., Milwaukee, WI, USA
22. Potassium Phosphate monobasic จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
23. Sodium Alginate<sup>†</sup> จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
24. Sodium Chloride จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
25. Sodium Hydroxide (Flake) จากบริษัท Merck, Darmstadt, Germany
26. Sodium Phosphate dibasic จากบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany
27. Sodium Phosphate monobasic จากบริษัท Antibioticos, Spain
28. Sulperazon จากบริษัท Pfizer, Italy
29. Trypan Blue 0.4% จากบริษัท Gibco RBL, USA
30. Trypsin – EDTA<sup>†</sup> จากบริษัท Invitrogen Corp., Canada
31. ผงชูรส (Monosodium Glutamate) จากบริษัท อายิโนะโมะไตะ (ประเทศไทย) จำกัด

### 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digit balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
2. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (5-digit balance) รุ่น AE 240 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
3. แท่งกวนแม่เหล็กและแผ่นให้ความร้อน (Magnetic stirrer/hot plate) รุ่น RCT Basic ของบริษัท Ika labortechnik, Germany

4. เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave) รุ่น HVE 25/50 ของบริษัท Hirayama, Japan
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น GPR ของบริษัท Beckman
6. ตู้อบ (Oven) อุณหภูมิ 45 – 65°C
7. ตู้เย็น (Refrigerator)
8. เครื่อง Freeze Dry รุ่น Freezone 450 ของบริษัท Labconco
9. ตู้เพาะเชื้อ (Incubator)
10. CO<sub>2</sub> Incubator แบบ 3336 ของบริษัท Forma Scientific
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น 1235 PC ของบริษัท Shel-Lab
12. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิต่ำ (Deep freeze) ของบริษัท Revco
13. Laminar flow hood รุ่น BH 18 ของบริษัท Labcaire

### 3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

1. กรงพลาสติก
2. วัสดุรองนอน
3. ขวดน้ำพร้อมหลอด
4. ตัวกรองอากาศพร้อมแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

### 3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบตัวอย่าง

#### 3.5.1. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ เป็นรุ่น DMIL จากบริษัท Leica และรุ่น Phase Contrast-2 จากบริษัท Nikon ของ Cellular Immunology Laboratory สาขาวิชาโรคมะเร็งและภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ เป็นเครื่องมือที่ใช้ตรวจสอบรูปร่างและลักษณะของเซลล์ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเลนส์ใกล้ตาและเลนส์ใกล้วัตถุ ซึ่งกำลังขยายสามารถขยายได้ตั้งแต่ 100 ถึง 400 เท่า ขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิตว่าจะติดตั้งเลนส์แบบใดมาพร้อมกับกล้อง

#### 3.5.2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope หรือ SEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (JEOL รุ่น JSM-5400) ของศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือในการศึกษาและวิเคราะห์พื้นผิวของวัสดุ

ประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญคือ ระบบผลิตล้าอิเล็กตรอน ระบบการจับและถ่ายทอดสัญญาณ และระบบการถ่ายทอดสัญญาณ กำลังขยายที่ 10 ถึง 300,000 เท่า ที่ความดันไฟฟ้า 1 ถึง 40 กิโลโวลต์ และต้องมีการฉาบผิวหน้าด้วยทองคำ (Gold coating) ด้วยเครื่อง Ion Sputtering (JEOL รุ่น JFC-1100E) ก่อนการทดสอบ

### 3.5.3 สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer)

สไลด์นับเซลล์ที่ใช้เป็นรุ่น Spencer Bright-Line จากบริษัท AO Optical เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดความเข้มข้นของเซลล์โดยการประมาณ ซึ่งอยู่บนสมมติฐานที่เซลล์ในสารผสมมีการกระจายตัวอย่างอิสระและมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากัน ซึ่งจะทำการเจือจางตัวอย่างจากสารผสมที่มีเซลล์ผสมอยู่และย้อมสีเซลล์ เมื่อทำการนับเสร็จจึงคำนวณกลับให้เป็นปริมาตรที่ต้องการ

### 3.5.4 เครื่อง Universal Testing Machine

เครื่อง Universal Testing Machine เป็นรุ่น LLOYD 500 ของ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดสมบัติเชิงกลของวัสดุ โดยใช้ Load Cell ที่ 100 นิวตัน

### 3.5.5 เครื่อง Thermogravimetric Analysis (TGA)

TGA ที่ใช้เป็นรุ่น Pyris Diamond TG-DTA ของบริษัท Perkin Elmer ของศูนย์เครื่องมือกลาง วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมีเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์อัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของตัวอย่างที่เป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิหรือเวลา โดยทั่วไปเครื่อง TGA ใช้ในการวิเคราะห์หาอุณหภูมิในการสลายตัวของพอลิเมอร์, ปริมาณของน้ำในพอลิเมอร์และ ปริมาณของสารอื่นในพอลิเมอร์

### 3.5.6 เครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC)

เครื่อง DSC ที่ใช้เป็นรุ่น DSC822° ของบริษัท Mettler Toldeto ของศูนย์เครื่องมือกลาง วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมีเป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของวัสดุกับความร้อนที่ใช้ เครื่อง DSC นี้สามารถวัดปริมาณความร้อนที่ใช้ไปในกระบวนการทั้งกระบวนการดูดความร้อนและกระบวนการคายความร้อน โดยมากเครื่อง DSC นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature) จุดหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของพอลิเมอร์ ค่าความร้อนที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึก ( $\Delta H_f$ ) (Gan Z., et al., 1997) การเตรียมตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC นี้ เตรียมโดยตัดโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เกลือและผงซุสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 30% ในคลอโรฟอร์ม ที่ใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ กัน เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้เป็นชนิดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงเซลล์

โดยขึ้นตัวอย่าง จะผ่านการคัดเพื่อให้ได้เป็นแผ่นบาง โดยมีน้ำหนักของขึ้นตัวอย่างที่  $3 \pm 0.3$  มิลลิกรัม โดยวางขึ้นตัวอย่างในภาชนะบรรจุตัวอย่างที่ทำจากอลูมิเนียม ให้ความร้อนแก่ขึ้นตัวอย่างด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 100 องศาเซลเซียส

### 3.6 ขั้นตอนการทดลอง

#### 3.6.1 การสกัดแยกเซลล์กระดูกอ่อนจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

1. นำกระดูกอ่อนที่ได้รับ แช่ในยาฆ่าเชื้อ (สารละลายเบตาดีน) เป็นเวลา 30 นาที
2. ตัดให้เป็นชิ้นขนาดยาว 3 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร โดยทำการลอกกล้ามเนื้อที่หุ้มออก
3. แช่ในสารละลายของยาปฏิชีวนะ (Cloxa และ Gentamycin) และยาฆ่าเชื้อรา (Sulperazon)
4. หั่นชิ้นกระดูกอ่อนให้มีขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นแช่ในสารละลาย Collagenase 0.3% (w/v) (ดูวิธีการเตรียมที่ ภาคผนวก ข.) ใ้ อย่างน้อย 12 ชั่วโมง
5. ดูดส่วนที่เป็นน้ำ แล้วนำมากรองด้วยตัวกรองขนาด 70 ไมครอน ล้างส่วนที่เป็นตะกอนด้านล่างด้วย สารละลาย PBS จากนั้นทำการกรองน้ำที่ล้างได้อีกครั้งหนึ่ง
6. นำส่วนที่กรองได้ ผสมกับสารละลาย PBS แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ชิ้นเซลล์ตกตะกอน
7. ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสออก และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นทำการปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง
8. ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง และทำการนับจำนวนเซลล์ ปรับปริมาณเซลล์ เพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ต่อไป

#### 3.6.2 การเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์

เป็นขั้นตอนแรกในการเพาะเลี้ยงเซลล์ กล่าวคือ เมื่อสกัดแยกเซลล์กระดูกอ่อนได้แล้ว จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเคลือบอยู่ (Collagen coated plate) (ดูวิธีการเตรียมที่ภาคผนวก ข.) ให้มีจำนวนเซลล์ตามที่ต้องการ จากนั้นจึงนำเซลล์ไปเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ต่อไป ซึ่งวิธีการเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ มีดังนี้

1. นำเซลล์กระดูกอ่อนแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Media) ซึ่งประกอบด้วย Fetal Bovine Serum (FBS), HAM F-12 Nutrient mixer และ Antibiotic (ดูวิธีการเตรียมที่ ภาคผนวก ข.)
2. ทำการนับเซลล์กระดูกอ่อน โดยใช้สี Trypan Blue 0.2% เป็นสีย้อมเซลล์ ซึ่งไม่ติดสีน้ำเงินในเซลล์กระดูกอ่อนที่มีชีวิต เพื่อทำการนับโดยใช้ Haemocytometer
3. ทำการปรับจำนวนเซลล์ ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ (จำนวนเซลล์ต่อปริมาตร) ที่  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (HAM F-12 + 10% FBS)
4. ทำการเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ที่ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

### 3.6.3 การสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ PCL แบบพรุน

1. นำ PCL ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 65,000 ละลายใน คลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 30%, 25% และ 20% (w/v)
2. เมื่อ PCL ละลายหมดแล้ว จึงผสมกับสารทำให้เกิดรูพรุน (Porogen)
  - 2.1 หากใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ใช้เกลือที่น้ำหนัก 15 เท่าของ น้ำหนักของ PCL
  - 2.2 หากใช้เกลือและผงซุรตเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน ใช้อัตราส่วนของเกลือต่อ ผงซุรตที่ 1:1 ที่ให้น้ำหนักของเกลือและผงซุรตที่ 15 เท่าของน้ำหนัก ของ PCL
3. นำสารที่ทำให้เกิดรูพรุนผสมกับสารละลาย PCL ให้กระจายตัวได้ดี
4. นำสารผสมพอลิเมอร์ ที่ได้จากข้อ 3 เทลงใส่แม่แบบ (ดูวิธีการผลิตแม่แบบได้ที่ ภาคผนวก ค) รูปหุที่มีขนาด กว้าง 1 ซม. ยาว 2 ซม. และหนา 0.35 ซม. (ดังรูปที่ 3.3 (ก) และ 3.3(ข)) และหล่อเป็นแผ่นหนาขนาด กว้าง 1 ซม. ยาว 2 ซม. และหนา 0.3 ซม. (ดังรูปที่ 3.3 (ค))
5. ระเหยคลอโรฟอร์มออก เป็นเวลาประมาณ 10 - 15 ชั่วโมง โดยทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง
6. แกะโครงเลี้ยงเซลล์ออกจากพิมพ์ โดยทำการแกะในน้ำเพื่อป้องกันการแตกหัก ของโครงเลี้ยงเซลล์
7. ล้างสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่ผสมกับ PCL ออก โดยใช้น้ำกรอง ที่มีการปั่นกววน (ใช้ เครื่องกววนแม่เหล็ก) ตลอดเวลา ซึ่งใช้น้ำในการล้างประมาณ 100 มิลลิลิตรต่อ



- โครงเลี้ยงเซลล์ 1 อัน และเปลี่ยนน้ำที่ใช้ในการล้าง ที่เวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง หลังจาก 4 ชั่วโมงแล้ว ล้างต่อไปอีกประมาณ 4 – 8 ชั่วโมง
8. ระเหยน้ำที่ล้างออกโดย นำโครงเลี้ยงเซลล์ใส่ในตู้ดูดความชื้น (Desiccators) นาน 2 วัน
  9. ฆ่าเชื้อ โดยแช่ในสารละลาย 70% เอทานอล นาน 30 นาที เป็นจำนวน 3 ครั้ง
  10. ก่อนนำไปใช้งานต้องทำการระเหยเอทานอลออก โดยทิ้งไว้ใน Laminar Flow Hood ที่มีอากาศไหลผ่านตลอดเวลา นาน 1 วัน



รูปที่ 3.3 รูปแบบในการหล่อโครงเลี้ยงเซลล์และโครงเลี้ยงเซลล์

- (ก) แม่แบบ
- (ข) โครงเลี้ยงเซลล์รูปใบหู
- (ค) โครงเลี้ยงเซลล์แบบแผ่นหนา

### 3.6.4 วิธีการเพาะเซลล์ (Seeding) ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้พอลิเมอร์ผสม โดยใช้ PCL และ Alginate เป็นวิธีที่คิดค้นขึ้นซึ่งใช้ข้อดีของพอลิเมอร์แต่ละชนิดมาประกอบกัน คือโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก PCL นั้นช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และโครงเลี้ยงเซลล์จาก Alginate ช่วยให้มีการกระจายตัวของเซลล์ทั่วโครงเลี้ยงเซลล์และช่วยในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์กระดูกอ่อนเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ดี

1. เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพูน
2. เตรียมสารละลาย Sodium Alginate 5%(w/v) ในสารละลาย 0.9% NSS เพื่อนำไปผสมกับเซลล์กระดูกอ่อนและอาหาร โดยทำการผสมให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่  $25 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Alginate ที่ 1.2%
3. ฉีดสารละลายเซลล์ใน Alginate ลงในพิมพ์ที่มีโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL อยู่ โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 ซม<sup>3</sup> และ เข็มเบอร์ 27
4. ค่อยๆ หยดสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  ที่ความเข้มข้น 102 mM ลงในแบบเพื่อให้เกิดการ Crosslink ทำให้ Alginate เปลี่ยนรูปไปเป็นเจล
5. ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เพื่อให้เปลี่ยนรูปไปเป็นเจลเกิดได้ทั่วทั้งแบบ
6. นำมาเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์

### 3.6.5 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro* culture)

หลังจากเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ ให้ได้เซลล์ในปริมาณที่ต้องการ จากนั้นทำการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่  $20 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตบนโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างที่จะนำไปใส่ในร่างกาย เพื่อให้กลุ่มเซลล์ที่ฉีดลงไปนั้นสามารถเกาะกลุ่มเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะตามที่ต้องการ โดยทั่วไปการเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในอาหารเช่นเดียวกับการเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 3.4 โดยทำการเติมอาหารทุกวัน วันละ 3 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์หลุดจากโครงเลี้ยงเซลล์จึงไม่มีการดูอาหารออก

### 3.6.6 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง (*in vivo* culture)

หลังจากการเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ (Petri Dish) หรือวิธีการเลี้ยงภายนอกร่างกาย เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ จึงทำการเลี้ยงในสัตว์ทดลอง ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้

Nude Mice (BALB/c-nu) เป็นสัตว์ทดลอง โดยใช้ Nude Mice ที่มีอายุประมาณ 4 – 5 สัปดาห์ เป็นสัตว์ทดลอง โดยในการทดลองได้ทำการปลูกถ่าย (Implant) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์กระดูกอ่อน ที่บริเวณหลังของ Nude Mouse และทำการเลี้ยงเซลล์ใน Nude Mice เป็นเวลา 2, 3 และ 6 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 3.5 เพื่อให้กลุ่มเซลล์มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบมากขึ้น (ดูวิธีการเลี้ยง Nude Mouse ได้ที่ภาคผนวก ง)



รูปที่ 3.4 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกในร่างกาย (*in vitro* culture)



รูปที่ 3.5 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายในสัตว์ทดลอง (*in vivo* culture)

### 3.6.7 การทดสอบด้านกายภาพ

เป็นการทดสอบคุณสมบัติทางพอลิเมอร์ของโครงเลี้ยงเซลล์คือ การทดสอบแรงดึง (Tensile Stress) ซึ่งเป็นการทดสอบความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ ในการรองรับแรงที่เกิดขึ้นจากการเคลื่อนไหวและการรับน้ำหนัก (Boyan B.D. et al., 1999; Lu L. et al., 2001; Nettles D.L., 2001) โดยใช้เครื่อง Universal Mechanical Machine (ดูวิธีการทดสอบได้ที่ภาคผนวก จ)

### 3.6.8 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradable)

#### 3.6.8.1 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*In vitro* biodegradation)

##### 3.6.8.1.1 การย่อยสลายในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS)

1. เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบพอร์นที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL ที่ 20, 25 และ 30% โดยใช้ผงซุสและเกลือทั้งสองชนิด และเกลือเพียงชนิดเดียวเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพอร์น ซึ่งขึ้นรูปโดยใช้วิธีการหล่อให้เป็นแบบแผ่นหนาขนาด  $2 \times 1 \times 0.3$  ซม. และฆ่าเชื้อโดยการแช่ในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 70% นาน 30 นาที จากนั้นทำการระเหยเอทานอลใน Laminar Flow Hood นาน 12 ชั่วโมง
2. แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย PBS ที่ค่า pH = 7.4 (ดูวิธีการเตรียมที่ภาคผนวก ข.) และอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในกระบอกที่มีฝาปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว (ฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเดียวกันกับการฆ่าเชื้อของโครงเลี้ยงเซลล์) ซึ่งมีลวดสแตนเลส (ฆ่าเชื้อโดยการ Autoclave) ชัดไว้ด้านบนเพื่อป้องกันโครงเลี้ยงเซลล์ลอยที่ผิวน้ำ
3. เก็บอย่างทุก 1 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่าง สัปดาห์ละ 4 ชิ้น
4. ทำการล้างตัวอย่างโดยแช่ในน้ำกลั่น นาน 15 นาที โดยทำการล้าง 8 ครั้ง
5. ระเหยน้ำออกใน Laminar Flow Hood จากนั้นทำให้แห้งในตู้ดูดความชื้น เป็นเวลา 2 วัน
6. วัดร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่างๆ เทียบกับน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น โดยวัดน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ (ดูตัวอย่างการคำนวณได้ที่ภาคผนวก ฉ) เพื่อศึกษาปริมาณของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ย่อยสลาย และระยะเวลาที่โครงเลี้ยงเซลล์ย่อยสลายทั้งหมด (Anseth K.S. et al., 2002)

### 3.6.8.1.2 การย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปส

ในการทดลองนี้ต้องการทดสอบการย่อยสลายของ PCL ในสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่มีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณของเอนไซม์ไลเปส โดยที่ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสในเลือดของผู้ใหญ่โดยเฉลี่ยที่  $30 \text{ U/l} = 0.03 \text{ U/ml}$  (Burtis C.A. and Ashwood E.R., 1994)

1. เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์รูปแบบเดียวกับการทดสอบการย่อยสลายในสารละลาย PBS
2. ผสมสารละลาย PBS ที่ pH 7.4 กับ Sodium Azide ที่ความเข้มข้น 0.02% (w/v) เพื่อฆ่าเชื้อและ Sodium Chloride ที่ความเข้มข้น 0.6% (w/v) เพื่อกระตุ้น การทำงานของเอนไซม์ (Burtis C.A. and Ashwood E.R., 1994) และปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่า 7.4
3. นำสารละลายเอนไซม์ไลเปส ที่ความเข้มข้น 30 U/ml (ดูการเตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ภาคผนวก ข) ผสมกับสารละลาย PBS ที่ได้จากข้อ 2. โดยผสมโดยใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปสปริมาตร 1 ml ต่อ สารละลาย PBS ปริมาตร 999 ml
4. แขนโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจากข้อ 2 โดยแขนในปริมาณ 10 ml ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ 1 ชิ้น โดยแขนใน จานเลี้ยงเซลล์พลาสติกกันแบนแบบ 6 หลุม
5. เก็บตัวอย่างทุก 1 สัปดาห์ ตัวอย่างละ 4 ชิ้น
6. วิเคราะห์การสลายตัวของ PCL ด้วยวิธีเดียวกับการทดสอบย่อยสลายในสารละลาย PBS
7. นำโครงเลี้ยงเซลล์แบบพวุนโดยใช้ผงซุสและเกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดพวุนที่ความเข้มข้นของ PCL ในคลอโรฟอร์มที่ 30% (w/v) จากการย่อยสลายในแต่ละสัปดาห์ ทำการหาค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของ PCL โดยใช้เครื่อง DSC

### 3.6.8.2 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายในร่างกาย (*In vivo* biodegradation)

1. โครงเลี้ยงเซลล์แบบพวงรูปใบหู โดยมีขนาดเช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้นี้ ใช้ผงชูรส และเกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดพวงที่มีความเข้มข้นของ PCL 30% (w/v) ในคอลโรฟอร์ม
2. ปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์จาก ข้อ 1. ที่บริเวณด้านหลังของ Nude Mice เช่นเดียวกับการเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง โดยผ่าตัดเอาโครงเลี้ยงเซลล์ออกมาทำการวิเคราะห์ผลที่เวลา 1, 2 และ 3 เดือน
3. วิเคราะห์ปริมาณของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สลายตัวภายใน โดยใช้เครื่อง TGA วัดปริมาณของ PCL ที่เหลืออยู่ในช่วงอุณหภูมิการสลายตัวของ PCL ที่ 371 – 436 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับ PCL ที่ไม่ได้ปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง
4. วัดค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของ Poly-ε-Caprolactone โดยใช้เครื่อง DSC

### 3.6.9 การตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยการย้อมสี

ทำการย้อมโดยใช้การย้อมแบบ Hematoxylin and Eosin (H&E) ซึ่งเป็นเทคนิคในการย้อมสีเซลล์โดยทั่วไป โดยติดสีแดงบริเวณที่เป็น ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) สีน้ำเงินที่บริเวณนิวเคลียส และติดสีชมพูบนเทาที่เมตริกซ์ของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Young, B. and Heath, J.W., 2000) ซึ่งวิธีการย้อมอยู่ที่ภาคผนวก ข

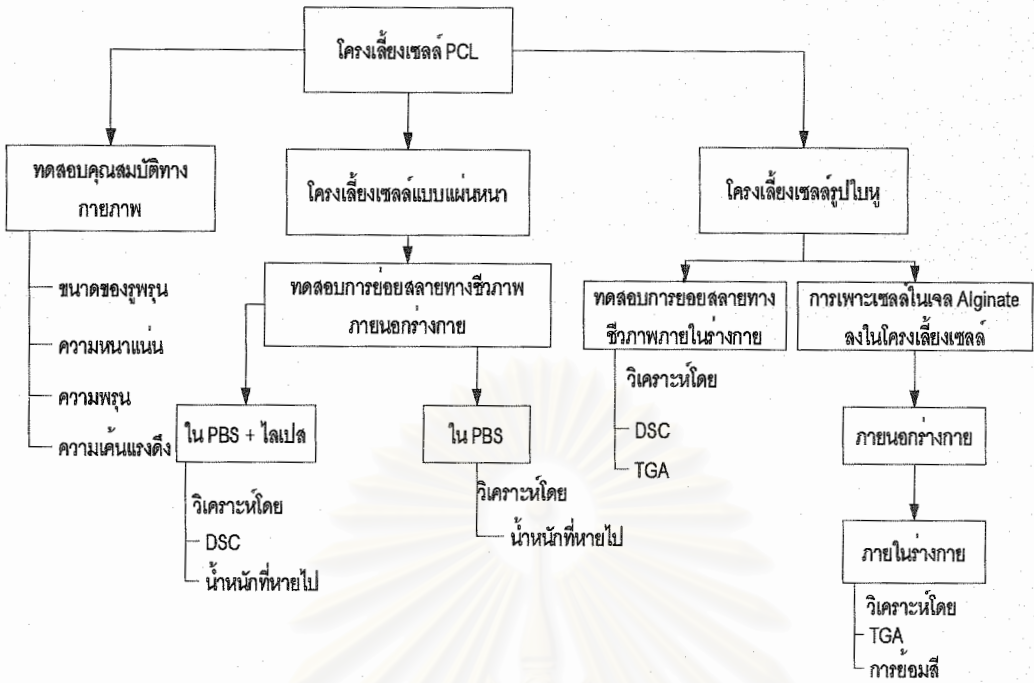
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนบนโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีวิธีและขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยดังแสดงในแผนผังรูป 4.1 โดยมีการรายงานผลการทดลองโดยลำดับต่อไปนี้

- 4.1 ขยายปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในจานเลี้ยงเซลล์
- 4.2 การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนจาก PCL และการวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์
  - 4.2.1 ลักษณะและรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์
  - 4.2.2 ขนาดของรูพรุนและความพรุน
  - 4.2.3 ค่าความเค้นแรงดึง (Tensile Stress) ของโครงเลี้ยงเซลล์
  - 4.2.4 การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์
- 4.3 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์
  - 4.3.1 การเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro* culture)
  - 4.3.2 การเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกาย (*in vivo* culture)



รูปที่ 4.1 แผนผังการทดสอบคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

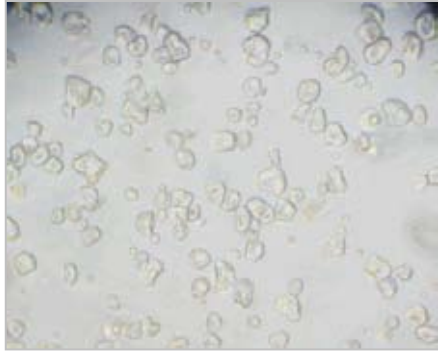
โดยมีรายละเอียดของผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลองดังต่อไปนี้

#### 4.1 การขยายปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนในจานเลี้ยงเซลล์

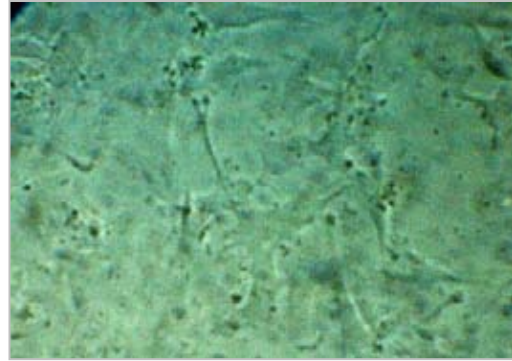
กระดูกอ่อนจากผู้บริจาคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 4 ซม. ทำการการตัดให้เป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 1 – 2 มิลลิเมตร สกัดด้วยเอนไซม์ Collagenase type II ความเข้มข้น 0.3% (w/v) ได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่  $1.25 \times 10^7$  เซลล์ ลักษณะของเซลล์ที่แยกออกมาจากเนื้อเยื่อดังแสดงในรูปที่ 4.2 ก

เมื่อทำการแยกเซลล์ได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการขยายปริมาณเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ที่ทำการเคลือบคอลลาเจนชนิด II ไว้ที่ผิว โดยใช้เซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อ 7 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน เซลล์กระดูกอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากที่มีลักษณะทรงกลม (รูปที่ 4.2 ก) เป็นลักษณะแบนราบรูปดาว (Polygonal) (รูปที่ 4.2 ข) เนื่องจากธรรมชาติในการยึดเกาะของเซลล์ กล่าวคือเมื่อเซลล์กระดูกอ่อน เกาะอยู่บนพื้นผิว 2 มิติ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากทรงกลมเป็นรูปดาว และมีการขยายขนาดของระยะห่างระหว่างเซลล์ (Ishuag-Riley S.L. et al. 1999)





(ก)



(ข)

รูปที่ 4.2 เซลล์กระดูกอ่อนที่กำลังขยาย 400 เท่า

(ก) หลังจากการสกัดเซลล์จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของผู้บริจาค

(ข) หลังจากการเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อนาน 22 วัน

#### 4.2 การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL

ในขั้นตอนนี้ศึกษาถึงผลของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนต่อขนาดจะปริมาณของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้น โดยใช้สารที่ทำให้เกิดรูพรุน (Porogen) คือ เกลือ (Sodium Chloride) ซึ่งมีผลึกเป็นลักษณะคล้ายลูกบาศก์และ ผงชูรส (Monosodium glutamate – MSG) ซึ่งมีผลึกยาวขนาดของผลึกของสารต่างๆที่นำมาใช้ แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขนาดของผลึกของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน

| สาร    | รูปผลึก   | ขนาดของผลึก (มม.)             |
|--------|---|-------------------------------|
| เกลือ  |  | เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 – 0.5   |
| ผงชูรส |  | กว้าง 0.3 - 0.4 ยาว 0.8 – 1.0 |

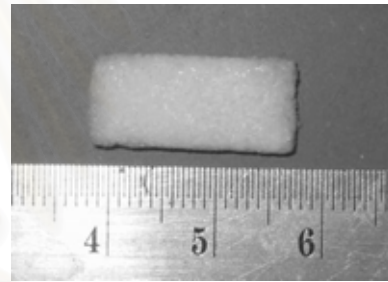
เมื่อพิจารณาขนาดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่ส่งเสริมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ซึ่งให้ขนาดของรูพรุน (Pore Size) ที่ 100 – 200 ไมครอน (Hutmacher D.W., 2000) จึงนำเกลือและผงชูรสมาใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ซึ่งใช้อัตราส่วนในการผสมที่ เกลือ 7.5 เท่า และ ผงชูรส 7.5 เท่าของน้ำหนักของ PCL สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนและผสมเกลือที่ 15 เท่าของน้ำหนักของ PCL สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน

#### 4.2.1 ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ขึ้นรูปด้วยวิธีการหล่อโดยเทสารผสมระหว่างสารละลายพอลิเมอร์และสารที่ทำให้เกิดรูพรุนใส่แบบที่มีลักษณะเป็นใบหูที่มีขนาด กว้าง 1 ซม. ยาว 2 ซม. มีความหนาที่ 0.2 – 0.5 ซม. ดังรูปที่ 4.3 ก และแบบแผ่นหนาขนาด กว้าง 1 ซม. ยาว 2 ซม. และหนา 0.3 ซม. ดังรูปที่ 4.3 ข เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบนโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำไปใช้ทดแทนอวัยวะเดิมที่มีรูปทรงง่ายๆ (แบบแผ่นหนา) และรูปทรงที่ซับซ้อนขึ้น (รูปใบหู)



(ก) รูปใบหู



(ข) แผ่นหนา

รูปที่ 4.3 โครงเลี้ยงเซลล์แบบพอร์นที่ผลิตได้

#### 4.2.2 ขนาดของรูพรุนและความพรุน (Pore Size and Porosity)

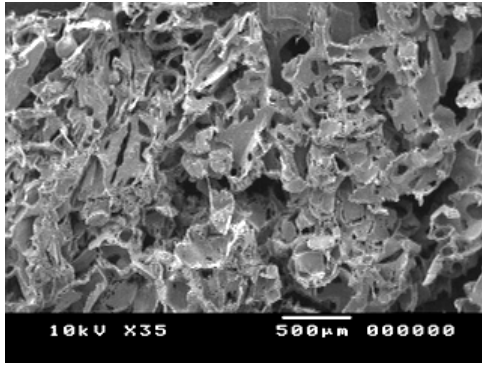
จากการทดลองวัดขนาดของรูพรุน, ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ และ ความพรุน ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุน

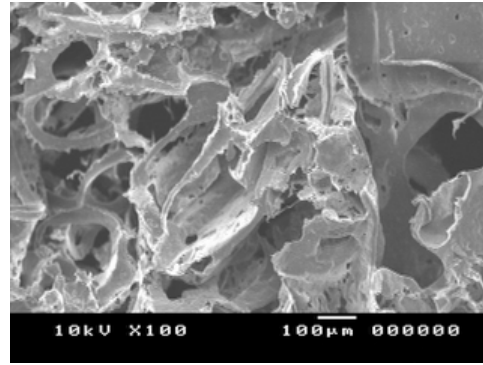
| ความเข้มข้นของสารละลาย PCL (% w/v) ในคอลโรฟอร์ม | ชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน (ความเข้มข้น 15 เท่าของ PCL) | ขนาดของรูพรุนโดยประมาณ (ไมครอน) (นับ 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 120 รู) | ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ (กรัม/ซม <sup>3</sup> ) (ทดสอบ 5 ตัวอย่าง) | ความพรุน (%) (ทดสอบ 5 ตัวอย่าง) |
|---|---|--|--|---------------------------------|
| 20  | ผงซุรอสและเกลือ   | 150±10.7   | 0.189±0.016  | 83.51±1.39                      |
|   | เกลือ   | 105±6.0  | 0.164±0.019  | 85.72±1.65                      |
| 25  | ผงซุรอสและเกลือ   | 161±8.5  | 0.220±0.018  | 80.77±1.53                      |
|   | เกลือ   | 156±7.8  | 0.195±0.021  | 82.95±1.81                      |
| 30  | ผงซุรอสและเกลือ   | 205±16.4   | 0.246±0.007  | 78.44±0.63                      |
|   | เกลือ   | 170±8.7  | 0.221±0.019  | 80.70±1.69                      |

#### 4.2.2.1 ขนาดของรูพรุน

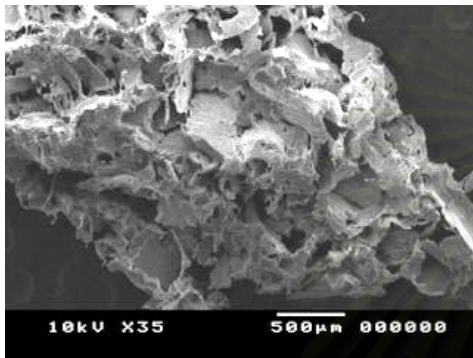
เนื่องจากขนาดของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ อาจมีผลต่อกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ เช่น การแบ่งตัว การเคลื่อนที่ หรือการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวัดขนาดของรูพรุนโดยประมาณจากภาพถ่ายของโครงเลี้ยงเซลล์จาก SEM ทั้งสิ้น 4 ชั้นงาน ชั้นงานละ 3 ภาพ ภาพละ 40 รู โดยทำการวัดขนาดของรูจากแกนเอกและแกนโท จากนั้นนำค่าที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ย (Mean) โครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL ที่มีเกลือและผงซุรอสเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน (รูปที่ 4.4) มีขนาดของรูพรุนโดยประมาณที่ 150, 161 และ 205 ไมครอน สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นจากสารละลาย PCL ในคอลโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้น 20, 25 และ 30% (w/v) ตามลำดับ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL ที่มีเกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน (รูปที่ 4.5) มีขนาดของรูพรุนเฉลี่ยโดยประมาณที่ 105, 156 และ 170 ไมครอนตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติแบบที (T-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย PCL และชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนไม่มีผลต่อขนาดของรูพรุนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด (ดูภาคผนวก ฉ) เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า มีรูพรุนกระจายอยู่ทั่วไป รูพรุนมีลักษณะที่เชื่อมต่อกันได้ดี ซึ่งสังเกตได้จากการหยดน้ำผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้นพบว่าน้ำสามารถไหลผ่านไปได้ง่าย



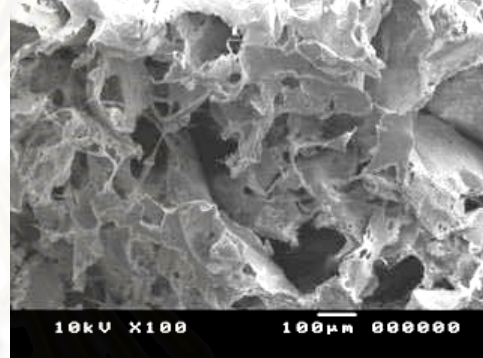
(ก)



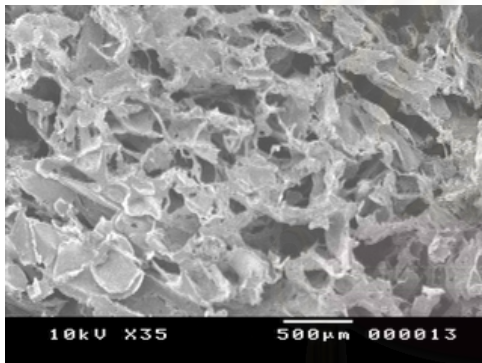
(ข)



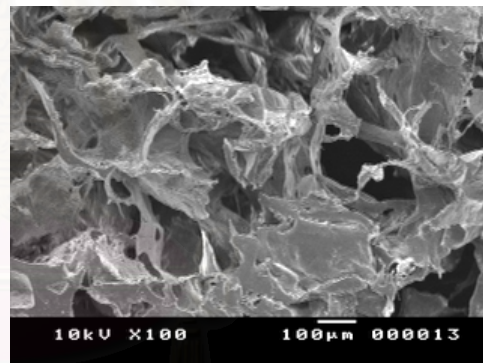
(ค)



(ง)



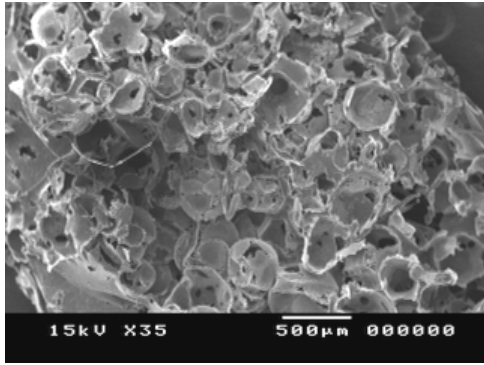
(จ)



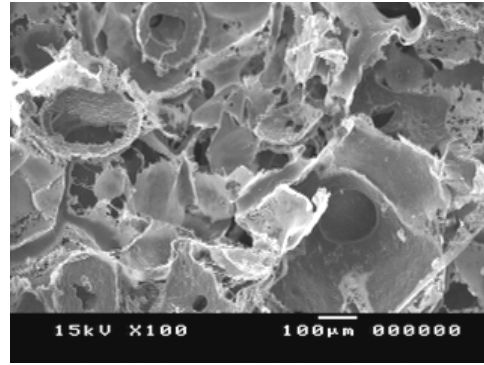
(ฉ)

รูปที่ 4.4 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพรุน โดยใช้เกลือและผงซุสเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน

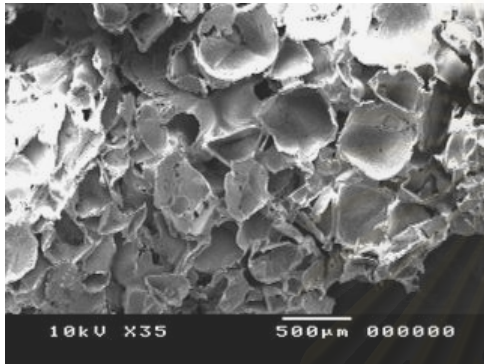
- (ก) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 20%ที่กำลังขยาย 35 เท่า
- (ข) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 20%กำลังขยาย 100 เท่า
- (ค) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 25%กำลังขยาย 35 เท่า
- (ง) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 25%กำลังขยาย 100 เท่า
- (จ) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 30%กำลังขยาย 35 เท่า
- (ฉ) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 30%กำลังขยาย 100 เท่า



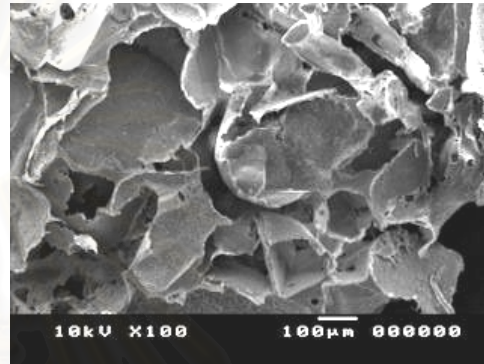
(ก)



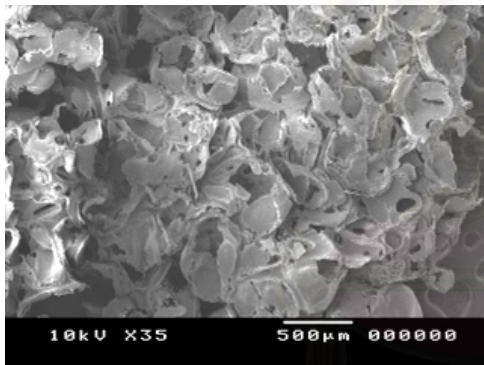
(ข)



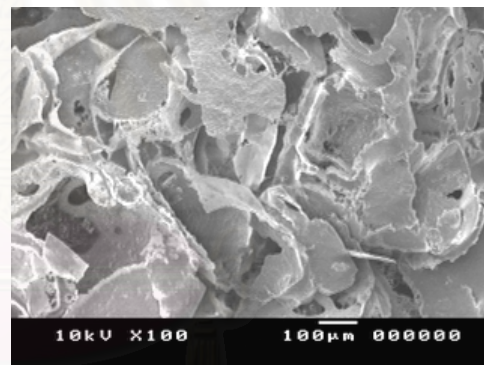
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

รูปที่ 4.5 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพรุน โดยใช้เกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน

- (ก) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 20%ที่กำลังขยาย 35 เท่า
- (ข) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 20%กำลังขยาย 100 เท่า
- (ค) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 25%กำลังขยาย 35 เท่า
- (ง) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 25%กำลังขยาย 100 เท่า
- (จ) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 30%กำลังขยาย 35 เท่า
- (ฉ) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 30%กำลังขยาย 100 เท่า

ขนาดของรูพรุนเมื่อเทียบผลจากงานวิจัยอื่นๆ พบว่าขนาดของรูพรุนที่มีความเหมาะสมสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ ในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมีค่าประมาณ 100 - 200 ไมครอน (Hutmacher D.W., 2000, Langer R., 2000, Yannas I.V., 2001) Honda M. และคณะ ได้ใช้โครงเลี้ยงเซลล์จาก สารละลายของ PCL และ Poly-L-Lactic acid (อัตราส่วน 1:1) ที่ความเข้มข้น 0.1% (w/v) ใน Dioxane และขึ้นรูปโดยการระเหิดแห้งที่  $-30^{\circ}\text{C}$  ซึ่งให้ขนาดของรูพรุนเฉลี่ยที่ 100 ไมครอนได้ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณข้อจาก Lewis Rat ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร หลังจากทำการเลี้ยงใน Nude Mouse เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ (Honda M. et al. 2000)

จะเห็นว่าค่าความเข้มข้นของสารละลาย PCL ที่ใช้ในการทดลองนี้ มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของการศึกษาของ Honda M. และคณะ ถึง 300 เท่าเนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นมาที่ความเข้มข้น 0.1% (w/v) ในคลอโรฟอร์มมีคุณสมบัติเชิงกลไม่ดีเนื่องจากใช้ PCL เพียงอย่างเดียว ในขณะที่งานวิจัยของ Honda M. และคณะมีการผสม Poly-L-Lactic acid เพื่อเสริมความแข็งแรง แต่เมื่อ Poly-L-Lactic acid ย่อยสลายจะได้ Lactic Acid เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ เลือกใช้ PCL เพียงอย่างเดียว มีศึกษาพบว่า PCL มีคุณสมบัติที่ช่วยในการเพิ่มปริมาณเซลล์ (Cell Proliferation) ได้มากขึ้นถึง 1.54 – 4.51 เท่าในการเลี้ยงภายนอกร่างกาย (Ishuag-Riley S.L. et al., 1999, Kweon H.Y. et al., 2003) และจากการศึกษาของ Hutmacher D.W. และคณะ ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ Fibroblast ซึ่งเซลล์สามารถผลิต ECM ในเวลา 2 สัปดาห์ (Hutmacher D.W. et al., 2001)

#### 4.2.2.2 ค่าความพรุน (Porosity)

ความพรุนมีความสำคัญต่อโครงเลี้ยงเซลล์ในด้านการสนับสนุนการเคลื่อนที่ของเซลล์ การแพร่ผ่านของอาหารและน้ำจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ และส่งผลต่อปฏิกริยาระหว่างเซลล์ด้วยกัน (Cell-cell interaction) ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคการหล่อและผสมกับสารที่ทำให้เกิดรูพรุนนั้น ถ้าหากใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน จะมีค่าความพรุนสูงสุดที่ 93% (Hutmacher D.W., 2000, Lanza R.P. et al., 2000, Pêgo A.P., et al., 2003) ขึ้นอยู่กับปริมาณของเกลือที่นำมาผสมกับสารละลายพอลิเมอร์ โดยทั่วไปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยกระบวนการนี้มีค่าความพรุนที่ 20 – 93% (Lanza R.P. et al., 2000, Hutmacher D.W., 2000; Lu L. et al., 2001) ในขณะที่การทดลองนี้มีค่าความพรุนในช่วง 78 – 86% ซึ่งค่าความพรุนที่ได้จากการทดลองนั้น คำนวณจากวิธีการของ Salgado A.J. และคณะ ซึ่งคำนวณโดยใช้สมการ

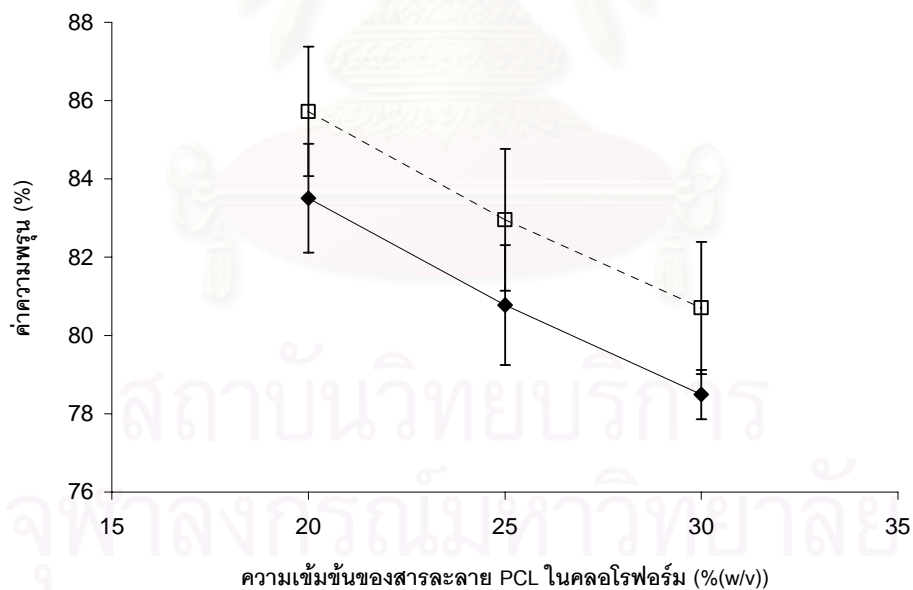
$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho^*}{\rho} \times 100\% \quad \text{----- (3.1)}$$

เมื่อค่า  $\varepsilon$  คือค่าความพรุน

ค่า  $\rho^*$  คือค่าความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยคำนวณจากน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์หารด้วยปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งวัดโดยการแทนที่น้ำ

ค่า  $\rho$  คือค่าความหนาแน่นของ PCL (Salgado A.J. et al. 2002) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.145 กรัมต่อซม<sup>3</sup>

จากการทดลองได้ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ดังตารางที่ 4.2 (ดูตัวอย่างการคำนวณค่าความพรุนได้ที่ภาคผนวก ค.) และรูปที่ 4.6 ซึ่งเห็นได้ว่าค่าความพรุนลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย PCL มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่หล่อจากสารละลาย PCL ที่ความเข้มข้นสูงกว่ามีปริมาณของ PCL ต่อปริมาตรมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่หล่อจากสารละลาย PCL ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า ซึ่งมีแนวโน้มเกือบจะเป็นเส้นตรง อย่างไรก็ตามค่าความพรุนที่ได้นั้นเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณ ถือเป็นกรหาค่าความพรุนโดยอ้อม ซึ่งอาจมีความผิดพลาดได้ เช่น การวัดปริมาตรของน้ำที่ถูกแทนที่ การหาค่าความพรุนโดยตรงสามารถหาได้โดยใช้เครื่อง BET (Brunauer-Emmett-Teller)



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความพรุนและ ความเข้มข้นของสารละลาย PCL ของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพรุน (◆) ผงซุรัสและเกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน (□) เกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน (n = 5)

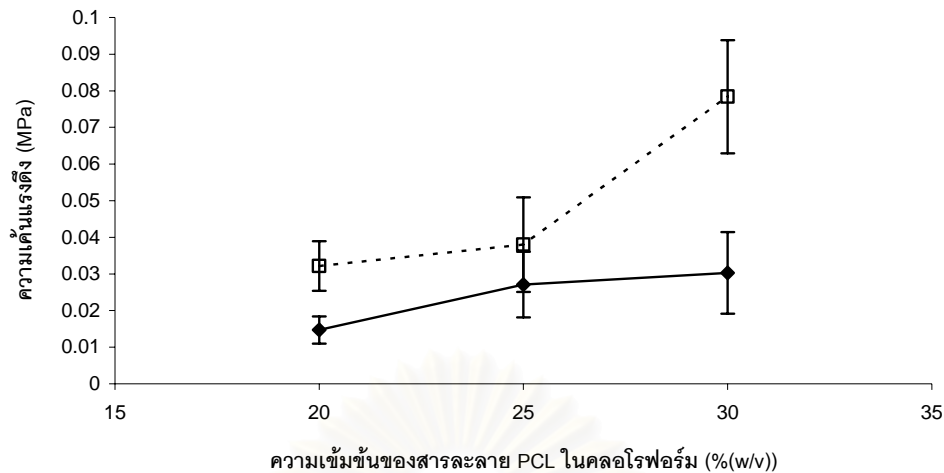
### 4.2.3 ค่าความเค้นแรงดึงของโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้ถูกวิเคราะห์ค่าความเค้นแรงดึง ซึ่งทำการวัดโดยใช้เครื่อง Universal Testing Machine ตามมาตรฐาน ASTM D-638 (ภาคผนวก ง.) เพื่อศึกษาการรับแรงดึงของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยความเค้นแรงดึงมีผลต่อการเสียรูปของโครงเลี้ยงเซลล์ในระหว่างการปลูกถ่าย ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าความเค้นแรงดึงได้ดังตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.7 โครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL โดยมีเกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน ที่ความเข้มข้นของ PCL ในคลอโรฟอร์มที่ 20, 25 และ 30% (w/v) มีค่าความเค้นแรงดึงที่ 0.0147, 0.0271 และ 0.0303 MPa (n = 6) ตามลำดับ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุนอย่างเดียว มีค่าความเค้นแรงดึงที่ 0.0322, 0.0380 และ 0.0784 MPa (n = 6) โดยปกติค่าความเข้มข้นของ PCL สูงจะมีค่าความเค้นแรงดึงสูงขึ้น เนื่องจากมีปริมาณของ PCL มากขึ้น แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้อัตราส่วนของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนต่อ PCL ที่ 15:1 เท่ากันทั้งหมด ที่ความเข้มข้นของ PCL 30%(w/v) จะมีปริมาณของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนเท่ากับ 15 กรัมต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน จะทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ ทำให้ขนาดของรูพรุนใหญ่ขึ้นมาก (ดูตารางที่ 4.2) มีผลทำให้ค่าความเค้นแรงดึงไม่สูงขึ้นมากเหมือนกับการใช้เกลืออย่างเดียวเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน เมื่อเปรียบเทียบจากรายงานการศึกษาซึ่งใช้โครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนจาก PCL ผสมกับ Poly-L-lactic acid ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ที่ความเข้มข้น 1%(w/v) ในคลอโรฟอร์ม ได้ค่าความเค้นแรงดึงที่ 0.81 MPa (Jeong S.I. et al. 2004) หรือโครงเลี้ยงเซลล์ที่ ขึ้นรูปโดยการ Freeze dry โดยใช้ PCL ที่ความเข้มข้น 0.1%(w/v) ใน Dioxane ได้ค่าความเค้นแรงดึงที่ 0.0324 MPa (Honda M. et al. 2000) จะเห็นได้ว่าความเค้นแรงดึงที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Honda M. และคณะ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นสามารถนำไปใช้ในการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองได้และเมื่อทำการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ PCL (30%w/v) รูปใหญ่โดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ได้ผิวหนังในสัตว์ทดลองเป็นเวลา 5 เดือน โครงเลี้ยงเซลล์ยังสามารถคงรูปอยู่ได้ (รูปที่ 4.8)

ตารางที่ 4.3 ค่าความเค้นแรงดึงของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุน

| ความเข้มข้นของสารละลาย PCL (% w/v) | ชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน | ค่าความเค้นแรงดึง (MPa)<br>n = 6 |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 20                                 | ผงชูรสและเกลือ               | 0.0147±0.0037                    |
|                                    | เกลือ                        | 0.0322±0.0068                    |
| 25                                 | ผงชูรสและเกลือ               | 0.0271±0.0089                    |
|                                    | เกลือ                        | 0.0380±0.013                     |
| 30                                 | ผงชูรสและเกลือ               | 0.0303±0.0111                    |
|                                    | เกลือ                        | 0.0784±0.0154                    |





รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเค้นแรงดึงและ ความเข้มข้นของสารละลาย PCL ของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้ (◆) ผงซูลและเกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน, (□) เกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน (n = 6)



รูปที่ 4.8 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ปลูกถ่ายใต้ผิวหนังในสัตว์ทดลองที่เวลา 5 เดือน โดยโครงเลี้ยงเซลล์รูปไบอูหยังคงรูปได้ดี

#### 4.2.4 การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

##### 4.2.4.1 การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*In vitro* biodegradation)

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายใน 2 รูปแบบ ได้แก่ การย่อยสลายในสารละลาย PBS ซึ่งเป็นการศึกษาผลการย่อยสลายในบัฟเฟอร์อย่างเดียวและการย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปสใน PBS ซึ่งเป็นการศึกษาผลการย่อยสลายในสภาวะที่มีเอนไซม์ที่คล้ายคลึงกับสภาวะในระบบเลือดของร่างกาย

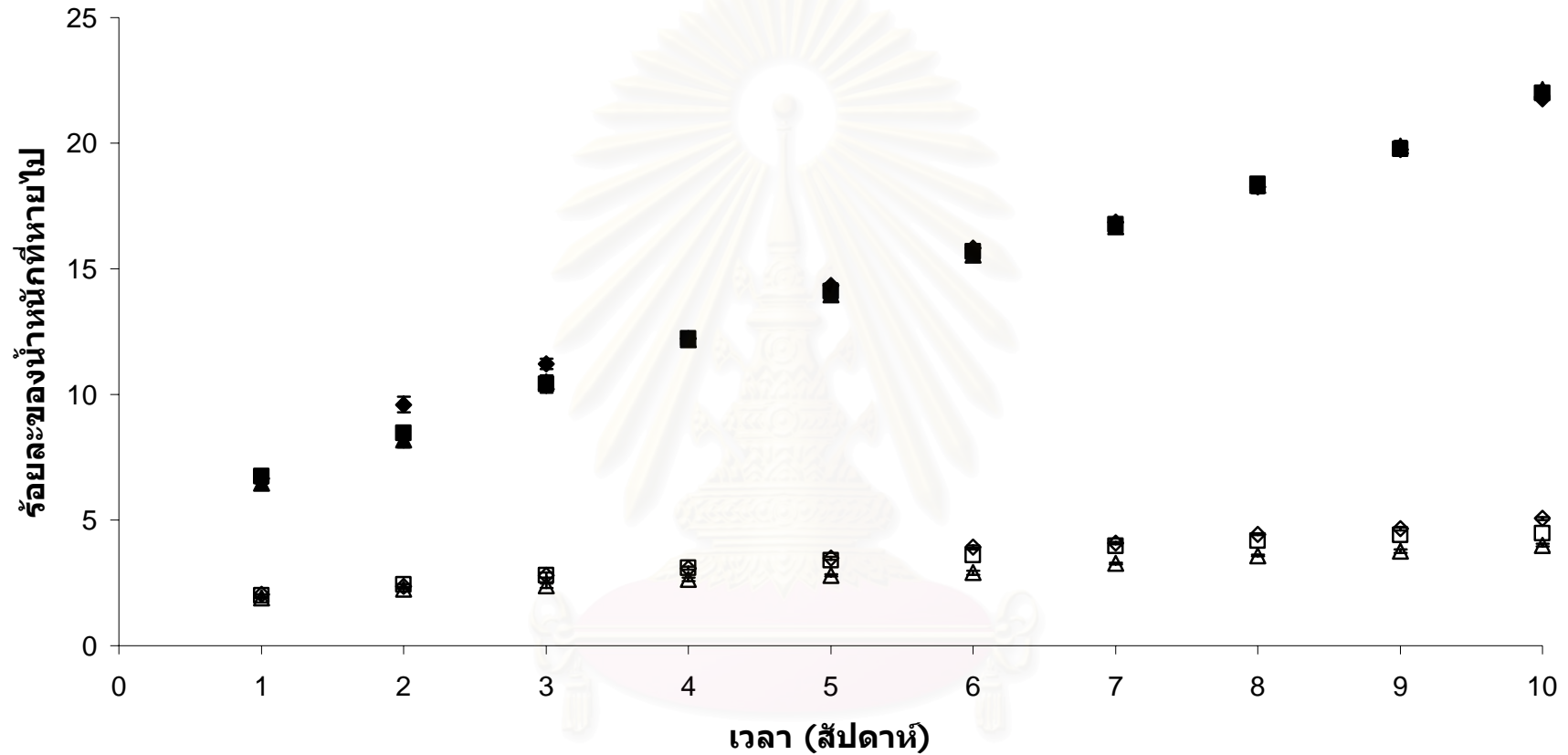
การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์ ในรูปของร้อยละของน้ำหนักที่หายไปเทียบกับเวลา ทำโดยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์แผ่นหน้ามีขนาด  $2 \times 1 \times 0.3$  ซม<sup>3</sup> มีน้ำหนักเฉลี่ยที่  $0.0492 \pm 0.0045$  กรัม พีเอช 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลาย

PBS และในสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ความเข้มข้น 30 U/l ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสในเลือดของผู้ใหญ่ (Burtis, C.A., and Ashwood, E.R., 1994) เพื่อศึกษาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของพันธะเอสเทอร์ในโครงสร้างของ PCL (Kweon H.Y. et al. 2003)

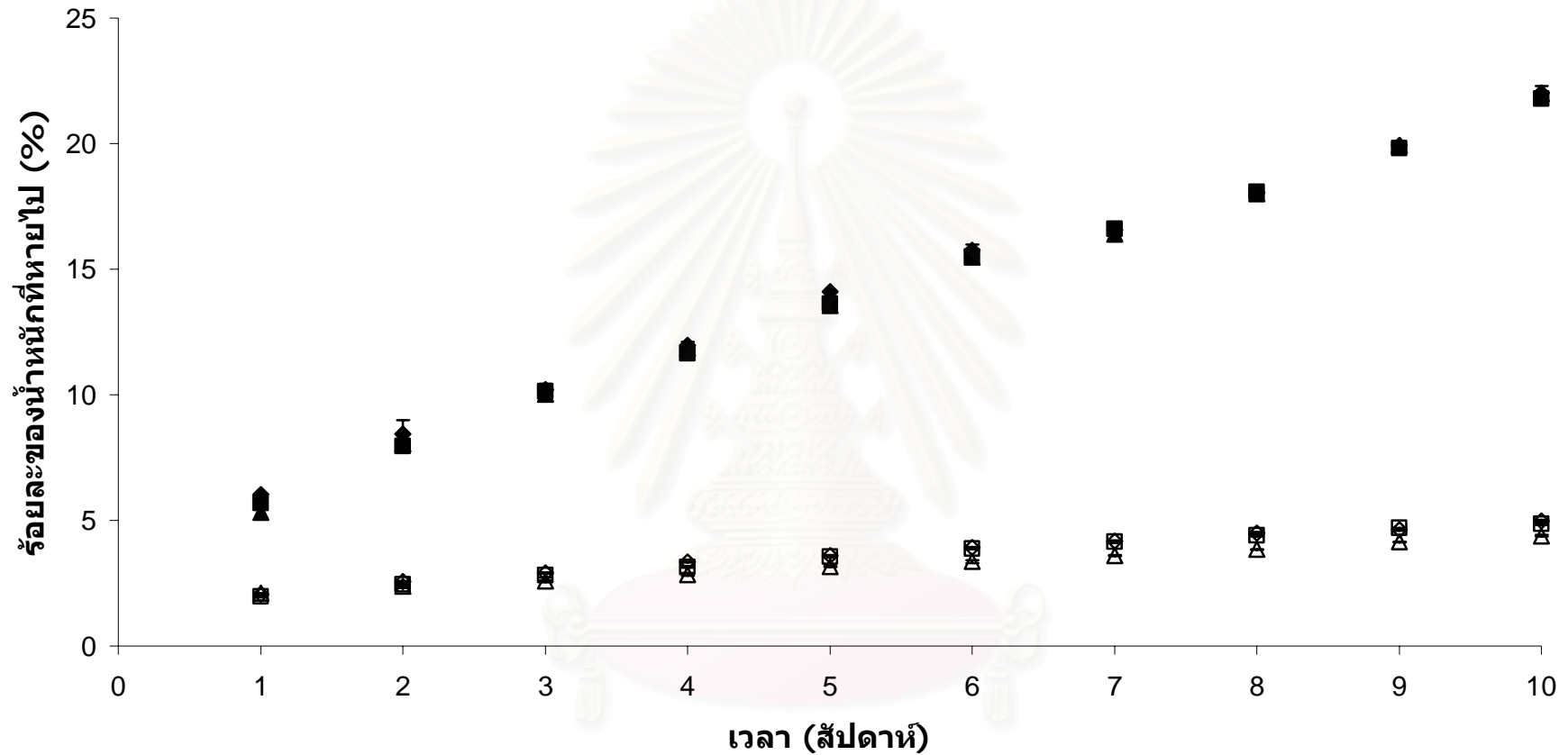
PCL มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์ พันธะเอสเทอร์ของโครงสร้างจะถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ไลเปส (Liu L., et al., 2000) ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสม (Optimum pH) ที่ 8.0 (Worthington Biochemical, 2004) สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบการย่อยสลายที่พีเอช 7.4 เนื่องจากเป็นค่าพีเอชของระบบหมุนเวียนโลหิตในร่างกาย (Campbell N.A., et al., 1999) จากรายงานการวิจัยที่ใช้เอนไซม์ไลเปสในการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของ PCL (Gan Z., et al., 1997, 1999, Liu L., et al., 2000, Li S., et al., 2002) พบว่า PCL ไม่ย่อยสลายในเอนไซม์ Lysozyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้การย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Campbell N.A., et al., 1999) เนื่องจาก Lysozyme สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของสารประเภท Peptidoglycan โดยตัดที่พันธะ  $\beta$ -1,4Glycosidic ของสารประเภทที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และไม่ได้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์

การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนในสารละลาย PBS (รูปที่ 4.9) ในเวลา 10 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้นของ PCL ที่ 20% 25% และ 30%(w/v) มีค่าของน้ำหนักที่หายไปที่ 5.06%, 4.47% และ 3.99% ในขณะที่การย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปสนั้น โครงเลี้ยงเซลล์ถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าประมาณ 5 เท่า คือ มีค่าของน้ำหนักที่หายไปที่ 21.77%, 22% และ 22.13% การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน (รูปที่ 4.10) ในสารละลาย PBS มีค่าของน้ำหนักที่หายไปที่ 4.99%, 4.86% และ 4.39% ในขณะที่การย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปสนั้น มีค่าของน้ำหนักที่หายไปที่ 22.03%, 21.89% และ 22% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพรุนนั้น พบว่าอัตราการย่อยสลายนั้นมีอัตราการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกันคือ 1.67% ต่อสัปดาห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 กราฟความแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนักที่หายไปต่อเวลา การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพรุนแบบแผ่นหนา ที่ความเข้มข้นของ PCL (◆) 20%, (■) 25% และ (▲) 30% (w/v) โดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน (สัญลักษณ์โปร่ง) แทนการย่อยสลายในสารละลาย PBS (สัญลักษณ์ทึบ) แทนการย่อยสลายในเอทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 30 U/l (n=4)



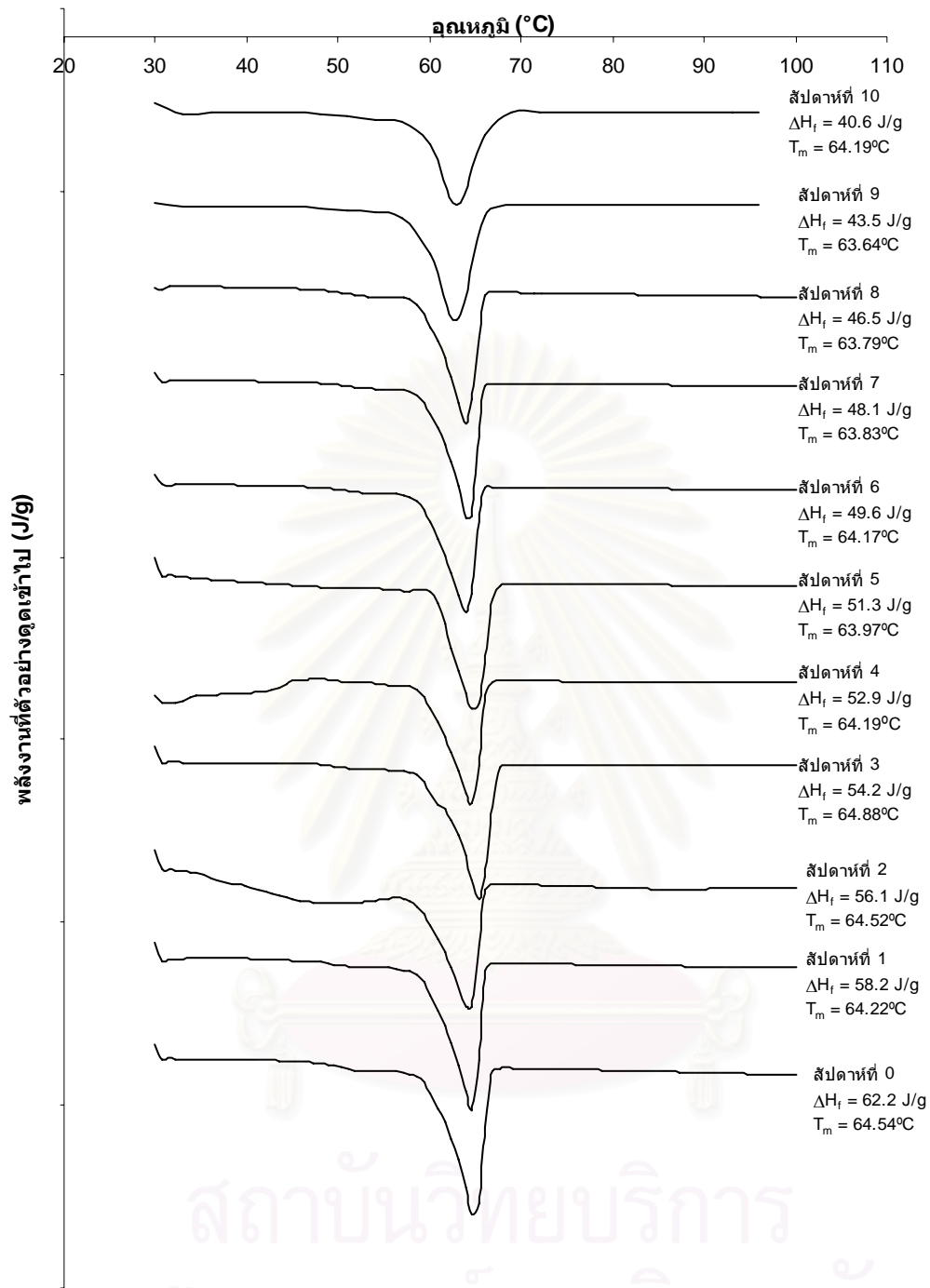
รูปที่ 4.10 กราฟการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนักรที่หายไปต่อเวลา การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพอรุนแบบแผ่นหนา ที่ความเข้มข้นของ PCL (◆) 20%, (■) 25% และ (▲) 30% (w/v) โดยใช้เกลือเป็นสารทำให้เกิดพอรุน (สัญลักษณ์โปร่ง) แทนการย่อยสลายในสารละลาย PBS (สัญลักษณ์ทึบ) แทนการย่อยสลายในเออนไซม์ไลเปสที่ความเข้มข้น 30 U/l (n=4)

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ ค่าความแตกต่างของค่าร้อยละของน้ำหนักที่หายไปในการละลาย PBS และไคโปสใน PBS เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบที ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย PCL และชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ไม่มีผลต่อการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญ (ดูภาคผนวก ฉ) ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลาย PCL ที่นำมาหล่อเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย อาจเป็นผลมาจากปริมาณของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่ใช้ในอัตราเดียวกันทั้งหมดที่ 15 เท่าของน้ำหนักของ PCL ส่งผลให้ค่าความพรุนมีค่าใกล้เคียงกัน อีกประการหนึ่งการย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนเป็น bulk erosion ซึ่งอัตราการย่อยสลายขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิว การทดลองการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์พบว่าอัตราการย่อยสลายประมาณ 0.28% ต่อสัปดาห์ใน PBS และ 1.68% ในเอนไซม์ไคโปส อย่างไรก็ตามอัตราที่น่าจะเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้นมากเมื่อเวลาผ่านไปนานๆ

การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย PBS โดยใช้ผลึก PCL ที่มีขนาด 0.3 ซม. พบว่าการย่อยสลายอยู่ที่ 3% ในเวลา 6 สัปดาห์ (Kweon H.Y. et al. 2003) ในงานวิจัยนี้โครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนจาก PCL มีอัตราการย่อยสลายที่ 3.36% ที่เวลา 6 สัปดาห์เช่นกัน เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นแบบพรุนซึ่งมีพื้นที่ผิวมากกว่าโครงสร้างที่เป็นผลึก รายงานการศึกษาการย่อยสลายของฟิล์ม PCL ในสารละลายเอนไซม์ไคโปสที่มีความเข้มข้น 8,000 U/l พบว่าน้ำหนักที่หายไปที่ 78.4 – 80% ภายในเวลา 48 – 72 ชั่วโมง (Li S. et al., 2002, Liu L., et al., 2000) ส่วนการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL-co-Poly-L-lactide (50:50) แบบพรุนโดยใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่มีความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ โครงเลี้ยงเซลล์ขนาด 40 x 6 x 6 มิลลิเมตร ในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.9 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถย่อยสลายไปทั้งหมดภายในเวลา 40 สัปดาห์ (Van Tienen T.G. et al., 2002)

PCL มีการย่อยสลายที่ช้า เมื่อเทียบกับพอลิเอสเตอ์ชนิดอื่นที่นำมาศึกษาการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน เช่น Polyglycolic acid, Poly-D,L-Lactic acid ซึ่งเป็นการย่อยสลายแบบ Bulk Erosion เหมือนกัน เนื่องจากคุณสมบัติของ PCL ที่มีความไม่ชอบน้ำสูง โครงสร้างของ PCL ที่มีสายโซ่คาร์บอนหลักขนาดยาวกว่า Polyglycolic acid และ Poly-D,L-lactic acid ซึ่งส่งผลให้น้ำเข้ามาในโมเลกุลได้ยาก (Siepmann, J. and Göpferich A., 2001) แต่ถ้าสารละลาย PBS มีเอนไซม์ไคโปสอยู่ด้วย ก็จะช่วยในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเตอ์ของโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งช่วยให้ น้ำสามารถเข้าไปตัดพันธะเอสเตอ์ของโครงสร้างที่เป็นผลึก PCL ได้เร็วขึ้น

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างผลึก ของโครงเลี้ยงเซลล์หลังการย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไคโปสโดยใช้เครื่อง DSC โครงเลี้ยงเซลล์แผ่นหนาที่ใช้เกลือและผงซูลฟเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน (รูปที่ 4.11) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย PCL 30% ในคลอโรฟอร์ม



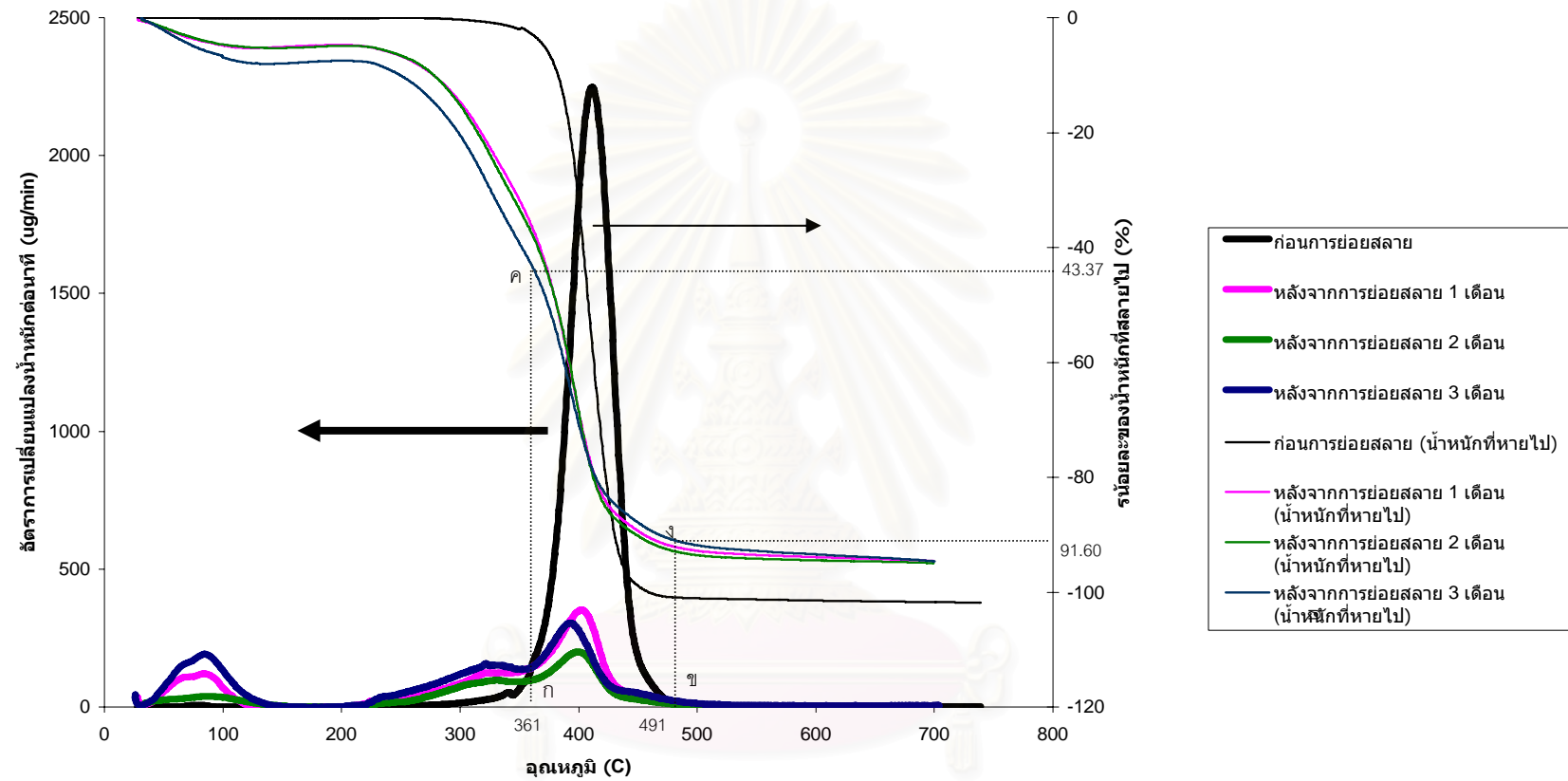
รูปที่ 4.11 กราฟการดูดความร้อนที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึก ( $\Delta H_f$ ) ของโคโรนาล์งเซลล์แบบแผ่นหนาจากโคโรนาล์งเซลล์ PCL (30%w/v) แบบพหุนโดยใช้เกลือและผงซุสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน หลังจากการย่อยสลายในสารละลายเอโนไซม์ไลเปสที่เวลาต่างๆ

ซึ่งเป็นสูตรเดียวกันกับที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน (รายละเอียดที่หัวข้อ 4.3) หลังจากย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่เวลา 1 – 10 สัปดาห์ โดยกราฟได้แสดงให้เห็นถึงพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างที่เป็นผลึกของ PCL ที่จุดต่ำสุดของกราฟ ซึ่งเป็นอุณหภูมิหลอมตัวผลึก ( $T_m$ ) ของ PCL มีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยในช่วง 63.64 – 64.88 องศาเซลเซียส แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีแนวโน้ม ซึ่งอาจคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ตัวอย่าง พลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึก ( $\Delta H_f$ ) ก่อนการย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปส มีค่าประมาณ ที่ 62.2 จูลต่อกรัม ค่า  $\Delta H_f$  นี้มีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น และที่สัปดาห์ที่ 10 ค่า  $\Delta H_f$  มีค่าประมาณ 40.6 จูลต่อกรัม หรืออีกนัยหนึ่งค่าร้อยละของโครงสร้างที่เป็นผลึก (Percent Crystallinity) มีค่าลดลงจาก 45.9% ไปเป็น 29.96% (คำนวณจากการเทียบค่า  $\Delta H_f$  ที่ 135.5 จูลต่อกรัม เมื่อ PCL มีโครงสร้างผลึกสมบูรณ์ หรือ 100% Crystallinity (Corden T.J., et al., 2000))

#### 4.2.4.2 การย่อยสลายทางชีวภาพภายในร่างกาย (*In vivo* biodegradation)

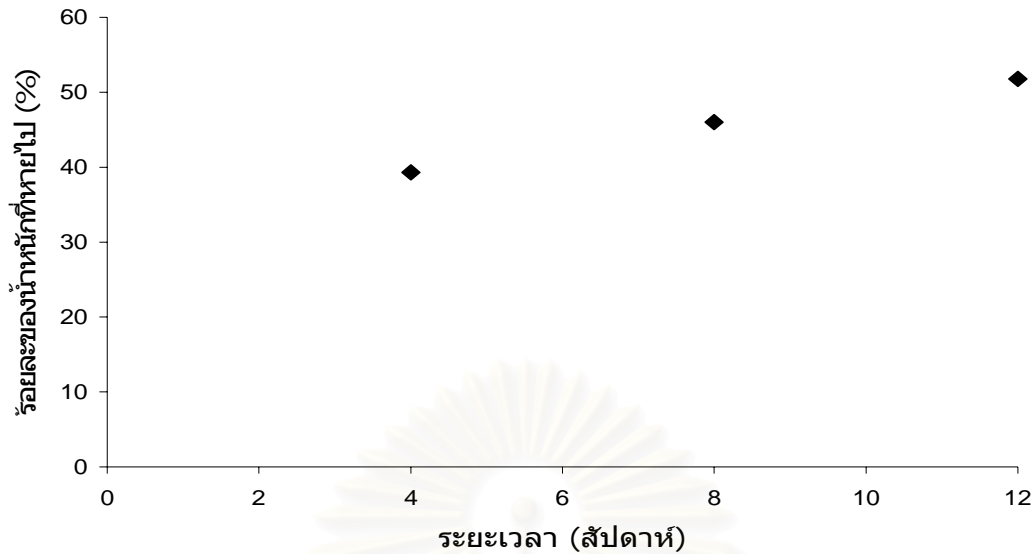
ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกายของสัตว์ทดลอง ในรูปของร้อยละของน้ำหนักที่หายไปโดยใช้เครื่อง TGA และ ค่า  $\Delta H_f$  ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก PCL (30%w/v) รูปไบหู ซึ่งเป็นแบบที่เลือกในการทดลองสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยทำการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ใช้เกลือและผงซุสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ที่บริเวณหลังของ Nude Mouse เพศเมียอายุ 4 – 5 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 1, 2 และ 3 เดือน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ถูกย่อยสลายไปด้วยเครื่อง TGA (รูปที่ 4.12) พบว่ายอดกราฟ (peak) ของอุณหภูมิในการสลายตัวของ PCL อยู่ที่ 425 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิสลายตัวของ PCL ในช่วง 361 – 493 องศาเซลเซียส การประมาณน้ำหนักที่หายไปของ PCL จากกราฟโดยวัดจากอุณหภูมิที่เป็นจุดเริ่มของยอดกราฟ (อุณหภูมิที่เริ่มมีการสลายตัว, จุด ก) ไปถึงอุณหภูมิที่เป็นจุดสิ้นสุดของยอดกราฟ (อุณหภูมิที่สารสลายตัวไปทั้งหมด, จุด ข) จากนั้นลากเส้นไปยังเส้นของน้ำหนักที่หายไป (ผลต่างของร้อยละของน้ำหนักที่หายไปของจุด ค และจุด ง) พบว่าปริมาณของ PCL เหลืออยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 60.68, 53.99 และ 48.23% ซึ่งให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการย่อยสลายไป 39.32, 46.01 และ 51.77% โดยน้ำหนัก ในเวลา 1, 2 และ 3 เดือนตามลำดับ เมื่อทำการวาดกราฟที่แสดงถึงความสัมพันธ์ปริมาณของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ย่อยสลายกับเวลาดังรูปที่ 4.13 จะเห็นว่าเดือนแรกมีการย่อยสลายไปอย่างรวดเร็ว ถึง 39.32% และหลังจากนั้นมียัตราการย่อยสลายที่ประมาณ 1.57% ต่อสัปดาห์ ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการย่อยสลายภายนอกในร่างกายซึ่งมีค่าประมาณ 1.67% ต่อสัปดาห์ (เมื่อคิดจากสัปดาห์ที่ 1 เป็นต้นไป) โดยสาเหตุที่ทำให้ค่าการย่อยสลายต่างกันนั้น เป็นผลมาจากเส้นเลือดที่เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 4.12 กราฟการวิเคราะห์การสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL (30%w/v) แบบพ่นรูปใบหูกโดยใช้เกลือและผงซอร์สเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนโดยใช้เครื่อง TGA หลังจากการย่อยสลายภายในร่างกายของสัตว์ทดลองที่เวลาต่างๆ โดยเส้นหนาแสดงถึงอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักต่อนาที และเส้นบางแสดงถึงร้อยละของน้ำหนักที่หายไประหว่างการสลายตัว

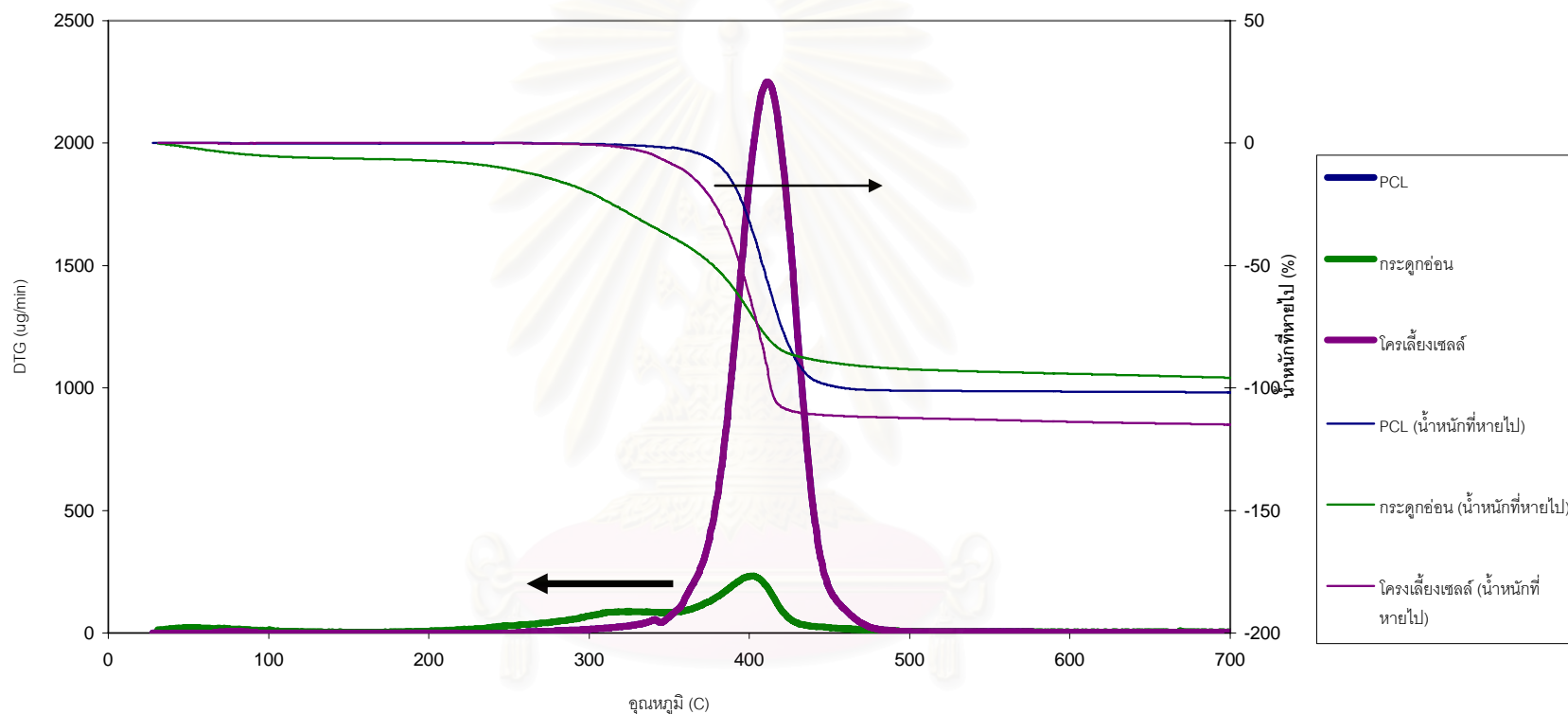




รูปที่ 4.13 กราฟแสดงร้อยละของน้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนจาก PCL (30%w/v) รูปใบหูต่อเวลา ที่มีการย่อยสลายภายในร่างกายสัตว์ทดลอง โดยใช้เกลือและผงชูรส เป็นสารทำให้เกิดรูพรุน (n = 2)

ปริมาณมากใน 4 สัปดาห์แรกและ ผลจากการอักเสบของแผลผ่าตัด ซึ่งมีผลในการส่งเสริมการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ทำให้อัตราการย่อยสลายสูงมากใน 4 สัปดาห์แรก และแรงภายนอกที่กระทำต่อโครงเลี้ยงเซลล์ เช่น แรงกดของผิวหนัง, ค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของไอออนโซลไปสในหนูทดลองและในร่างกายของมนุษย์

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการย่อยสลายทางชีวภาพของ PCL ในการทดลองนี้ กับการย่อยสลายของโครงเลี้ยง PCL-Alginate ที่มีการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน เป็นเวลา 6 เดือน ในสัตว์ทดลอง ปริมาณ PCL ที่เหลืออยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง TGA (ทดสอบโดย ผศ.ดร.พิชญ์ ศุภผล วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) แสดงดังรูปที่ 4.14 ขึ้นเนื้อเยื่อที่กระดูกอ่อนที่สร้างขึ้นโดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate มีปริมาณของ PCL ที่เหลืออยู่ประมาณ 46.38% โดยน้ำหนักหรือคิดเป็นน้ำหนัก 1.071 มิลลิกรัม (ตัวอย่างที่นำไปทดสอบหนัก 2.310 มิลลิกรัม) แสดงว่า PCL มีการย่อยสลายไป 57.6% หลังจากการเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกายและภายในสัตว์ทดลอง (รวมเวลา 6 เดือน 1 สัปดาห์) (ดูการคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ภาคผนวก ข3) ซึ่งใกล้เคียงกับการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ PCL อย่างเดียวเป็นเวลา 3 เดือน (51.77%, จากรูปที่ 4.13) ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาวะที่แตกต่างกัน กล่าวคือการปลูกถ่ายเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์ PCL อย่างเดียว โดยไม่มีเจลของ Alginate และเซลล์กระดูกอ่อน อาจมีผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาว (Macrophage ซึ่งมีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย) เข้ามาโครงเลี้ยงเซลล์และหลังไอออนโซลไปสทำลาย PCL ได้ง่ายกว่า



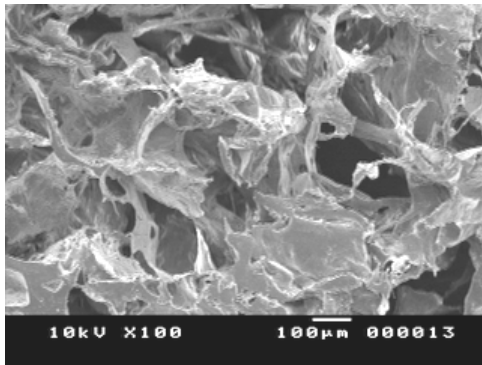
รูปที่ 4.14 กราฟการวิเคราะห์การสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate ที่มีการใช้เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์เป็นเวลา 6 เดือนโดยเครื่อง TGA โครงเลี้ยงเซลล์ PCL (30%w/v) แบบพอร์รูสแบบใช้เกลือและผงซุสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน จากการประมาณพบว่ามีปริมาณของ PCL เหลืออยู่ 46.38% โดยเส้นหนาแสดงถึงอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักต่อนาที และเส้นบางแสดงถึงร้อยละของน้ำหนักที่หายไประหว่างการสลายตัว

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลของ Alginate อยู่ และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยการย่อยสลายภายในร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพอรู จาก PCL โดยใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่มีความเข้มข้น 4 กรัมต่อกรัมพอลิเมอร์โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนา 10 ไมครอน ความพอรู 80% และทำการปลูกถ่ายได้ผิวหนังของหนู wild-type 129/SvEv พบว่ามีการย่อยสลายไป 45% ในเวลา 1 เดือน (Sung H.J. et al. 2004) ซึ่งค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

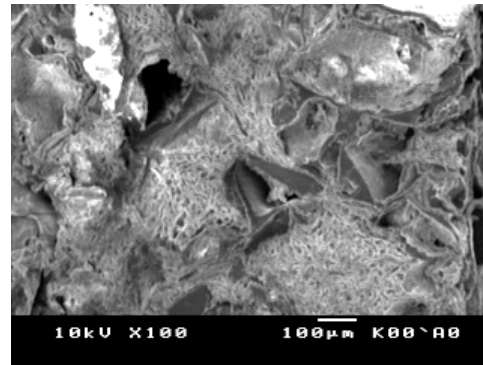
พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังจากการฝังในสัตว์ทดลองถูกตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4.15) พบว่าพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีโครงสร้างที่เป็นรูพรุนขนาดเล็กที่เห็นได้ที่บริเวณผนังรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4.15 ข) ในเดือนที่ 2 (รูปที่ 4.15 ค) รูพรุนเหล่านั้นมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งคาดว่าเกิดจากรูพรุนขนาดเล็กที่รวมตัวกัน และในเดือนที่ 3 (รูปที่ 4.15 ง) โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์มีการยุบตัว เนื่องจากโครงสร้างบางส่วนถูกทำลายไป ทำให้สามารถรับแรงได้น้อยลง

การวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างผลึกในโครงเลี้ยงเซลล์ PCL (30%w/v) รูปใบหูที่ใช้เกลือและผงซุสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน โดยใช้เครื่อง DSC (รูปที่ 4.16) พบว่า ค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว ( $T_m$ ) ของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากการปลูกถ่ายในหนูเป็นเวลา 1 – 3 เดือน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่ค่า  $\Delta H_f$  มีการลดลงตามเวลาของการปลูกถ่ายเช่นเดียวกับการย่อยสลายทางชีวภาพนอกร่างกาย โครงเลี้ยงเซลล์ที่ปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองระยะเวลา 1, 2 และ 3 เดือน มีค่า  $\Delta H_f$  ที่ 31.3, 19.7 และ 14.2 จูลต่อกรัม หรือมีโครงสร้างผลึกประมาณ 23.1%, 14.54% และ 10.48% โครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ลดด้วยอัตราประมาณ 6.24% ต่อเดือน (1.56% ต่อสัปดาห์) ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคเปสภายนอกร่างกายเป็น

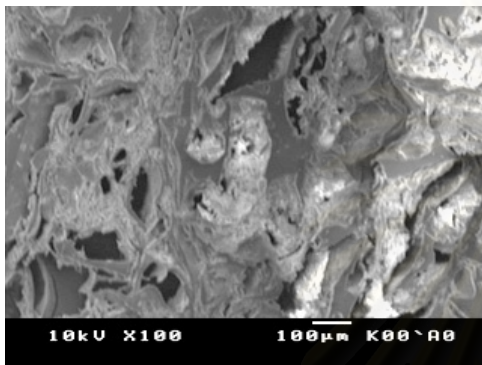
ระยะเวลา 1, 2 เดือน และ 2 เดือนครึ่ง มีค่า  $\Delta H_f$  เท่ากับ 52.9, 46.5 และ 40.6 จูลต่อกรัม หรือมีโครงสร้างผลึกประมาณ 39.04%, 34.32% และ 29.96% โดยลดลงที่อัตรา 1.44% ต่อสัปดาห์ (รูปที่ 4.17 และ 4.18) อัตราการย่อยสลายโครงสร้างผลึกของ PCL จากการย่อยสลายในร่างกายสูงกว่าอัตราการย่อยสลายภายนอกร่างกาย ด้วยสาเหตุเนื่องมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่นความแตกต่างของปริมาณของเอนไซม์ไคเปสในหนูทดลองกับในร่างกายของมนุษย์ หรือปริมาณของเอนไซม์ไคเปสที่เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดการอักเสบที่อาจช่วยในการเร่งการย่อยสลายให้เร็วขึ้น, การออกของเส้นเลือดเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ ใน 4 สัปดาห์แรกของการย่อยสลายซึ่งช่วยส่งเสริมการย่อยสลายให้เร็วขึ้น, ผลจากแรงกดที่กระทำต่อโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละของโครงสร้างผลึกกับอัตราการหายไปของน้ำหนัก เห็นว่าแนวโน้มตรงกันเนื่องจากการย่อยสลายมีการย่อยสลายทั้งส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous) และส่วนที่เป็นโครงสร้างผลึก (Crystalline) ควบคู่กัน



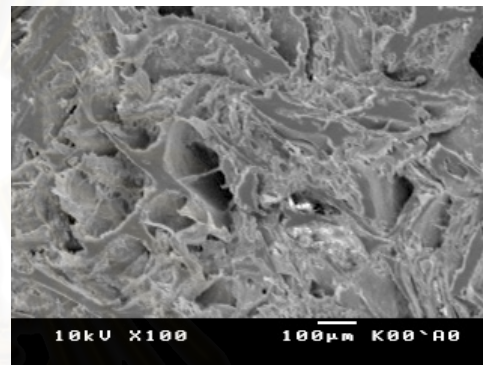
(ก)



(ข)



(ค)

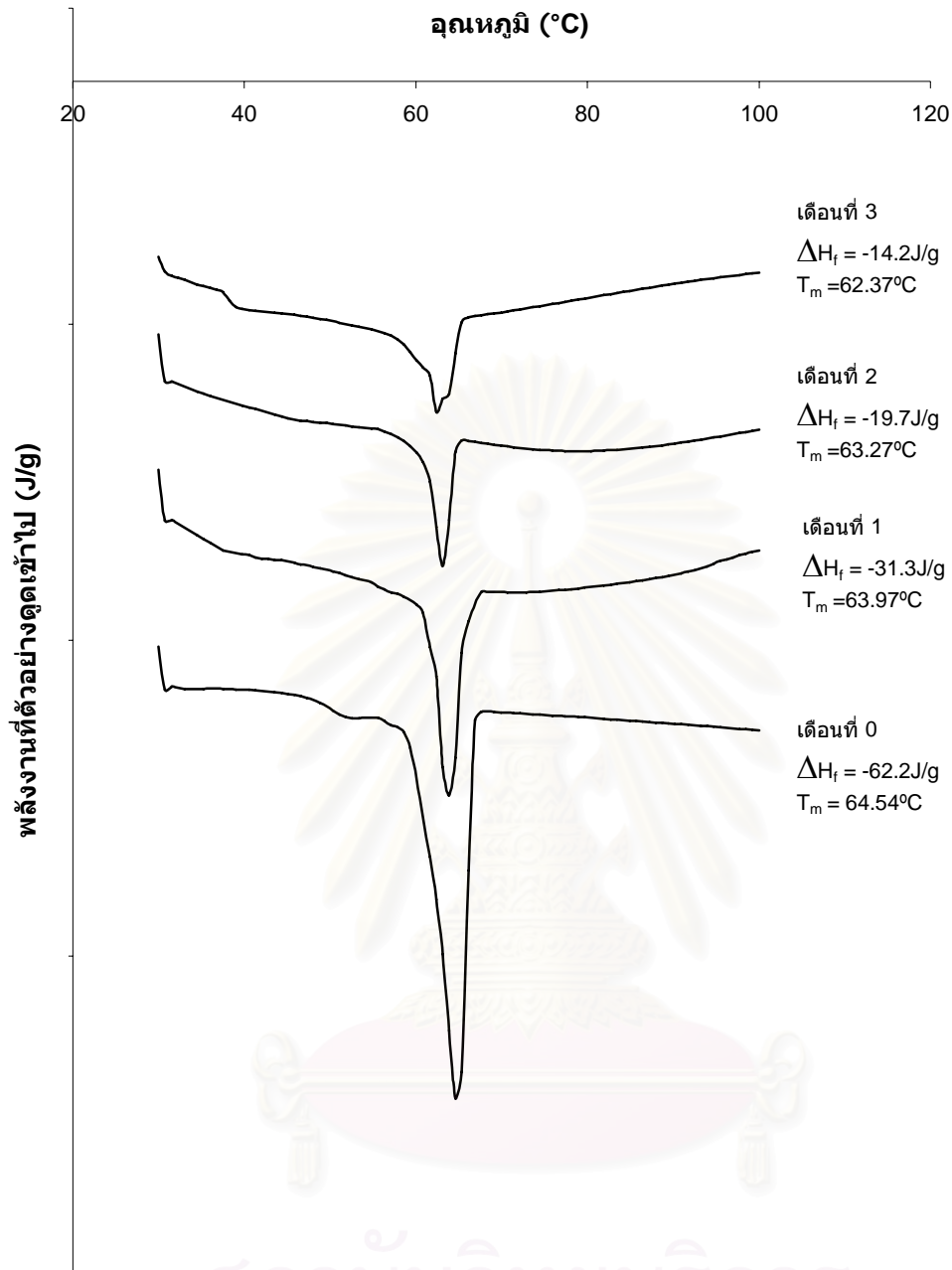


(ง)

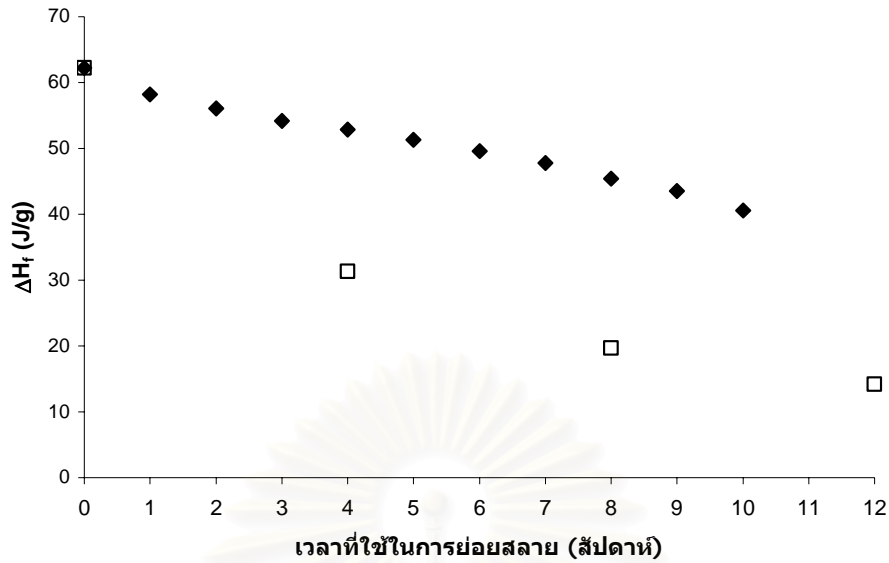
รูปที่ 4.15 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์จากย่อยสลายภายในร่างกายสัตว์ทดลอง ของโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL (30%w/v) แบบพูนรูปไบหู โดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพรุน

- (ก) ก่อนทำการฝังใต้ผิวหนังหนู
- (ข) หลังจากการฝังใต้ผิวหนังหนูเป็นเวลา 1 เดือน
- (ค) หลังจากการฝังใต้ผิวหนังหนูเป็นเวลา 2 เดือน
- (ง) หลังจากการฝังใต้ผิวหนังหนูเป็นเวลา 3 เดือน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 กราฟการดูดความร้อนที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์รูปไบโหจากร PCL (30%w/v) แบบพอรุนโดยใช้เกลือและผงซุรสเป็นสารที่ทำให้เกิดพอรุน หลังจากการย่อยสลายในร่างกายสัตว์ทดลองที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์รูปไบโหจุจาก PCL (30%w/v) แบบพอรุนโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน หลังจากการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ (◆) แทนการย่อยสลายในสารละลายเอโนไซม์ไลเปสในห้องปฏิบัติการ (□) แทนการย่อยสลายภายในร่างกายสัตว์ทดลอง



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงค่าร้อยละของโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์รูปไบโหจุจาก PCL (30%w/v) แบบพอรุนโดยใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน หลังจากการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ (◆) แทนการย่อยสลายในสารละลายเอโนไซม์ไลเปสในห้องปฏิบัติการ (□) แทนการย่อยสลายภายในร่างกายสัตว์ทดลองโดยเทียบจากค่า  $\Delta H_f$  ที่ 135.5 จูลต่อกรัมมีค่าโครงสร้างผลึก 100% (Corden T.J. et al., 2000)

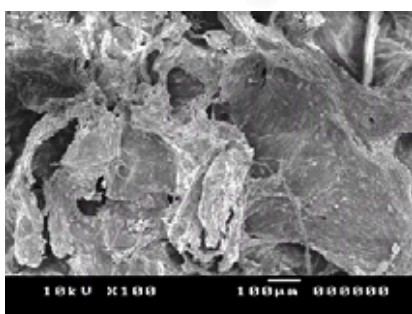
### 4.3 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ PCL

โครงเลี้ยงเซลล์ PCL (30%w/v) ที่มีเกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ถูกเลือกใช้ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ เนื่องจาก ความเห็นของศัลยแพทย์ที่เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้มีความทนทานต่อแรงกดเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนใต้ผิวหนังของสัตว์ทดลอง โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้มีขนาดของรูพรุนเฉลี่ยที่ใหญ่ที่สุดคือที่ 205 ไมครอน ซึ่งคาดว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้จะมีการแลกเปลี่ยนอาหาร น้ำและก๊าซได้ดี, มีเนื้อที่ในรูพรุนขนาดใหญ่ที่จะบรรจุเจลของ Alginate ได้มาก

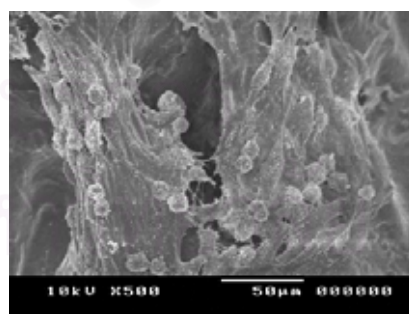
การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ทำการเลี้ยงโดย นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ ภาควิชาสัตสค นาสสิกวิทยา คุณสุปราณี บุรณประดิษฐ์กุล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คุณโสม ทองอินทร์ สำนักงานบริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (สำหรับการเลี้ยงสัตว์ทดลอง) และย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อ พร้อมทั้งพิสูจน์เนื้อเยื่อทาง Histology โดย รศ.พญ.วรรณช ธานีจ คุณปรีชา เรืองเวชวรชัยและ บุคลากร ในภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.3.1 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro* culture)

เซลล์กระดูกอ่อนที่ทำการสกัดแยกออกมาได้แล้วนั้น ถูกนำมาผสมกับสารละลาย Alginate ความเข้มข้นเริ่มต้นที่  $20 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดบนโครงเลี้ยงเซลล์และทำการ Crosslink เจลของ Alginate ด้วยสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ  $5\% \text{CO}_2$  นาน 1 สัปดาห์ พบว่ามีเซลล์เข้าไปด้านในของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ดังรูปที่ 4.19



(ก) กำลังขยาย 100 เท่า



(ข) กำลังขยาย 500 เท่า

รูปที่ 4.19 เซลล์กระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์หลังทำการเลี้ยงภายนอกร่างกายนาน 1 สัปดาห์

เมื่อเทียบกับรายงานการทดลองเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย ซึ่งทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน บริเวณข้อต่อของมนุษย์ (Human Articular Cartilage) บนแผ่นฟิล์มของ PCL ที่ขึ้นรูปโดยการหล่อ ที่ความเข้มข้นของสารละลาย PCL ที่ 1.5% (w/v) ใน Methylene Chloride พบว่า PCL นั้นมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (Ishuag-Riley, S.L., et al., 1999) Alginate มีส่วนช่วยในการเปลี่ยนรูปร่าง (Differentiation) โดยการเร่งการสร้าง ECM (Schluze M. et al., 2000, Masuda K. et al., 2003, Awad H.A., et al., 2004)

#### 4.3.2 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกาย (*in vivo* culture)

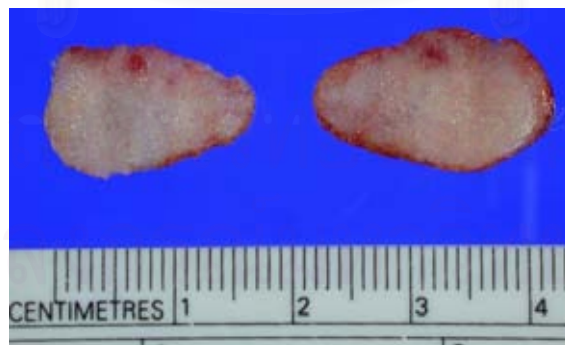
เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์ภายนอกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำมาปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง เป็นเวลา 2, 3 และ 6 เดือน สังเกตพบเนื้อเยื่อ Fibroblast และหลอดเลือด หุ้มที่โครงเลี้ยงเซลล์ในเดือนที่ 2 (รูปที่ 4.20ก) ในเดือนที่ 6 สังเกตเห็นเนื้อเยื่อ Fibroblast ที่หุ้มภายนอก มีปริมาณลดลง มีเนื้อเยื่อลักษณะแข็งสีขาวเกิดขึ้นด้านในโครงเลี้ยงเซลล์ และพบหลอดเลือดแทรก ระหว่างเนื้อเยื่อ (รูปที่ 4.20ข) เมื่อผ่าดูภายในโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีการเจริญเติบโต และโครงเลี้ยงเซลล์สามารถคงรูปในระหว่างการปลูกถ่ายได้ดี (รูปที่ 4.20ค)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.20 ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการเลี้ยงในสัตว์ทดลอง

(ก) ที่เวลา 2 เดือน

(ข) ที่เวลา 6 เดือน

(ค) ภาพตัดขวางของชิ้นเนื้อเยื่อที่เวลา 6 เดือน

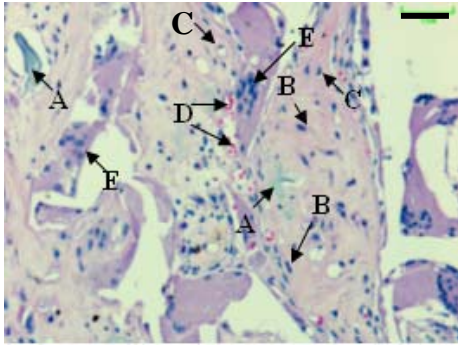


ในระยะเวลา 2 เดือนแรกของการเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองพบว่า มีเส้นเลือดไปหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 4.21 (ก) และเมื่อทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อทาง Histology โดยใช้เทคนิคการย้อมสี (Staining) แบบ H&E พบว่าชั้นเนื้อเยื่อที่ได้นั้น มีการสร้างเซลล์กระดูกอ่อนและ ECM ขึ้นมาบางส่วน โดยพบว่าชั้นเนื้อติดดีซิมพูปนเทา (บริเวณ A) ซึ่งมีขนาดที่  $624 \pm 178.62$  ไมครอน ( $n=5$ ) เซลล์กระดูกอ่อนส่วนใหญ่ยังคงมีรูปร่างเป็นกระสวย (B) (Spindle-shaped หรือ Fusiform) และบางส่วนเริ่มมีการเติบโตไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนใน Lacunar (C) ซึ่งการพบเซลล์กระดูกอ่อนใน Lacunar โดยทั่วไปจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์กระดูกอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญเติบโตเต็มที่ (Mature cartilage) (Kierzenbaum A.L., 2002) นอกจากนี้ยังพบหลอดเลือด (D), Fibroblast และ Macrophage (E) ที่เข้ามาอยู่ PCL ที่บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ และ PCL

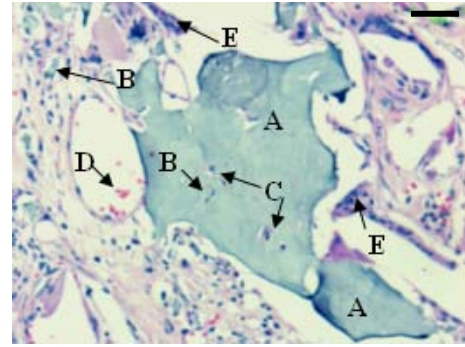
ในเดือนที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองพบว่า มีเส้นเลือดไปหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น เช่นเดียวกับเดือนที่ 2 และเมื่อทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อทาง Histology โดยใช้เทคนิคการย้อมสี (Staining) แบบ H&E (รูปที่ 4.21ข) พบว่าชั้นเนื้อเยื่อที่ได้นั้น เมทริกซ์มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งมีขนาดที่  $648 \pm 111.43$  ไมครอน เซลล์กระดูกอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกอ่อนใน Lacunar เพิ่มขึ้น เมทริกซ์เพิ่มขึ้นมากกว่าเดือนที่ 2 แต่ยังคงพบเซลล์รูปกระสวย ส่วนปริมาณของหลอดเลือดและ Fibroblast ปริมาณลดลง

ในเดือนที่ 6 (รูปที่ 4.21ค) ของการเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองพบว่า ขนาดของกระดูกอ่อนที่สร้างมีขนาดใหญ่ขึ้นที่  $1196 \pm 54.26$  ไมครอน และเซลล์มีพัฒนาการที่ดี โดยมากเซลล์กระดูกอ่อนอยู่ใน Lacunar และมีเมทริกซ์รอบๆ จำนวนมาก ส่วนเซลล์กระดูกอ่อนในรูปกระสวยพบในปริมาณน้อยมาก ปริมาณของหลอดเลือด, Fibroblast และ Macrophage มีปริมาณลดลง

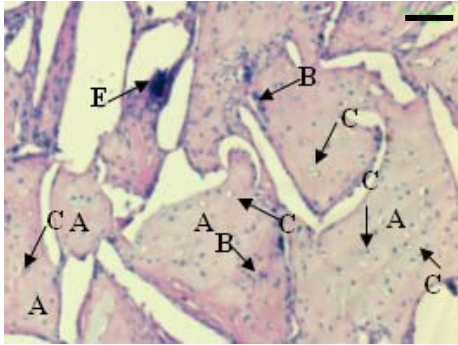
จากรูปที่ 4.21 (ก) (ข) และ (ค) เซลล์ส่วนที่ติดอยู่กับ PCL (ส่วนที่เป็นช่องว่างสีขาว) มีลักษณะเป็นรูปกระสวย, มี Fibroblast และ Macrophage ปะปนอยู่ ในขณะที่เซลล์ที่อยู่ในเนื้อเจลของ Alginate นั้นมีการสร้างเมทริกซ์ของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนใน Lacunar แสดงให้เห็นว่า PCL ไม่สนับสนุนในการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์กระดูกอ่อนไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์บริเวณข้อ บนโครงเลี้ยงเซลล์ PCL แบบเส้นใยเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า PCL ไม่สนับสนุนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกอ่อนไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Hutmacher D.W., et al., 2003) ในขณะที่เจล Alginate นั้นส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์กระดูกอ่อนไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ดังที่มีรายงานวิจัยที่ทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์บริเวณข้อในเจล Alginate รูปทรงกลมขนาด 3 มิลลิเมตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามี GAGs และคอลลาเจนชนิด II เกิดขึ้น (Schluze M. et al., 2000, Masuda K. et al., 2003, Awad H.A., et al., 2004)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.21 ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ในสัตว์ทดลองที่ผ่านการย้อมสีแบบ H&E

(ก) ที่เวลา 2 เดือน (bar = 50 ไมครอน)

(ข) ที่เวลา 3 เดือน (bar = 50 ไมครอน)

(ค) ที่เวลา 6 เดือน (bar = 100 ไมครอน)

เมื่อ (A) คือ เมทริกซ์ของกระดูกอ่อน (B) คือเซลล์กระดูกอ่อนรูปกระสวย (C) คือเซลล์กระดูกอ่อนใน Lacunar หรือกระดูกอ่อนที่สมบูรณ์ (Mature Cartilage) (D) คือเส้นเลือด (E) คือเซลล์ Fibroblast และ Macrophage

ตารางที่ 4.4 เป็นการเปรียบเทียบสถานะของวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกอ่อนจากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Honda M. และคณะ ซึ่งทำการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของ Lewis rat ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่  $10^8$  เซลล์ต่อ  $\text{cm}^3$  โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL ผสมกับ Poly-L-Lactic acid (PLLA) ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ 0.1% (w/v) ในขณะที่งานวิจัยนี้ได้ใช้เซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์และโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL เพียงอย่างเดียว โดยมีการใช้เซลล์เริ่มต้นน้อยกว่าประมาณ 5 เท่า จะเห็นความหนาแน่นของเซลล์กระดูกอ่อนบริเวณภายในรู แต่บริเวณช่องว่างคือผนังของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ถูกย่อยสลายไปในเวลา 6 เดือน แสดงถึงลักษณะการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ที่จะต้องมีการปรับปรุงให้มีความหนาแน่นของผนังรูพรุนน้อยลง เพื่อให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในสัตว์ทดลองระหว่างงานวิจัยนี้และงานวิจัยของ Honda M. และคณะ

|   | งานวิจัยนี้  | งานวิจัยของ Honda M. และคณะ (2000)   |
|---|--|--|
| ชนิดของพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์   | PCL (30%w/v) ในคลอโรฟอร์ม  | 1:1 PCL/PLLA (0.1%w/v) ใน Dioxane  |
| วิธีการขึ้นรูปของโครงเลี้ยงเซลล์                | การหล่อ (Casting)  | Freeze Dry   |
| รูปร่างและขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์                | รูปหูขนาด 2x1x0.35 ซม.   | จาน (Disc) เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม.หนา 2 มม.   |
| ขนาดของรูพรุน                                   | 205 ไมครอน   | 100 ไมครอน   |
| ชนิดของเซลล์ที่ใช้เลี้ยง                        | Human rib chondrocyte  | Lewis rat articular chondrocyte  |
| ปริมาณเซลล์เริ่มต้น                             | $20 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร   | $10 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร   |
| อาหารเลี้ยงเซลล์                                | HAM-F12 + 10% FBS  | DMEM + 10% FBS   |
| สภาวะที่ใช้เลี้ยง                               | Nude Mouse เพศเมีย อายุ 5 สัปดาห์  | Nude Mouse เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์   |
| ภาพแสดงการย้อมสีแบบ H&E ของชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้ | <br>ที่เวลา 6 เดือน | <br>ที่เวลา 1 เดือน |

งานวิจัยนี้เป็นความพยายามครั้งแรกที่จะพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ให้เป็นโครงแข็งที่สามารถทนทานต่อแรงกดอันจะเกิดขึ้นในการปลูกถ่าย และใช้ Alginate เป็นตัวช่วยกระจายเซลล์ให้มีความสม่ำเสมอภายในโครงเลี้ยงเซลล์และสนับสนุนการเจริญเติบโต การแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์กระดูกอ่อน การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีความจำเป็น นอกเหนือจากการทดสอบการเลี้ยงเซลล์

ค่าความเค้นแรงดึง นั้นเป็นดัชนีที่ชี้วัดการรับแรงดึงว่าโครงเลี้ยงเซลล์นั้นสามารถรับแรงดึงได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างขึ้นนี้เป็นแบบพรุนที่มีการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง ซึ่งควรมีการวัดค่าเพื่อตรวจสอบดูว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นสามารถทนต่อ

แรงดึงเมื่อมีการปลูกถ่ายได้หรือไม่ ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการศึกษาของ Honda M. และ คณะ คือมีค่าความเค้นแรงดึงที่ 0.0324 MPa หลังจากการปลูกถ่ายได้ผิวหนังสัตว์ทดลองพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถทนต่อแรงกดและคงรูปใบหูได้อย่างชัดเจน

การวัดอัตราการย่อยสลายภายนอกในร่างกายโดยการแช่ในสารละลาย PBS ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับระบบบัฟเฟอร์ในระบบเลือด มีค่าพีเอชในช่วง 6.4 - 7.4 ซึ่งสามารถนำไปเทียบเคียงกับสภาวะในร่างกายได้ อย่างไรก็ตามส่วนประกอบของของเหลวในร่างกาย (Body fluid) นั้นมีส่วนประกอบอื่นๆ อีก เช่น เอนไซม์, ฮอริโมน, Immunoglobulin, Cytokine เป็นต้น การทดสอบการย่อยสลายของ PCL ในสารละลาย PBS ตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่า การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์มีเพียงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นเพียงอย่างเดียว (Mohan C., 1999 และ Hutmacher D.W. 2000) การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ไลเปสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ในโครงสร้างของ PCL โดยเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ที่น้ำย่อยที่บริเวณลำไส้เล็ก, น้ำลาย และในเลือด เอนไซม์ไลเปสในเลือดมีความเข้มข้นประมาณ 30 U/l (Burtis C.A. and Ashwood E.R., 1994) ในงานวิจัยนี้พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ที่ผลิตขึ้นถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสประมาณ 22% ในเวลา 10 สัปดาห์ แต่การย่อยสลายใน PBS ไปเพียง 4 - 5% ในเวลา 10 สัปดาห์ ในห้องปฏิบัติการสำหรับการย่อยสลายในร่างกายนั้น โครงเลี้ยงเซลล์ถูกย่อยสลายเร็วกว่าถึง 2.2 เท่าของการย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ไลเปสทั้งนี้เนื่องจาก มีการงอกของเส้นเลือดจำนวนมาก ใน 4 สัปดาห์แรกของการย่อยสลายภายในสัตว์ทดลอง ซึ่งส่งเสริมให้มีการย่อยสลายของโครงเลี้ยงให้เร็วขึ้น อีกทั้งในระบบของร่างกายนั้นมีสารคัดหลั่งต่างๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์นอกจาก เอนไซม์ไลเปส เช่น สารประเภท Immunoglobulin, เอนไซม์อื่นๆ ที่มีผลในการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย

หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าชิ้นเนื้อหลังการเพาะเลี้ยงมีปริมาณของ PCL เหลืออยู่ประมาณ 46.38% แสดงว่าอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนจาก PCL ที่ผลิตได้ช้ากว่าอัตราการสร้างเนื้อเยื่อของเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการลดความเข้มข้นของ PCL ที่ใช้ หรือเพิ่มปริมาณของสารที่ทำให้เกิดพรุนเพื่อให้อัตราการย่อยสลายสัมพันธ์กับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งจะส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสมบูรณ์มากขึ้น อย่างไรก็ตามผลจากงานวิจัยนี้ซึ่งชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการผลิตเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนทดแทนสำหรับผู้ป่วยที่มีความต้องการเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ PCL-Alginate ที่ผลิตขึ้น โดยจะต้องมีการปรับปรุงโครงแข็งของ PCL ให้มีพื้นที่ผิวสูง มีผนังของรูพรุนที่บางแต่ยังคงความแข็งแรงเพื่อดำเนินงานแรงกดได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของมนุษย์ ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ PCL และ Alginate เป็นครั้งแรก ผลจากการทดลองในงานวิจัยนี้จะถูกนำมาเป็นแนวทางในการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สองชนิดคือ PCL และ Alginate ซึ่งให้ประโยชน์ต่างกัน โดย PCL ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ ทำหน้าที่เป็นโครงแข็งที่ทนแรงกดจากการปลูกถ่ายได้ผิวหนังได้และ ให้ระยะเวลาในการย่อยสลายที่ยาวนาน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเนื้อเยื่อชนิดแข็ง (Hard tissue) เมื่อ PCL ย่อยสลายในร่างกายจะได้ Caproic acid ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ส่วน Alginate จะช่วยให้เซลล์กระดูกอ่อนกระจายตัวดีสม่ำเสมอในโครงสร้าง และสนับสนุนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้จะสามารถนำมาเป็นแนวทางในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ดังนี้

1. โครงเลี้ยงเซลล์ PCL ที่เตรียมโดยวิธีการหล่อ โดยใช้เกล็ดและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนมีค่าความพรุนและความเค้นแรงดึงน้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เกล็ดเพียงอย่างเดียวเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ PCL (30% w/v) โดยใช้เกล็ดและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เนื่องจากความเห็นของศัลยแพทย์ที่เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้มีความทนทานต่อแรงกด เหมาะสมที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน
2. ค่าความเข้มข้นของสารละลาย PCL มีผลต่อค่าความพรุน และความเค้นแรงดึง คือ ยิ่งความเข้มข้นของสารละลาย PCL มากส่งผลให้ค่าความพรุนลดลงแต่มีค่าความเค้นแรงดึงมากขึ้น
3. การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนจาก PCL เป็นการย่อยสลายแบบ Bulk erosion การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย PBS ที่ พีเอช 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีอัตราการย่อยสลายช้ากว่าการย่อยสลายในสารละลาย เอนไซม์ไคเปสประมาณ 5 เท่า และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองจะ

มีอัตราการย่อยสลายเร็วกว่าการย่อยสลายในเอนไซม์ไลเปสในห้องปฏิบัติการ ประมาณ 2.35 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากแรงภายนอกที่กระทำต่อโครงเลี้ยงเซลล์ เช่นแรงกดที่กระทำกับโครงเลี้ยงเซลล์ในขณะที่สัตว์ทดลองมีการเคลื่อนไหว และผลจากความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่ไม่เท่ากันในร่างกายของมนุษย์และหนูทดลอง โดยเฉพาะเมื่อเกิดการอักเสบของแผลจะมี Macrophage ที่จะผลิตสารที่ช่วยในการย่อยสลายจำนวนมากออกมา

4. ความเข้มข้นของสารละลาย PCL, และชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนไม่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ในระยะเวลา 10 สัปดาห์
5. ในการเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองเพื่อผลิตเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของมนุษย์ โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นจาก PCL 30%(w/v) แบบพรุนรูปไบฮู และใช้เกลือและผงชูรสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนและการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเจลของ Alginate ในเดือนที่ 2 เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่สมบูรณ์บางส่วน และเมื่อในเดือนที่ 6 เซลล์ส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม อาจจะมีการปรับปรุงให้ความหนาแน่นของเซลล์มากขึ้นได้ โดยการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีผนังของรูพรุนบางกว่านี้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ผลการวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงมีแนวทางปรับปรุงและศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

1. ขนาดของรูพรุนมีขนาดต่างกันค่อนข้างมาก เนื่องจากไม่ได้มีการคัดขนาดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่นำมาผสมกับสารละลาย PCL ซึ่งแก้ไขโดยการคัดขนาดให้มีขนาดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนที่ค่าใกล้เคียงกัน เช่นการใช้ตะแกรงร่อน (Sieving)
2. ปริมาณของเซลล์กระดูกอ่อนจากผู้บริจาคที่เป็นมนุษย์มีจำกัด จึงจำกัดปริมาณซ้ำของการศึกษา โดยอาจใช้เซลล์กระดูกอ่อนบริเวณอื่น เช่นกระดูกอ่อนที่เหลือจากการผ่าตัดเสริมจมูก ซึ่งอาจจะหาได้มากกว่า
3. หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL-Alginate เป็นเวลา 6 เดือนพบว่า PCL ในชิ้นเนื้อเยื่อ 46.38% แสดงว่าอัตราการย่อยสลายของ PCL ไม่สัมพันธ์กับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อ หรือโครงเลี้ยงเซลล์ย่อยสลายช้าเกินไป ซึ่งอาจแก้ไขโดยเพิ่มปริมาณของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนมากขึ้นหรือลดความเข้มข้นของ PCL เพื่อให้ผนังของรูพรุนบางและเพิ่มพื้นที่ผิวในการย่อยสลายของ PCL

### 5.3 งานวิจัยต่อไปในอนาคต

เพื่อให้การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ อาจจะต้องมีการศึกษาเรื่องต่อไปนี้

1. เปลี่ยนสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL แบบพรุน เช่น ผล็กน้ำแข็ง, คาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤติ (Supercritical carbon dioxide) เพื่อศึกษาผลของชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนต่อคุณสมบัติโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนเหล่านี้กำจัดออกได้ง่ายและมีขนาดเล็ก
2. ผสม PCL กับพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อปรับปรุงการย่อยสลายให้เร็วขึ้น
3. เปลี่ยนรูปแบบของโครงเลี้ยงเซลล์จากแบบพรุนเป็นแบบเส้นใย โดยทดลองใช้เส้นใยนาโน หรือเส้นใยขนาดไมครอนที่มีขนาดรูพรุน แต่จะต้องมีความแข็งแรงพอในการปลูกถ่ายในร่างกาย
4. ศึกษาการขยายจำนวนเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL-Alginate ใน bioreactor ที่มีการปั่นกววนหรือไหลเวียนของอาหารหรือมีการป้อนอากาศ เพื่อศึกษาผลกระทบของการปั่นกววนหรือระบบการป้อนอากาศต่อเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งอาจลดเวลาในการสร้างเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ลงได้
5. ศึกษาการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากการเลี้ยงในสัตรี์ทดลองที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์ ก่อนที่จะนำไปใช้งานจริงในมนุษย์

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

กรมศุลกากร. **สถิติการนำเข้าการนำเข้าสินค้าประเภทยา เวชภัณฑ์และสารเคมีที่ใช้ในการแพทย์ ประจำปี พ.ศ.2545.** [online]. แหล่งที่มา: <http://www.customs.go.th>, [2546, เมษายน 8]

ชิตชนก มิตรอุปถัมภ์, สุจินดา จิตต์ใจฉ่ำ, พิชญ์ สุภผล และ มานิตย์ นิธินากุล, หลักการและประโยชน์ บันไดสายใยด้วยไฟฟ้าสถิต. **เทคโนโลยีอุตสาหกรรม** 172 (2547): 147-155.

ประคน จาติกวณิช. **คู่มือการเลี้ยงสัตว์ทดลอง.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536.

ปานเทพ รัตนากร. **คู่มือการใช้สัตว์ทดลอง.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2535.

ฤทัย สกุลแรมรุ่ง (บรรณาธิการ): **วิทยานุกุมคุ้มกัน.** พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2537.

วินิตา บัณฑิต, อรศรี รมยะนันท์ และ สุจินต์ อึ้งถาวร (บรรณาธิการ): **วิทยาสิตโต1: เซลล์และเนื้อเยื่อพื้นฐาน.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2535.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาษาอังกฤษ

- ASTM. 1996 Annual book of ASTM standards. West Conshohocken: ASTM, 1996.
- Atala, A. and Lanza, R.P. **Methods of tissue engineering**. 1<sup>st</sup> ed. New York: Academic Press, 2002.
- Biotol Project. ***In vitro* cultivation of animal cells**. 1<sup>st</sup> ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1995.
- Burtis, C.A., and Ashwood, E.R. (eds.). **Clinical chemistry**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunder Company, 1994.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. and Mitchell, L.G. **Biology**. 5<sup>th</sup> ed. Menlo Park: Addison Wesley Longman, 1999.
- Jones, G.E. (ed.). **Human cell culture protocols**. 1<sup>st</sup> ed. Totowa: Humana Press, 1996.
- Katzung, B.G. (ed.). **Basic and clinical pharmacology**. 7<sup>th</sup> ed. New York: McGraw Hill, 1998.
- Lanza, R.P., Langer, R., and Vacanti J. (eds.). **Principles of tissue engineering**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic Press, 2000.
- Mohan, C. **Buffers, a guide for the preparation and use of buffers in biological systems**. 1<sup>st</sup> ed. Darmstadt: Calbiochem-Novabiochem Corporation, 1999.
- Morgan, J.R. and Yarmush, M.L. (eds.). **Tissue engineering methods and protocols**. 1<sup>st</sup> ed. Totowa: Humana Press, 1999.
- Nettles, D.L. **Evaluation of chitosan as a cell scaffold for cartilage tissue engineering**. Master's Thesis Department of agricultural and biological engineering. Mississippi State University, 2001.
- Pollard, J.W. and Walker, J.M. (eds.). **Basic cell culture protocols**. 2<sup>nd</sup> ed. Totowa: Humana Press, 1997.
- Rosoff, M. (ed.). **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems**. 1<sup>st</sup> ed. New York: VCH Publisher, 1989.
- Sigma-Aldrich. **Products catalogs 2002-2003**. Saint Louis: Sigma-Aldrich, 2002.
- Silver, F. and Doillon, C. **Biocompatibility interactions of biological and implantable materials volume 1: Polymers**. 1<sup>st</sup> ed. New York: VCH Publisher, 1989.

- Sparycar, M. (Ed.). **Stedman's medical dictionary**. 26<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Walkins, 1995.
- The American Heritage Dictionary of the English Language**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Houghton Mifflin Company, 1992.
- Yannas, I.V. **Tissue and organ regeneration in adults**. 1<sup>st</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 2001.
- Young, B. and Heath, J.W. **Wheater's functional histology a text and colour atlas**. 4<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000.
- Anseth, K.S., Metters, A.T., Bryant, S.J., Martens, P.J., Elisseeff, J.H. and Bowman, C.N. *In situ* forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. **Journal of controlled release** 78 (2002): 199-209.
- Archer C.W. and Francis-West P. Cells in focus: The chondrocyte. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 35 (2003): 401-404.
- Awad, H.A., Wickham, M.Q., Leddy, H.A., Gimble, J.M., and Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. **Biomaterials** 25 (2004): 3211-3222.
- Boyan, B.D., Lohmann C.H., Romero J. and Schwartz Z. Bone and cartilage tissue engineering. **Clinical Plastic Surgery** 26 (1999): 629-645.
- Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P. and Quarto R. Mini Review: Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biology** 22 (2003): 81-91.
- Chaplin, M.: **Water structure and behavior: Alginate**. [online] Available from: <http://www.sbu.ac.uk/water/hyalg.html> , [2003, March 3]
- Chu, C.R., Douchis, J.S., Yoshika, M., Sah, R.L., Coutts, R.D., Amiel, D. Osteochondral repair using perichondrial cells. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 340 (1997): 220-229.
- Chu, C.R., Monosov, A.Z., and Amiel, D. *In situ* assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid matrices. **Biomaterials** 16 (1995): 1381-1384.
- Corden, T.J., Jones, I.A., Rudd, C.D., Christian, P., Downes, S. and McDougall, K.E. Physical and biocompatibility properties of poly- $\epsilon$ -caprolactone produced using in situ polymerization: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. **Biomaterials** 21 (2000): 713-724.

- Doshi, J. and Reneker, D.H. Electrospinning process and application of electrospun fibers. **Journal of electrostatics** 35 (1995): 151-160.
- Douchis, J.S., Bae, W.C., Chen, A.C., Sah, R.L., Coutts, R.D., and Amiel, D., Cartilage repair with autogenic perichondrium cell and polylactic acid grafts. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 377 (2000): 248-264.
- Eiselt, P., Yeh, J., Latvata, R.K., Shea, L.D. and Mooney, D.J. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. **Biomaterials** 21 (2000): 1921-1927.
- Elfick, A.P.D. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) as a potential material for a temporary joint spacer. **Biomaterials** 23 (2002): 4463-4467.
- Elisseff, J., Anseth, K., Sims, S., McIntosh, W., Randolph, M., Yaremchuk, M., and Langer R. Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for Tissue Engineered Cartilage. **Plastic and Reconstructive Surgery** 104 (1999): 1014-1022.
- Francis Suh, J.K. and Matthew, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials** 21 (2000): 2589-2598.
- Freed, L.E., Hollander, A.P., Martin, I., Barry, J.R., Langer, R., and Vunjak-Novakovic G. Chondrogenesis in a Cell-Polymer-Bioreactor System. **Experimental Cell Research** 240 (1998): 58-65.
- Freed, L.E., Langer, R., Martin, I., Pellis, N.R., and Vunjak-Novakovic G. Tissue engineering of cartilage in space. **Proceeding of the National Academy of Sciences** 94 (1997): 13885-13890.
- Freed, L.E., Marquis, J.C., Vunjak-Novakovic, G., Emmanuel, J., and Langer, R. Composition of cell-polymer cartilage implants. **Biotechnology and Bioengineering** 43 (1994), 605-614.
- Hanks, C.T., Watana, J.C. and Sun, Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. **Dent Mater** 12 (1996):186-193.
- Gan, Z., Liang, Q., Zhang, J., and Jing, X. Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipase. **Polymer Degradation and Stability** 56 (1997): 209-213.

- Gan, Z., Yu, D., Zhong, Z., Liang, Q., and Jing, X. Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(DL-lactide) blends in phosphate buffer solution. **Polymer** 40 (1999): 2859-2862.
- Grosvenor, M.P., and Staniforth, J.N., The effect of molecular weight on the rheological and tensile properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone). **International Journal of Pharmaceutics** 135 (1996): 103-109.
- Gunatillake, P.A., and Adhikari, R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells and Materials** 5 (2003) 1-16.
- Heath, C.A.: Cells for tissue engineering. **Tibtech** 18 (2000): 17-19.
- Hipco International Massachusetts Institute of Technology **Scaffold Casting**. Available from: <http://web.mit.edu/filip/Public/3.082/processing.htm> [2002, November 20]
- Honda, M., Yada, T., Ueda, M., and Kimata, K., Cartilage Formation by Cultured Chondrocytes in a New Scaffold Made of Poly(L-Lactide- $\epsilon$ -Caprolactone) Sponge. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery** 58 (2000): 767-775.
- Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials** 21 (2000): 2529-2543.
- Hutmacher, D.W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K.W., Teoh, S.H. and Tan, K.C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. **Journal of Biomedical Material Research** 55 (2001): 203-216.
- Hutmacher, D.W., Ng, K.W., Kaps, C., Sittininger, M., and Kläring, S. Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier. **Biomaterials** 24 (2003): 4445-4458.
- Ishuag-Riley, S.L., Okun, L.E., Prado, G., Applegate, M.A., and Ratcliffe A. Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. **Biomaterials** 20 (1999): 2245-2256.
- Iwasaki, Y., Sawada, S., Ishihara, K., Khang, G., and Lee, H.B. Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend. **Biomaterials** 23 (2002): 3897-3903.

- Jeong, S.I., Kim, B.S., Kang, S.W., Kwon, J.H., Lee, Y.M., Kim, S.H., and Kim, Y.H. In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds. **Biomaterials** In press.
- Kweon, H.Y., Yoo, M.K., Park, I.K., Kim T.H., Lee, H.C., Lee, H.S., Oh, J.S., Akaike, T. and Cho, C.S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials** 24 (2003): 801-808.
- Koch, R.J. and Gorti, G.K.: Tissue engineering with chondrocytes. **Facial Plastic Surgery** 18 (2002): 59-68.
- Kuo, C.K. and Ma, P.X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials** 22 (2001): 511-521.
- Langer, R. Tissue engineering. **Molecular Therapy** 1 (2000): 12-15.
- Lee, K.H., Kim, H.Y., Khil, M.S., Ra, Y.M. and Lee, D.R. Characterization of nano-structured poly( $\epsilon$ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. **Polymer** 44 (2003): 1287-1294.
- Li, S., Garreau, H., Pauvert, B., McGrath, J., Toniolo, A., and Vert, M. Enzymatic degradation of block copolymers prepared from  $\epsilon$ -caprolactone and poly(ethylene glycol). **Biomacromolecules** 3 (2002): 525-530.
- Liu, L., Li, S., Garreau, H. and Vert, M. Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) blend films. **Biomacromolecules** 1 (2000): 350-359.
- Lu, L. Zhu, X., Valenzuela, R.G., Currier, B.L. and Yaszemski, M.J. Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. **Clinical Orthopaedics and related research** 391 (2001): S251-S270.
- Madhally, S.V. and Matthew, H.W.T. Porous scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials** 20 (1999): 1133-1142.
- Marques, A.P., Reis, R.L. and Hunt, J.A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. **Biomaterials** 23 (2002): 1471-1478.
- Masuda, K., Sah, R.L., Hejna, M.J. and Thonar E. J.-M.A. A novel two-step method for the formation of tissue engineered cartilage by mature bovine chondrocytes:

the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. **Journal of Orthopaedic research** 21 (2003): 139-148.

Massachusetts Institute of Technology **Cell and Tissue Engineering Course lecture**

**Autumn 2002** [Online], Available from:

<http://web.mit.edu/beh.360/www/lectures.shtml>, [2002, November 11]

Pêgo, A.P., Poot, A.A., Grijpma, D.W., and Feijen, J. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. **Journal of Controlled Release** 87 (2003): 69-79.

Peter, S.J., Lu, L., Kim, D.J., and Mikos, A.G. Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite. **Biomaterials** 21 (2000): 1207-1213.

Reinholz, G.C., Lu, L., Saris, D.B.F., Yazenski, M.J., and O'Driscoll, S.W. Animal models for cartilage reconstruction. **Biomaterials** 25 (2004): 1151-1521.

Risbud, M.V. and Sittlinger M., Tissue engineering: advances in *in vitro* cartilage generation. **Trends in Biotechnology** 20 (2002): 351-356.

Rosiak, J.M. and Yoshii, F. Hydrogels and their medical applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**. 151 (1999): 56-64.

Rutledge, G.C., Li, Y., Fridrikh, S., Warner, S.B., Kalayci, V.E., and Patra, P. Electrostatic spinning and properties of ultrafine fibers. **National Textile Venter Annual Report**. Project M01-D22 (2001): 1-10.

Saldago, A.J., Gomes M.E., Chou, A., Coutinho, O.P., Reis, R.L. and Hutmacher, D.W. Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds. **Materials Science and Engineering C**. 20 (2002): 27 – 33.

Schreiber, R.E., Dunkelman, N.S., Naughton, G., and Ratcliffe, A. A method for tissue engineering of cartilage by cell seeding on bioresorbable scaffolds. **Annals New York Academy of Sciences** 875 (1999): 398-404.

Schulze, M., Kuettner, K.E. and Cole, A.A.; Adulte Humane Chondrozyten in Alginatkultur: Beibehaltung des phänotyps für die weitere Anwendung in Transplantationsmodellen. **Orthopäde** 29 (2000): 100-106.

- Shapiro, L. and Cohen, S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. **Biomaterials** 18 (1997): 583-590.
- Siepmann, J. and Göpferich A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews** 48 (2001): 229-247.
- Sims, C.D., Butler, P.E.M., Casanova, R., Lee, B.T., Randolph, M.A., Lee, W.P.A., Vacanti, C.A., and Yaremchuk, M.J. Injectable cartilage using polyethylene oxide polymer substrate, **Plastic and Reconstructive Surgery** 98 (1996): 843-850.
- Sung, H.J., Meredith, C., Johnson, C., and Gallis, Z.S., The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis, **Biomaterials** 25 (2004): 5735-5742.
- Tachaboonyakiat, W., Furubayashi, T., Katoh, M., Ooya, T., and Yui, N., Chemical modification of hydrolyzable polyrotaxane scaffold for an approach to cartilage regeneration. Pacific Polymer Conference 8, pp. 61, Bangkok, 2003.
- Töyräs, J., Nieminen, H.J., Laasanen, M.S., Nieminen, M.T., Korhonen, R.K., Rieppo, J., Hirvonen, J., Helminen, H.J., and Jurvelin, J.S. Ultrasonic characterization of articular cartilage. **Biorheology** 39 (2002): 161-169.
- USC School of Dentistry. **Cartilage** [Online] Available from: <http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/index.html>, [2003, December 20]
- USC School of Dentistry. **Elastic Cartilage** [Online] Available from: [http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c\\_18.html](http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c_18.html), [2003, December 20]
- USC School of Dentistry. **Hyaline Cartilage** [Online] Available from: [http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c\\_5.html](http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c_5.html), [2003, December 20]
- USC School of Dentistry. **Fibrocartilage** [Online] Available from: [http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c\\_21.html](http://www.usc.edu/hsc/dental/ghisto/cart/c_21.html), [2003, December 20]
- Van Tienen, T.G., Heijkants, R.G.J.C., Buma, P., De Groot, J.H., Pennings, A.J., and Veth, R.P.H., Tissue growth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes. **Biomaterials** 23 (2002): 1731-1738.

- Vandamme, T.F. and Legras, R. Physico-mechanical properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone) for the construction of rumino-recticulum devices for grazing animals. **Biomaterials** 16 (1995): 1395-1400.
- Vogelhuber, W., Rotunno, P., Magni, E., Gazzaniga, A., Spruss, T., Bernhardt, G., Buschauer, A. and Gopferich, A., Programmable biodegradable implants. **Journal of Controlled Release** 73 (2001): 75-88.
- Vunjak-Novakovic, G., Freed, L.E., Biron R.J., and Langer R. Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. **AIChE Journal**. 42 (1996): 850-860.
- Watanabe, J., Ooya, T., Nitta, K.H., Park, K.D., Kim, Y.H., and Yui N., Fibroblast adhesion and proliferation on poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked by hydrolysable polyrotaxane. **Biomaterials** 23 (2002) 4041-4048.
- Weng, Y., Cao Y., Silva, C.A., Vacanti, M.P., and Vacanti, C.A. Tissue-engineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery** 59 (2001): 185-190.
- Wilson, C.G., Bonassar L.J. and Kohles, S.S. Modeling the dynamic composition of engineered cartilage. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 408 (2002): 246-254.
- Worthington Biochemical. **Effects of pH** [Online] Available from: <http://www.worthington-biochem.com/introBiochem/ffectspH.html>, [2004, June 3]
- Worthington Biochemical. **Worthington Lysozyme** [Online] Available from: <http://www.worthington-biochem.com/LY/default.html>, [2004, June 3]
- Wu, C., and Gan, Z., A novel method of studying polymer biodegradation. **Polymer** 39 (1998): 4429-4431.
- Yang, L., Hsiao, W.W. and Chen, P. Chitosan-cellulose composite membrane for affinity purification of biopolymers and immunoadsorption. **Journal of Membrane Science** 197 (2002)197:185-197.





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก.

### รายชื่อ, หมายเลขผลิตและแหล่งผลิตของสารเคมีที่ใช้

สารเคมีที่นำมาใช้ในการทดลองนั้น ได้มาจากแหล่งต่างๆ และมีหมายเลขสารเคมี (Catalog Number) ดังแสดงในตารางที่ ก.1

ตารางที่ ก.1 รายชื่อ, หมายเลขผลิตและแหล่งผลิตของสารเคมีที่ใช้

| สารเคมี  | ผู้ผลิต                              | Cat. No.  |
|--|--------------------------------------|-----------|
| Acetic Acid (Glacial)  | APS Finechem, Seven Hills, Australia | 1-2.5L GL |
| Antibiotic (L-Glutamine /Penicillin/Streptomycin) <sup>1</sup> | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA        | G1146     |
| Antifungal (Fungizone)   | -                                    | -         |
| Calcium Chloride   | APS Finechem, Seven Hills, Australia | 127-500G  |
| Calf Skin Collagen <sup>2</sup>                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA        | C8919     |
| Cloxa M.H.   | M&H Manufacturing, Thailand          | -         |
| Collagenase Type II <sup>3</sup>                               | Invitrogen Corp., Auckland, NZ       | 17101-015 |
| 70% Ethanol  | ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์    | -         |
| Ethylenediaminetetraacetic acid, trisodium salt                | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA        |           |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                                       | Invitrogen Corp., Paisley, UK        | 10086-148 |
| Fibroblast Growth Factor (FGF)                                 | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA        | F0291     |
| Gentamycin   | M&H Manufacturing, Thailand          | -         |
| HAM – F12 (Nutrient Mixer) <sup>4</sup>                        | Invitrogen Corp., Auckland, NZ       | 1153601   |
| Lipase <sup>5</sup>  | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA        | L9518     |
| Magnesium Chloride Hexahydrate                                 | Carlo Erba, Italy                    | 459337    |
| Normal Saline Solution   | General Hospital Products, Thailand  | -         |
| Paraformaldehyde   | Sigma Chem, St. Louis, USA           | P6148     |

|  |   |             |
|--|---|-------------|
| Phosphate Buffer Saline (PBS) <sup>6</sup> | Invitrogen Corp., Paisley, UK                   | 10010-031   |
| Polycaprolactone (MW = 65,000)             | Aldrich Chemical Corp., Milwaukee, WI, USA      | 18,160-9    |
| Sodium Alginate <sup>7</sup>               | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                   | A2033       |
| Sodium Azide                               | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                   | S8032       |
| Sodium Chloride                            | APS Finechem, Seven Hills, Australia            | 465-1KG     |
| Sodium Hydroxide (Flake)                   | Merck, Darmstadt, Germany                       | B966798-149 |
| Sodium Phosphate monobasic                 | Antibioticos, Spain                             | 480087      |
| Sodium Phosphate dibasic                   | Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany         | 30413       |
| Sulperazon                                 | Pfizer, Italy                                   | -           |
| Trypan Blue 0.4%                           | Gibco RBL, USA                                  | 15250-061   |
| Trypsin – EDTA <sup>8</sup>                | Invitrogen Corp., Canada                        | 25300-054   |
| ผงชูรส (Monosodium Glutamante)             | Ajinomoto (Thailand) Co. Ltd., Bangkok Thailand | -           |

#### หมายเหตุ

<sup>1</sup>L-Glutamine/Penicillin/Streptomycin Solution with 200 mM L-Glutamine, 10,000 U Penicillin and 10 mg Streptomycin/ml in 0.9% Sodium Chloride

<sup>2</sup>Collagen Solution Type I, 0.1% solution in 0.1 N Acetic Acid

<sup>3</sup>264 Units/mg

<sup>4</sup>With L-Glutamine

<sup>5</sup>500 units. From *pseudomonas*, lyophilized powder โดย 1 Unit สามารถผลิตกลีเซอรอล 1  $\mu$ mol จาก triglyceride ต่อหน้าที่ ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37°C

<sup>6</sup>Dulbecco's

<sup>7</sup>From *Macrocystis Pyrifera* (Kelp) Medium Viscosity

<sup>8</sup>0.5 g Trypsin and 0.2 g EDTA – 4 Na/L in HBSS without Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>

**ภาคผนวก ข.**  
**การเตรียมสารเคมี**

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารเคมี

|   | สารเคมี/อุปกรณ์  | วิธีการ  |
|---|--|--|
| Collagenase<br>Type II<br>Enzyme<br>Solution 0.3% | <u>สารเคมี</u><br>1. Collagenase Type II<br>2. Calcium Chloride<br>3. HAM – F12 Media<br><u>อุปกรณ์</u><br>1. Sterile Syringe<br>2. Sterile Brown Bottle 500 ml<br>3. Filter 0.22 $\mu\text{m}$  | 1. ผสม Collagenase Type II 1 กรัม ใน HAM – F12 Media 333 ml และ Calcium Chloride<br>2. กรองสารที่ทำการผสมผ่าน Filter ขนาด 0.22 $\mu\text{m}$<br>3. เก็บใส่ขวดสีชาที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ $-20^{\circ}\text{C}$  |
| Media for<br>Chondrocyte                          | <u>สารเคมี</u><br>1. Fetal Bovine Serum (FBS)<br>2. HAM – F12 Media<br>3. Antifungal Agent (Fungizone)<br>4. Fibroblast Growth Factor ที่ความเข้มข้น 5 ng/ml<br>5. Antibiotic (L-Glutamine/Penicillin /Streptomycin)<br><u>อุปกรณ์</u><br>1. Sterile Bottle 100 ml 6 ขวด<br>2. Filter Unit 0.22 $\mu\text{m}$<br>3. Serological Pipet 10 ml, 25 ml | 1. ผสม HAM – F12 Media 500 ml และ FBS 50 ml จากนั้น นำ Fungizone 0.625 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 5 ml ผสมกับสารที่ได้ แล้วผสมกับ Antibiotic จำนวน 5 ml และ Fibroblast Growth Factor ที่ความเข้มข้น 5 ng/ml จำนวน 0.1 ml<br>2. ทำการกรอง Media ที่ได้จากข้อ 1. ผ่าน Filter Unit ที่ 0.22 $\mu\text{m}$<br>3. เก็บใส่ขวดที่ $4^{\circ}\text{C}$ |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><i>Collagen</i><br/><i>Coated Plate</i></p>                         | <p><u>สารเคมี</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Glacial Acetic Acid</li> <li>2. Sterile Water</li> <li>3. 0.1% Calf Skin Collagen</li> </ol> <p><u>อุปกรณ์</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sterile Bottle 250 ml</li> <li>2. Filter Unit, Syringe Filter 0.22 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>3. Cell Culture Dish 100 x 20 mm</li> </ol> | <p><u>Collagen Solution</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เตรียมสารละลาย 0.1 N Acetic Acid โดยผสม Glacial Acetic Acid 1 ml ในน้ำ 179 ml</li> <li>2. กรองที่ 0.22 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>3. นำสารละลาย Acetic Acid ที่เตรียมไว้ ผสมกับ 0.1% Calf Skin Collagen 20 ml</li> <li>4. Incubate ที่ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง</li> <li>5. เก็บที่ 4 °C</li> </ol> <p><u>Coated Plate</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. นำสารละลาย Collagen ที่ได้เตรียมไว้ เทลงบน จานเลี้ยงเซลล์ จานละ 5 ml</li> <li>2. เก็บไว้ในที่ Laminar Hood เป็นเวลา 12 ชั่วโมง</li> <li>3. ดูดสารละลาย Collagen ออก เพื่อเก็บไว้ใช้ได้ อีก โดยสารละลาย Collagen เก็บที่ 4 °C</li> <li>4. เก็บจานเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C</li> </ol> |
| <p><i>Phosphate</i><br/><i>Buffer Saline</i><br/><i>ที่ pH 7.4</i></p> | <p><u>สารเคมี</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sodium phosphate monobasic</li> <li>2. Sodium phosphate dibasic</li> <li>3. น้ำปราศจากไอออน</li> </ol> <p><u>อุปกรณ์</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ขวดเก็บสารขนาด 250 ml</li> <li>2. กระบอกตวง</li> <li>3. ปีกเกอร์ขนาด 500 ml</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ละลาย Sodium phosphate monobasic จำนวน 0.264 g ในน้ำปราศจากไอออน 100 ml</li> <li>2. ละลาย Sodium phosphate dibasic จำนวน 2.17 g ในน้ำปราศจากไอออน 100 ml</li> <li>3. ผสมสารละลาย Sodium phosphate monobasic ที่ได้จากข้อ 1 กับ สารละลาย Sodium phosphate dibasic ที่ได้จากข้อ 2 และคนให้เข้ากัน</li> </ol>   |

|   |  |   |
|---|--|---|
|   |  | <ol style="list-style-type: none"> <li>4. เก็บสารที่ได้ในขวดเก็บสาร</li> <li>5. ซ้ำเชื้อโดยใช้ Autoclave</li> <li>6. เก็บที่อุณหภูมิห้อง</li> </ol>   |
| <p>สารละลาย<br/>เอนไซม์ไลเปส<br/>ใน PBS</p> | <p>สารเคมี</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เอนไซม์ไลเปส</li> <li>2. Potassium phosphate monobasic</li> <li>3. Magnesium chloride hexahydrate</li> <li>4. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), trisodium salt</li> <li>5. Potassium Hydroxide</li> <li>6. น้ำปราศจากไอออน</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ละลาย Potassium Phosphate Monobasic หนัก 0.12 g, <math>MgCl_2 \cdot 6H_2O</math> หนัก 0.0024 g และ EDTA หนัก 0.007 g ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 16.67 ml</li> <li>2. ปรับค่า pH ของสารละลายจากข้อ 1. โดยใช้สารละลาย Potassium Hydroxide ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (5.61%) จนกระทั่งได้ค่า pH ที่ 7.5</li> <li>3. ละลายเอนไซม์ไลเปสจำนวน 500 Unit สารละลายที่ได้จากข้อ 2 ซึ่งจะได้สารละลายเอนไซม์ไลเปสที่มีความเข้มข้น 30 Unit/ml</li> <li>4. เมื่อนำไปทดสอบการย่อยสลาย นำสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากข้อ 3 ปริมาตร 1 ml ผสมในสารละลาย PBS ที่ pH 7.4 ปริมาตร 999 ml</li> </ol> |

ภาคผนวก ค.  
การทำพิมพ์รูปใบหูด้วยซิลิโคน

สารและอุปกรณ์

1. ยางซิลิโคนใช้หล่อแบบ
2. ดินน้ำมัน
3. พายสำหรับปาดน้ำยาง
4. แม่แบบ

วิธีทำ

1. นำดินน้ำมันที่ใช้เป็นฐานมาปาดให้เรียบและชะะบางส่วนออก
2. กดแม่แบบที่เป็นรูปหูลงในดินน้ำมัน โดยกดที่บริเวณที่ชะะดินน้ำมันออก (รูปที่ ค1)
3. คลึงดินน้ำมันเป็นเส้นยาว และล้อมกรอบเพื่อเป็นที่กั้นน้ำยาง
4. เทยางซิลิโคนลงไป ให้บางๆ พอครอบคลุมพื้นที่ โดยค่อยๆ เทลงไปและระวังฟองอากาศที่อาจเกิดขึ้น (รูปที่ 2)
5. รอยางซิลิโคนแห้งเป็นเวลา 3 – 5 ชั่วโมง
6. เทยางซ้ำอีกครั้งเพื่อปิดรอยร้าวและเพิ่มความแข็งแรงให้พิมพ์ (รูปที่ 3)
7. รอยางซิลิโคนแห้ง



รูปที่ ค1 แม่แบบก่อนทำการหล่อด้วย ซิลิโคน



รูปที่ ค2 แม่แบบที่เทยางซิลิโคนลงไปเรียบร้อยแล้ว



รูปที่ ค3 แม่แบบที่เทยางซิลิโคนทับลงไปอีกชั้น

## ภาคผนวก ง. วิธีการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยคือ Nude Mouse (BALB/c-nu) ซึ่งเป็นหนูพันธุ์พิเศษที่ไม่มี T-lymphocyte ซึ่งทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำงานได้อย่างเต็มที่ ดังนั้นการเลี้ยงหนูชนิดนี้ จึงต้องมีวิธีที่แตกต่างจากการเลี้ยงหนูอื่นๆ ซึ่งมีวิธีการเลี้ยงดังนี้

1. สภาพะที่ทำการเลี้ยงที่ 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 60 – 70%
2. ก่อนทำการเปลี่ยนอุปกรณ์ใดๆ ควรใส่ถุงมือที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยพ่น Alcohol 70% ที่ถุงมือ
3. การเปิด Filter Cap ควรเปิดใน Laminar Flow Hood ที่มีอากาศไหลตลอดเวลา
4. เปลี่ยนน้ำทุกๆ 2 วัน โดยน้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Sterile Water)
5. เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน โดยทิ้งอาหารที่กินเหลือ และใส่อาหารใหม่เข้าไป
6. ขวดน้ำ (รวมทั้งจุกและหลอดน้ำ) เมื่อใช้แล้วล้างให้สะอาดและเข้า Autoclave
7. การเปลี่ยนกรงและซีล้อย เปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง โดย
  - a. กรงเมื่อเปลี่ยนแล้ว ให้ล้างให้สะอาดและผึ่งให้แห้ง ก่อนการใช้ครั้งต่อไปให้ฆ่าเชื้อโดยเช็ด Alcohol 70%
  - b. ซีล้อย เมื่อใช้แล้วให้ทิ้ง และซีล้อยที่นำมาเปลี่ยนใหม่ให้เข้า Autoclave ก่อนทำการเปลี่ยน
8. เปลี่ยนแผ่นกรองอากาศ (Filter Sheet) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

### หมายเหตุ

- กรงที่ใช้เป็นกรงพลาสติกโพลิสตีร์กผลิตจาก Polystyrene มีตะแกรงสำหรับใส่ขวดน้ำและอาหาร และมีที่กรองอากาศติดตั้งอยู่ด้านบน
- ขวดน้ำเป็นขวดแก้ว, จุกเป็นจุกยาง และหลอดน้ำเป็นหลอดสแตนเลส
- แผ่นกรองอากาศมีขนาดที่ 0.22 ไมครอน
- สัตว์ทดลอง, อาหาร และอุปกรณ์ที่ใช้ทั้งหมดทำการสั่งซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลอง แห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล





(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

รูปที่ ง1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

- (ก) กรง
- (ข) ขวดน้ำและจุกยาง
- (ค) ขี้เลื่อยรองนอน
- (ง) Filter cap
- (จ) อาหาร

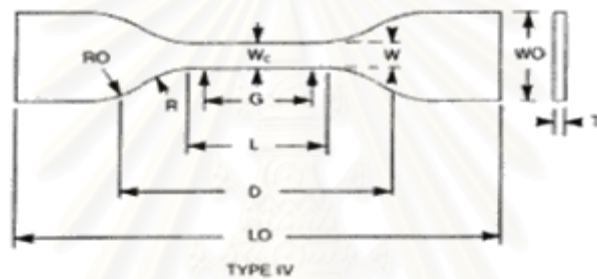
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก จ. การวัดค่าความเค้นแรงดึง

การวัดค่าความเค้นแรงดึงยึดหลักการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D638 ซึ่งมีหลักการในการทดสอบดังนี้

### การเตรียมตัวอย่าง

ชิ้นงานตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยมีลักษณะเป็น Non-rigid body (เป็นชิ้นงานแบบที่ 4 ตามมาตรฐาน ASTM D638) ซึ่งมีการขึ้นรูปของชิ้นงานดังรูปที่ จ.1 ซึ่งขึ้นรูปโดยการหล่อชิ้นงานในแบบ



รูป จ.1 แบบของชิ้นงานที่ใช้ในการวัดค่า Tensile Stress

ซึ่งมีขนาดจากในรูป จ.1 ดังนี้

$W_c$  – ความกว้างที่กึ่งกลางของชิ้นงาน = 6 มิลลิเมตร

$W$  – ความกว้างของส่วนที่แคบ = 6 มิลลิเมตร

$W_O$  – ความกว้างทั้งหมดของชิ้นงาน = 19 มิลลิเมตร

$G$  – ความยาวเกจ = 25 มิลลิเมตร

$L$  – ความยาวของส่วนที่แคบ = 33 มิลลิเมตร

$LO$  – ความยาวทั้งหมดของชิ้นงาน = 115 มิลลิเมตร

$R$  – รัศมีของส่วนโค้ง = 14 มิลลิเมตร

$RO$  – รัศมีด้านนอก = 25 มิลลิเมตร

$D$  – ระยะห่างระหว่างจุดยึด = 65 มิลลิเมตร

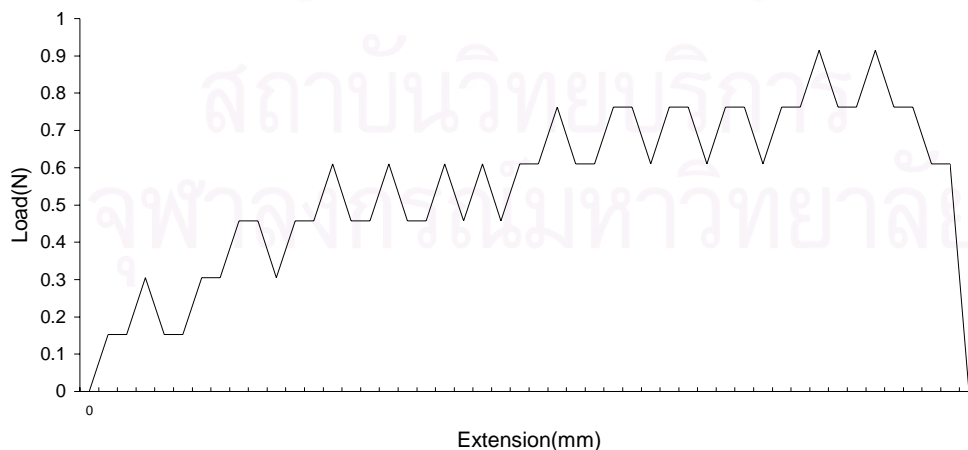
$T$  – ความหนาของชิ้นงาน = 3 มิลลิเมตร

## การทดสอบ

1. นำชิ้นงานใส่ในเครื่อง Universal Testing Machine (รูปที่ จ.2) โดยยึดชิ้นงานที่จุดยึด
2. ตั้งค่าความหนาและความกว้างของชิ้นงานในคอมพิวเตอร์ที่ติดตั้งพร้อมกับเครื่อง Universal Testing Machine โดยกำหนดความเร็วในการทดสอบที่ 50 มิลลิเมตรต่อวินาที
3. เริ่มทำการทดสอบชิ้นงาน
4. เมื่อชิ้นงานขาด (ทดสอบเสร็จสิ้น) เครื่องคอมพิวเตอร์จะรายงานค่า แรงที่ใช้ (Load) พื้นที่หน้าตัดของชิ้นงาน และค่าความเค้นแรงดึงรวมทั้งค่าอื่นๆ ที่ทำการกำหนดไปเมื่อทำการตั้งค่าต่างๆ ของการทดสอบ



รูป จ.2 เครื่อง Universal Testing Machine



รูป จ.3 กราฟที่ได้จากเครื่อง Universal Testing Machine ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์แรงดึงและระยะที่ตัวอย่างถูกดึงออก

## ภาคผนวก จ.

### การวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อน

การวัดค่าคุณสมบัติความร้อนของโครงเลี้ยงเซลล์ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ การทดสอบด้วย เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ในการวิเคราะห์หาปริมาณความร้อนที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึก เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของโครงสร้างที่เป็นผลึก และเครื่อง Thermogravimetric Analysis (TGA) ในการหาปริมาณของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ย่อยสลายไปภายในร่างกาย โดยแต่ละเครื่องมีหลักการทำงานและการวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

#### เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC)

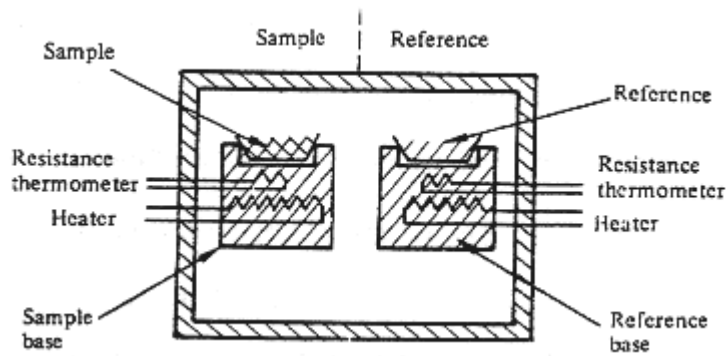
##### หลักการทำงาน

DSC เป็นเทคนิคที่อาศัยการเปลี่ยนแปลงความร้อนหรือค่าความร้อนจำเพาะ (Specific Heat) ต่ออุณหภูมิ ซึ่งมีหลักการทำงานโดย ตัวอย่างและตัวอ้างอิง (Reference) จะอยู่ที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ปริมาณความร้อนที่ให้ต่างกัน เนื่องจากปริมาณพลังงานที่ให้แกตัวอย่างหรือปริมาณพลังงานที่ตัวอย่างคายออกมา เพื่อที่จะรักษาระดับความแตกต่างของอุณหภูมিরะหว่างตัวอย่างและตัวอ้างอิงให้มีค่าความแตกต่างของอุณหภูมิมีค่าเป็น 0 ซึ่งค่าพลังงานนี้จะแสดงในรูปของกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความร้อนกับอุณหภูมิหรือเวลา

##### การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ควรจะแห้ง บาง และมีขนาดเล็ก โดยน้ำหนักของตัวอย่างไม่ควรเกิน 5 มิลลิกรัม เพื่อลดผลกระทบจากความแตกต่างของอุณหภูมิจากนั้นนำวางบนภาชนะที่ใส่ตัวอย่างและปิดฝาให้สนิทเพื่อป้องกันรั่วไหลของความร้อนที่ใช้ไปสู่ด้านนอก

ตัวอย่างและตัวอ้างอิงจะอยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์โดยตัวอย่างและตัวอ้างอิง จะเก็บใน Pan ที่ทำจากโลหะ ซึ่งตั้งอยู่บนเทอร์โมมิเตอร์ ด้านละตัว ซึ่งมีตัวให้ความร้อนอยู่ด้านล่าง (ดังรูปที่ จ.1)



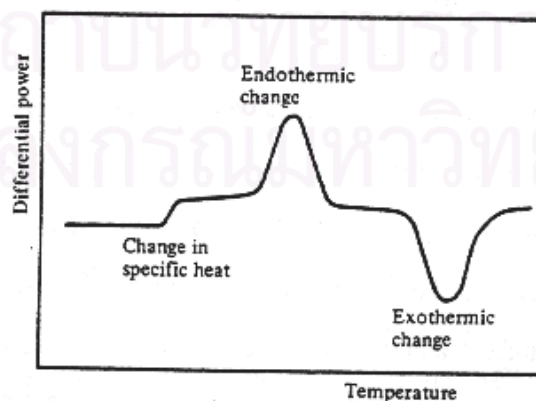
รูปที่ ๑.1 ลักษณะการทำงานของเครื่อง DSC

ที่มา <http://www.friedli.com/research/PhD/DSC/chap3.html>

### ผลที่ได้จากการวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง DSC ค่าความร้อนที่ใช้จะอยู่ในรูปที่เป็นฟังก์ชันกับเวลาหรืออุณหภูมิ เมื่อทำการวิเคราะห์โดยปราศจากตัวอย่าง เส้นกราฟที่ได้จะเรียกว่า เส้นฐาน (Baseline) เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ค่าความร้อนที่ใช้ไปที่เวลาหรืออุณหภูมิต่างๆ มีการเบี่ยงเบนออกจากเส้นฐาน ในบางช่วงตามค่าความร้อนที่ใช้ไป เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์เส้นกราฟจะกลับเข้าสู่เส้นฐาน

ค่าสัญญาณที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงพลังงานในระบบ ซึ่งค่าการเปลี่ยนแปลงจะแสดงในรูปของกราฟระหว่างปริมาณความร้อนและอุณหภูมิหรือเวลาดังที่กล่าวไว้แล้ว ซึ่งการเปลี่ยนแปลงใดๆที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของพลังงานทำให้เกิดความไม่ต่อเนื่องของสัญญาณ ทำให้เกิดรูปกราฟที่มีลักษณะเป็น Peak เกิดขึ้น ซึ่ง Peak ที่ได้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของพลังงาน ซึ่งพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงการเปลี่ยนแปลง Enthalpy ที่เกิดขึ้นในสภาวะนั้นๆ (ดังรูปที่ ๑.2)



รูปที่ ๑.2 รูปกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC

ที่มา <http://www.friedli.com/research/PhD/DSC/chap3.html>

การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถนำไปใช้หาอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass Transition Temperature -  $T_g$ ), อุณหภูมิหลอมตัวผลึก (Melting Temperature -  $T_m$ ) และค่าความร้อนที่ใช้ในการหลอมเหลวของโครงสร้างผลึกของพอลิเมอร์ได้ (Heat of Fusion -  $\Delta H_f$ )

### เครื่อง Thermogravimetric Analysis (TGA)

#### หลักการทำงาน

วัดค่าน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสาร เช่น น้ำหนักที่หายไปของสารต่อเวลาหรืออุณหภูมิ ซึ่งเกิดจากการสลายตัวหรือการเอาน้ำออก ซึ่งกราฟที่ได้ประกอบด้วย ค่าน้ำหนักที่หายไปในฟังก์ชันของอุณหภูมิ และอัตราการหายไปของน้ำหนักต่ออุณหภูมิ โดยกราฟที่ได้นั้น แสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะของสารหรือระบบหนึ่งๆ เนื่องจากลำดับของปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นในช่วงของอุณหภูมิที่แน่นอน การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักนี้เป็นผลมาจากการสลายตัว หรือการรวมตัวของสาร ที่อุณหภูมิต่างๆ เช่น การระเหยตัวของสาร หรือการเกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักมาก

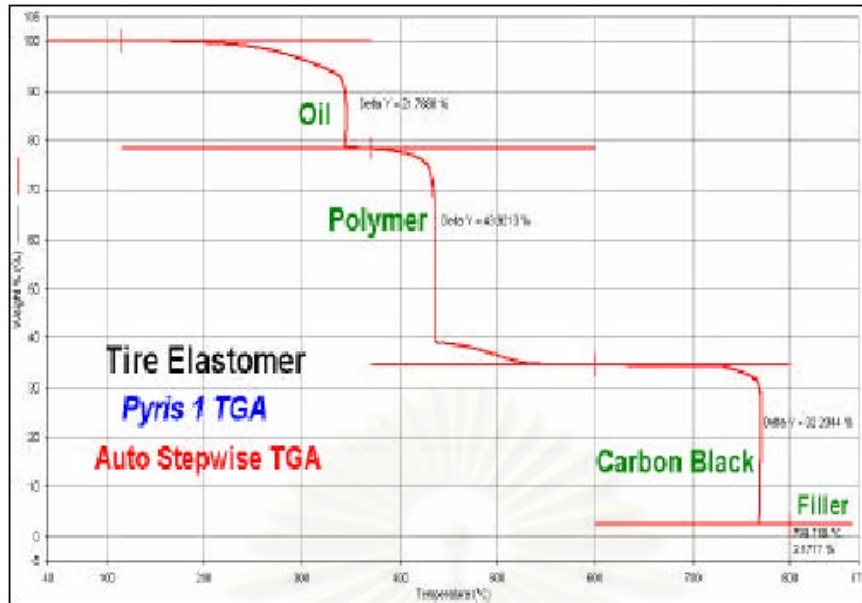
#### การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ควรมีขนาดเล็ก โดยน้ำหนักของตัวอย่างไม่ควรเกิน 10 มิลลิกรัม เพื่อลดผลกระทบจากความแตกต่างของอุณหภูมิ จากนั้นนำวางบนภาชนะที่ใส่ตัวอย่าง

#### ผลที่ได้จากการวิเคราะห์

กราฟที่ได้นั้น ดังที่กล่าวไว้แล้วประกอบด้วย ฟังก์ชันระหว่างอัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและอุณหภูมิ และฟังก์ชันระหว่างน้ำหนักที่หายไปต่ออุณหภูมิ ซึ่งกราฟฟังก์ชันของอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก จะแสดงถึงช่วงอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก กล่าวคือในช่วงอุณหภูมินั้นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เช่น มีการสลายตัวของสาร มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น หรือน้ำที่อยู่ในโครงสร้างมีการระเหยออก เป็นต้น ซึ่งรูปแบบของกราฟนี้จะแสดงในรูปปริมาณของน้ำหนักที่หายไปของส่วนประกอบแต่ละส่วนที่อุณหภูมิต่างๆ ดังรูปที่ ๑3

ในรูป ๑3 แสดงถึงส่วนประกอบต่างๆ ในยางอีลาสโตเมอร์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นน้ำมัน, พอลิเมอร์, คาร์บอน และสารเติมอื่นๆ ซึ่งเห็นได้ว่าฟังก์ชันของน้ำหนักที่หายไปนั้นลดลงในลักษณะขั้นบันได ที่แสดงให้เห็นถึงช่วงอุณหภูมิที่สารแต่ละประเภทสลายตัว จึงสามารถทำให้ทราบได้ว่ามีปริมาณของสารที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างเป็นจำนวนเท่าใด ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการหาปริมาณของ PCL ในตัวอย่างที่มีสารอื่นปะปนอยู่ได้



รูป ๓3 แสดงค่าร้อยละของน้ำหนักที่หายไปทีแสดงถึงส่วนประกอบของตัวอย่าง ที่อุณหภูมิในการสลายตัวต่างๆ

ที่มา Sichina W.J., 2004

## ภาคผนวก ช. ตัวอย่างการคำนวณ

### ช.1 การคำนวณร้อยละของน้ำหนักที่หายไป

จากการทดลองที่โครงเลี้ยงเซลล์แบบพอร์ที่มีเกลือและผงชูรสเป็นสารทำให้เกิดรูพรุนที่ขึ้นรูปโดยใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ Poly-ε-Caprolactone 30% (w/v) มีน้ำหนักก่อนการทดลองที่ 0.0487 กรัม และมีน้ำหนักหลังการทดลองที่ 0.0471 กรัม ที่เวลา 7 สัปดาห์

$$\text{มีค่าร้อยละของน้ำหนักที่หายไปคือ } \% \text{ weight loss} = \frac{0.0487 - 0.0471}{0.0487} \times 100\% = 3.285\%$$

### ช.2 การคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักที่หายไปของ Poly-ε-Caprolactone ในชั้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ได้

ปริมาณของ Poly-ε-Caprolactone ในชั้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ได้

$$\text{ความหนาแน่นของชั้นกระดูกอ่อน } (\rho_c) = 1.05 \text{ g/cm}^3 \text{ (Töyräs J. et al., 2002)}$$

$$\text{น้ำหนักของชั้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน } (W_c) = 2.31 \text{ mg}$$

$$\text{ดังนั้นชั้นเนื้อเยื่อนี้มีปริมาตร } (V_c) = \frac{2.31 \times 10^{-3} \text{ g}}{1.05 \text{ g/cm}^3} = 2.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$$

จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TGA พบว่ามี Poly-ε-Caprolactone อยู่ 46.38%

คิดเป็น  $2.31 \times 0.4638 = 1.071$  มิลลิกรัม

ปริมาณของ Poly-ε-Caprolactone ในโครงเลี้ยงเซลล์

$$\text{ความหนาแน่นของ Poly-ε-Caprolactone} = 1.145 \text{ g/cm}^3$$

$$\text{น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์} = 1.665 \text{ mg}$$

$$\text{ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาตร} = \frac{1.665 \times 10^{-3} \text{ g}}{1.145 \text{ g/cm}^3} = 1.45 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$$

ถ้าโครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาตร  $2.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$  มีปริมาณของ Poly-ε-Caprolactone ที่

$$\frac{1.665 \times 2.2 \times 10^{-3}}{1.45 \times 10^{-3}} = 2.526 \text{ mg}$$



เมื่อเทียบกับปริมาณของ Poly-ε-Caprolactone ในชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งมีอยู่ 1.071 mg ดังนั้น ปริมาณของ Poly-ε-Caprolactone ที่ย่อยสลายไปคิดเป็น  $2.526 - 1.071 = 1.455$  mg หรือคิดเป็น 57.6%



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ซ. การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อและเทคนิคการย้อม

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพิสูจน์ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้โดยการย้อมสีทางด้าน Histology ซึ่งการย้อมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้น ได้ใช้เทคนิคการย้อม 2 ประเภทคือ Hematoxylin and Eosin (H&E) และ Alcian Blue ซึ่งแต่ละเทคนิคที่ใช้มีคุณสมบัติดังนี้

Hematoxylin and Eosin (H&E) - เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทาง Histology ซึ่งเป็นการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อชั้นพื้นฐาน โดยส่วนของ Hematoxylin จะติดสีม่วงอมน้ำเงินในโครงสร้างที่มีความเป็นกรด เช่นนิวเคลียส ในขณะที่ Eosin จะติดสีชมพูหรือแดงในโครงสร้างที่มีความเป็นเบส เช่นที่ Cytoplasm

### เทคนิคการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ

#### Hematoxylin and Eosin

##### สารเคมีที่ใช้

1. Mayer's Hematoxylin solution
2. Eosin Stock Solution

|               |               |
|---------------|---------------|
| Eosin y Water | 1.0 กรัม      |
| น้ำกลั่น      | 100 มิลลิลิตร |

3. Phloxine Stock Solution

|            |               |
|------------|---------------|
| Phloxine B | 1.0 กรัม      |
| น้ำกลั่น   | 100 มิลลิลิตร |

4. Eosin-Phloxine working solution

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| Eosin Stock Solution    | 100 มิลลิลิตร |
| Phloxine Stock Solution | 10 มิลลิลิตร  |
| 95% Ethanol             | 780 มิลลิลิตร |
| Glacial Acetic Acid     | 4 มิลลิลิตร   |

##### วิธีการย้อม

1. Deparaffinize โดยการอบให้แห้ง, แช่ใน Xylene นาน 10 นาที 3 ครั้ง และ ล้าง Xylene โดยการแช่ใน 95% Ethanol นาน 1 นาที

2. ล้างในน้ำประปา โดยแช่ให้น้ำไหลผ่าน นาน 2 นาที
3. แช่ในสาร Mayer's Hematoxylin นาน 5 นาที
4. จุ่มในสารละลาย Lithium Carbonate
5. ล้างในน้ำประปา โดยแช่ให้น้ำไหลผ่าน นาน 5 นาที
6. จุ่มในสารละลาย 95% Ethanol 3 ครั้ง
7. แช่ใน Eosin-Phloxine working solution นาน 5 นาที
8. จุ่มใน 95% Ethanol 16 ครั้ง
9. จุ่มใน Absolute Alcohol 2 ครั้ง
10. จุ่มใน Xylene 2 ครั้ง
11. ปิดฝาสไลด์แล้วนำไปดูสี

ผลที่ได้จากการย้อมโดยใช้เทคนิค Hematoxylin and Eosin

- ตัดสีน้ำเงินที่นิวเคลียสของเซลล์
- ตัดสีแดงที่ Cytoplasm

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ทำการวิเคราะห์ โดยแปรผันชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ได้ดังตาราง ฅ.2

ตาราง ฅ.2 การวิเคราะห์ทางสถิติแบบที่ เมื่อแปรผันชนิดของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน

|           | Pore size |          |          | Hydrolytic degradation |          |          | Enzymatic degradation |          |          |
|-----------|-----------|----------|----------|------------------------|----------|----------|-----------------------|----------|----------|
|           | 20%       | 25%      | 30%      | 20%                    | 25%      | 30%      | 20%                   | 25%      | 30%      |
| MSG/NaCl  | 150       | 161      | 205      | 5.06                   | 4.47     | 3.99     | 21.77                 | 22       | 22.13    |
| NaCl      | 105       | 156      | 170      | 4.99                   | 4.86     | 4.39     | 22.03                 | 21.89    | 22       |
| ค่าเฉลี่ย | 127.5     | 158.5    | 187.5    | 5.025                  | 4.665    | 4.19     | 21.9                  | 21.945   | 22.065   |
| หา S2     | 506.25    | 6.25     | 306.25   | 0.001225               | 0.038025 | 0.04     | 0.0169                | 0.003025 | 0.004225 |
|           | 506.25    | 6.25     | 306.25   | 0.001225               | 0.038025 | 0.04     | 0.0169                | 0.003025 | 0.004225 |
| Sum       | 1012.5    | 12.5     | 612.5    | 0.00245                | 0.07605  | 0.08     | 0.0338                | 0.00605  | 0.00845  |
| S2        | 1012.5    | 12.5     | 612.5    | 0.00245                | 0.07605  | 0.08     | 0.0338                | 0.00605  | 0.00845  |
| S         | 31.81981  | 3.535534 | 24.74874 | 0.049497               | 0.275772 | 0.282843 | 0.183848              | 0.077782 | 0.091924 |
| root n    | 1.414214  | 1.414214 | 1.414214 | 1.414214               | 1.414214 | 1.414214 | 1.414214              | 1.414214 | 1.414214 |
| t คำนวณ   | 0.9998    | 0.9980   | 0.9997   | 0.9998                 | 0.9998   | 0.9993   | 0.9990                | 0.9964   | 0.9984   |
| t ตาราง   | 2.92      | 2.92     | 2.92     | 2.92                   | 2.92     | 2.92     | 2.92                  | 2.92     | 2.92     |

ค่า t คำนวณ ที่ได้จากตาราง ฅ.1 และ ฅ.2 มีค่าน้อยกว่าค่า t ที่ได้จากตาราง ดังนั้นค่า จากตัวอย่างในด้านของขนาดของรูพรุนและความเข้มข้นของสารละลาย PCL สามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### ตัวอย่างการคำนวณค่า t

การคำนวณค่า t จาก การวิเคราะห์โดยแปรผันความเข้มข้นของ PCL

$$n = 3, x_1 = 150, x_2 = 161, x_3 = 205, \bar{x} = 172$$

$$\text{จะได้ } (x_1 - \bar{x})^2 = 484 \quad (x_2 - \bar{x})^2 = 121 \quad (x_3 - \bar{x})^2 = 1089$$

$$\text{ดังนั้น } \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{3-1} = 847 \quad S = 29.103 \quad \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{29.103}{\sqrt{3}} = 16.803$$

$$\text{ได้ } t_1 = \frac{205 - 172}{16.803} = 1.964 \quad t_2 = \frac{172 - 161}{16.803} = 0.655$$

$$t_3 = \frac{172 - 150}{16.803} = 1.309 \quad (\text{t ตารางมีค่า } 2.35)$$

เพราะฉะนั้นตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณรรวุธ ทองมะโรงสี เกิดเมื่อวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนวัดเทพศิรินทร์ สำเร็จการศึกษา วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2545

### การเสนอผลงานวิชาการ

1. Thongmarongsri, N., Kanokpanont, S., Damrongsukul, S., Bunaprasert, T., and Buranapraditkul, S. "Biodegradable scaffold fabrication for cartilage tissue engineering" (Poster), 8<sup>th</sup> Pacific Polymer Conference, ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ ในระหว่างวันที่ 24 – 27 พฤศจิกายน 2546
2. Thongmarongsri, N., and Kanokpanont, S., "In vitro and in vivo biodegradation of Poly-( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds: an implication for tissue engineering application" (Oral Presentation), Regional Symposium on Chemical Engineering 2004, ณ โรงแรม เดอะแกรนด์ กรุงเทพฯ ในระหว่างวันที่ 1 – 2 ธันวาคม 2547