

ผลของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่  
เตรียมได้จากวิธีโซลเจลต่อการยึดติดและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก



นางสาว วรณิสร์ เพชรศุภมิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาทันตกรรมประดิษฐ์ ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์  
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF SOL- GEL DERIVED TITANIUM DIOXIDE FILMS ON ADHESION AND  
DIFFERENTIATION OF OSTEOBLAST LIKE CELL



Miss Woranis Petchsuphamit

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

Department of Prosthodontics

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของโทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีโซลเจล  
ต่อการยึดติดและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก

โดย

นางสาววรรณิสร เพชรศุภมิตร

สาขาวิชา

ทันตกรรมประดิษฐ์

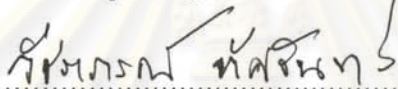
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์สรรพัชญ์ นามะโน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

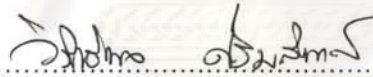
รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภาสันต์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



..... คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง วัชรภาภรณ์ ทศจันทร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



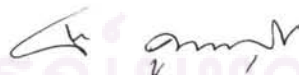
..... ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ทันตแพทย์ดอกเตอร์ วิวิทธิพล ศรีมณีพงศ์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์สรรพัชญ์ นามะโน)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดอกเตอร์ประสิทธิ์ ภาสันต์)



..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ยสวิมล คุณาสุข)

วรรณิษฐ์ เพชรศุภมิตร : ผลของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีโซลเจลต่อ การยึดติดและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก. (EFFECT OF SOL- GEL DERIVED TITANIUM DIOXIDE FILMS ON ADHESION AND DIFFERENTIATION OF OSTEOBLAST LIKE CELL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ทพ.สรรพัชญ์ นามะโน , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์, 73 หน้า

ไทเทเนียมได้รับความนิยมน้อยกว่าหลายในการใช้ผลิตรากเทียมทางทันตกรรม เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกลที่เหมาะสม ด้วยความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาของโลหะไทเทเนียม จะเกิดออกไซด์เองที่พื้นผิวตามธรรมชาติจากปฏิกิริยาแพลสซิเวชัน โดยสารประกอบที่มีปริมาณ มากที่สุดคือ ไทเทเนียมไดออกไซด์ พื้นผิวรากเทียมเป็นบริเวณแรกที่มีเหตุการณ์ทางชีววิทยา เกิดขึ้น เชื่อกันว่าการยึดติดของเซลล์สร้างกระดูกนั้นน่าจะเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และชั้น ไทเทเนียมไดออกไซด์ที่พื้นผิวโลหะไทเทเนียมนั่นเอง จนถึงปัจจุบันมีการปรับปรุงรูปร่างราก เทียม องค์ประกอบเคมี และลักษณะทางกายวิภาคของพื้นผิวรากเทียมที่หลากหลายแตกต่างกันไป เพื่อให้รากเทียมเกิดการเชื่อมประสานกับกระดูกได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากปัจจัยที่มี ผลต่อการตอบสนองของเซลล์มีความสัมพันธ์กันอยู่ ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าการเชื่อม ประสานกับกระดูกที่ดีขึ้นนั้น เกิดจากอิทธิพลของการทดลองหรือเป็นเพราะไทเทเนียมได ออกไซด์บนพื้นผิวรากเทียมกันแน่ วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาการตอบสนอง เบื้องต้นของเซลล์ได้แก่ การยึดติด และการแปรสภาพของเซลล์เอ็มซี3ที่3-อี1 บนไทเทเนียมได ออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีโซลเจล เปรียบเทียบกับกระจกสไลด์กลุ่มควบคุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดและชนิดแรงอะตอมศึกษาลักษณะพื้นผิวของฟิล์ม ใช้ เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างผลึก และทำการทดสอบความชอบน้ำ ของฟิล์ม ผลการศึกษาการตอบสนองของเซลล์พบว่า เซลล์ที่ยึดเกาะบนไทเทเนียมไดออกไซด์ ฟิล์มมีปริมาณมากกว่าบนกระจกสไลด์ในทุกช่วงเวลา โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่ 30 นาทีหลังการหว่านเซลล์ เซลล์บนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีการแผ่ ตัวเร็วและกินพื้นที่มากกว่า โดยไม่พบความแตกต่างของการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอส ฟาเตสหลังจากวันที่ 3 และ 5 ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าเซลล์เอ็มซี3ที่3-อี1มีการตอบสนองเบื้องต้นอย่าง รวดเร็วบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

ภาควิชา : ..... ทันตกรรมประดิษฐ์.....

สาขาวิชา : ..... ทันตกรรมประดิษฐ์.....

ปีการศึกษา : ..... 2552.....

ลายมือชื่อนิสิต ..... วรรณิษฐ์ (เพชรศุภมิตร).....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....  
.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....  
.....

## 5076118432 : MAJOR PROSTHODONTICS

KEYWORDS: SOL-GEL/TITANIUM DIOXIDE/CELL ADHESION/CELL DIFFERENTIATION

WORANIS PETCHSUPHAMIT : EFFECT OF SOL- GEL DERIVED TITANIUM  
DIOXIDE FILMS ON ADHESION AND DIFFERENTIATION OF OSTEOBLAST  
LIKE CELL. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF.SUNPHAT NAMANO, Ph.D,  
THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PRO. PRASIT PAVASANT, Ph.D, 73 pp.

Titanium has been widely used as biomaterials for oral implantology, because of their chemico-mechanical properties and excellent biocompatibility. Since the first biological events are taken place at the bone-implant interface, properties of implant surface serves as an important role in the initial host response. Titanium is a highly reactive metal. The oxidation kinetics are extremely fast, a passivating surface oxide layer was formed in a few nanoseconds. In most cases an oxidized surface layer consists mainly of titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ). It is believed that the osteoblastic attachment and adhesion came from the interaction of bone cell and  $\text{TiO}_2$ . To date, many modifications have been used to improve the performance of dental implants. However, one could not conclude that the outcome was originated whether from their intervention or from the surface  $\text{TiO}_2$  layer. The aim of this study is to investigate an initial cell responses; cell attachment, adhesion and differentiation of the MC3T3-E1 on sol-gel derived  $\text{TiO}_2$  film compared to the glass control. The surface characteristics were investigated using SEM, XRD, AFM and contact angle metrology. By the MTT assay the cell number on the  $\text{TiO}_2$  film was greater than the glass control at all time periods, significant difference were found at 30 min ( $p < 0.05$ ). With SEM, the cell on  $\text{TiO}_2$  film showed more advanced spreading compared to the glass control. No statistically significant difference were found in ALP activity ( $p < 0.05$ ). These findings suggest that MC3T3-E1 cells show rapid early response to  $\text{TiO}_2$  sol-gel coated on glass.

Department : ..... Prosthodontics .....

Field of Study : ..... Prosthodontics .....

Academic Year : ..... 2009 .....

Student's Signature Woranis Petchsuphamit

Advisor's Signature S. Namano

Co-Advisor's Signature Prasit Pavasant

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้เลย หากปราศจากการดูแลเอาใจใส่ และให้คำแนะนำเป็นอย่างดีจาก ผศ.ทพ. สรรพชัย นามะโน ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างยิ่งที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาอันมีประโยชน์อย่างยิ่งตลอดการทำงานวิจัย และทำให้ขั้นตอนต่าง ๆ ในการดำเนินงานมีความราบรื่น และมีประสิทธิภาพ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทันตแพทย์ ธิดารัตน์ อังวรารวงศ์ที่ได้ให้คำปรึกษา สอนขั้นตอนต่าง ๆ ทางด้านเซลล์ และร่วมทำงานตลอดการวิจัย ขอขอบพระคุณคุณสรศักดิ์ อังวรารวงศ์ที่ให้ความกรุณาประดิษฐ์เครื่องจุ่มสำหรับทำการทดลอง รวมทั้งพี่พี่ทันตแพทย์และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านประจำหน่วยวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ ชั้น 7 ตึกพีรคลินิก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในทุกขั้นตอนการทำงานวิจัยขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำ และแก้ไขให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ น้อง รวมทั้งเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจสำคัญตลอดเวลาทำให้ผู้เขียนสามารถทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามการวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
1.4 สมมุติฐานการวิจัย.....	4
1.5 สมมุติฐานทางสถิติ.....	4
1.6 ขอบเขตวิจัย.....	5
1.7 คำสำคัญ.....	5
1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	5
1.9 รูปแบบการวิจัย.....	5
1.10 การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน.....	6
1.11 ประโยชน์ของการวิจัย.....	6
1.12 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	7
1.13 รายละเอียดงบประมาณการวิจัย.....	7
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>9</b>
2.1 ไทเทเนียมและการเกิดออกไซด์ของไทเทเนียม.....	9
2.2 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ของไทเทเนียม.....	15
2.3 การประสานยึดระหว่างเซลล์กระดูกและพื้นผิวรากเทียม.....	15
2.4 การยึดติดของเซลล์ (Cell adhesion) .....	18
2.5 การพัฒนาและปรับปรุงรากเทียม.....	21
2.6 กระบวนการจัดการพื้นผิว และการปรับปรุงคุณสมบัติพื้นผิวรากเทียม.....	25
2.7 การเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยเทคโนโลยีโซลเจล.....	31

บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
3.1	ประชากรเป้าหมาย (Target Population) .....	34
3.2	กลุ่มตัวอย่างวิจัย.....	34
3.3	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	34
3.4	การดำเนินการวิจัย.....	35
3.5	การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection) .....	44
3.6	การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Data Analysis) .....	44
บทที่ 4	ผลการวิจัย.....	45
4.1	การทดสอบคุณลักษณะต่างๆของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้.....	45
4.1.1	การตรวจสอบพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด....	45
4.1.2	การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์...	46
4.1.3	การตรวจสอบลักษณะพื้นผิว ความขรุขระเฉลี่ยและความหนาฟิล์ม ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม.....	47
4.1.4	ทดสอบความชอบน้ำ.....	48
4.2	การทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูก (เอ็มซี3ที3-อี1) .....	49
4.2.1	การทดสอบความมีชีวิตจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที...	49
4.2.2	การศึกษารูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์กับไทเทเนียมไดออกไซด์ ฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	50
4.2.3	การทดสอบการแปรสภาพของเซลล์โดยวัดการทำงานของ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส.....	53
บทที่ 5	อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	54
5.1	การอภิปรายวิธีและผลการวิจัย.....	54
5.2	สรุปผลการวิจัย.....	58
5.3	ข้อเสนอแนะ.....	58
รายการอ้างอิง.....		59
ภาคผนวก.....		67
ภาคผนวก ก	ไค้มาตรฐาน.....	68
ภาคผนวก ข	ตารางผลสถิติ.....	69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....		73



### สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงคุณสมบัติของธาตุไทเทเนียม.....	9



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างผลึกไทเทเนียมไดออกไซด์.....	14
2	แสดงกระบวนการโซลเจล.....	32
3	แสดงการเตรียมตัวอย่างขึ้นงานก่อนทำการทดลอง.....	36
4	แสดงการเตรียมสารละลายโซล.....	37
5	แสดงขั้นตอนการทดลอง.....	38
6	แสดงเครื่องวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์.....	39
7	แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม.....	40
8	แสดงกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	42
9	แสดงลักษณะพื้นผิวจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	45
10	แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์.....	46
11	แสดงลักษณะพื้นผิวของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม.....	47
12	ความหยาบเฉลี่ยของกระจกสไลด์และกระจกสไลด์เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์.....	48
13	แสดงระยะห่างแนวตั้งหรือความหนาของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม.....	48
14	แสดงการเปรียบเทียบความชอบน้ำและค่ามุมสัมผัสที่คงตัวของน้ำและพื้นผิว...	49
15	เปรียบเทียบการปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกด้วยวิธีเอ็มทีที....	50
16	แสดงการยึดเกาะ ยึดติด และแผ่ตัวของเซลล์บนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม.....	51
17	แสดงการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส.....	53

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หลังจาก Brånemark ได้นำเสนอวัสดุปลูกถ่ายชนิดไทเทเนียม ในช่วงปี 1960s ไทเทเนียมได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทดแทนวัสดุชีวภาพที่เป็นโลหะ ชนิดอื่น เช่น เหล็ก ไร้สนิม โคบอลต์-โครเมียมอัลลอยด์ เนื่องจากมีความเสถียรทั้งทางเคมี ชีวภาพและมีคุณสมบัติทางกลที่ดี<sup>(1, 2)</sup> กล่าวคือ มีความแข็งแรง น้ำหนักเบา มีความเหนียว<sup>(3, 4)</sup> ทางทันตกรรมนิยมใช้ไทเทเนียมบริสุทธิ์ (commercially pure titanium, cp titanium grade 2) ในการทำรากเทียม ในขณะที่ทาง การแพทย์นิยมใช้ไทเทเนียมอัลลอยด์ในการทำวัสดุปลูกถ่ายเนื่องจากมีความแข็งแรงกว่า อย่างไรก็ตาม กิติทั้งไทเทเนียมและไทเทเนียมอัลลอยด์ต่างก็มีชั้นออกไซด์บนพื้นผิวหนาประมาณ 2-5 นาโนเมตร<sup>(5, 6)</sup> ซึ่งเกิดเองตามธรรมชาติจากปฏิกิริยาแพลสลิเวชันของไทเทเนียม<sup>(7-9)</sup> สารประกอบที่มีความสำคัญคือชั้นไดออกไซด์ (ไทเทเนียมไดออกไซด์) เนื่องจากมีปริมาณมากที่สุด มีความเสถียร ด้านทานการถูกกัดกร่อนและด้านทานการละลายออกสู่เนื้อเยื่อข้างเคียงได้

โดยทั่วไปแล้ว ชั้นออกไซด์ที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของรากเทียมจะสัมผัสกัน โดยตรงกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ดังนั้นบริเวณนี้จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในการกำหนดคุณสมบัติ ความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ ไม่ทำให้เกิดการแพ้ หรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นที่เชื่อกันว่าการเกิดการยึดเกาะของเซลล์กระดูกนั้นน่าจะเกิดจากชั้นไดออกไซด์ (ไทเทเนียมไดออกไซด์) บนพื้นผิวของโลหะไทเทเนียม ทั้งนี้เนื่องจากไม่สามารถหลีกเลี่ยงปฏิกิริยาแพลสลิเวชันของไทเทเนียมที่เกิดเองตามธรรมชาติได้<sup>(7-9)</sup> ซึ่งไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่แตกต่างกันไป ขึ้นกับองค์ประกอบของโลหะที่ผสมในไทเทเนียม การผ่านกระบวนการทางความร้อนที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ กระบวนการทางกลและทางเคมีของชั้นไทเทเนียม<sup>(1)</sup> ภายในเวลาระดับวินาทีถึง 1 นาที ไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาตินี้ จะมีการดูดซับไฮโดรคาร์บอนและคาร์บอนเนตจากบรรยากาศ ส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไป เช่นมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilicity)<sup>(10)</sup> และพลังงานพื้นผิว (Surface energy) ลดลง<sup>(11, 12)</sup> ซึ่งน่าจะส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่เกิดการยึดติดรากเทียมมีแนวโน้มลดลงด้วย การปล่อยให้เกิดออกไซด์บนพื้นผิวโลหะไทเทเนียมตามธรรมชาตินั้นไม่สามารถควบคุมองค์ประกอบ

โครงสร้าง ความสม่ำเสมอ และความหนาของชั้นออกไซด์ที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งอาจส่งผลต่อการยึดติด และการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกต่างๆกันไป

เนื่องจากไทเทเนียมไดออกไซด์สามารถเตรียมได้หลายวิธี โดยฟิล์มที่เตรียมได้ก็มีลักษณะพื้นผิว และคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป<sup>(13-24)</sup> การศึกษาหรือออกแบบจากเทียมสมัยใหม่ส่วนใหญ่เน้นไปที่การสร้างพื้นผิวให้มีลักษณะกายวิภาคระดับนาโนมากขึ้น เพื่อเลียนแบบโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ที่พบในเซลล์สร้างกระดูกตามธรรมชาติ โดยหวังผลให้เกิดความเข้ากันได้<sup>(25)</sup> การศึกษาครั้งนี้เลือกเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วย**โซล-เจล เทคโนโลยี** ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตสารหรือวัสดุที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวหรือต้องการความบริสุทธิ์สูงเช่น เมทัลลิกออกไซด์กระจก (metallic oxide glass) ไบโอเซรามิกส์ (bioceramics) และพื้นผิวคล้ายไบโอแอคทีฟไทเทเนียม (bioactive titania – like surface)<sup>(4, 17)</sup> เนื่องจากเป็นการเตรียมสารหรือวัสดุในระดับโมเลกุลทำให้สามารถกำหนดสมบัติต่างๆที่ต้องการได้ง่าย รวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถเตรียมสารละลายได้ที่อุณหภูมิห้อง<sup>(26)</sup> ภายใต้การควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม จะได้ชั้นออกไซด์ของโลหะที่มีลักษณะเป็นฟิล์มบาง และมีความขรุขระพื้นผิวระดับนาโนเมตรเท่านั้น<sup>(13, 19, 27)</sup> และสามารถทำซ้ำเพื่อให้เกิดชั้นออกไซด์ที่หนาขึ้นได้ตามต้องการ สามารถทำการเคลือบชิ้นงานได้ตั้งแต่พื้นที่เล็กจนถึงใหญ่ หรือมีรูปร่างที่ซับซ้อน เช่นรากเทียมทางทันตกรรม<sup>(20)</sup> ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีโซล-เจล มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน และเติมไปด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากมายเป็นส่วนใหญ่ พื้นผิวจึงมีลักษณะที่สามารถทำให้เปียกได้ง่าย (highly wettable) มีพลังงานพื้นผิวเพิ่มขึ้น และมีพื้นผิวซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilicity) ทำให้มีความว่องไวทางชีวภาพ (bioactive)<sup>(4, 14, 15)</sup> ซึ่งจะช่วยสนับสนุนการดูดซับไฟโบรเนกติน (fibronectin) และไวโทรเนกติน (vitronectin) ซึ่งเป็นโปรตีนในเลือดที่มีคุณสมบัติคล้ายกาว<sup>(17, 28)</sup> จึงเกิดการยึดติดของเซลล์ได้มากกว่าไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมได้จากวิธีอื่นเช่น การทำแพสซีเวชันด้วยกรดไนตริก (Passivation with nitric acid)<sup>(17)</sup> สเปตเตอริง (Sputtering) และวิธีพลาสมาสเปรย์ (Plasma spray)<sup>(20)</sup> เป็นต้น และเนื่องจากขั้นตอนเตรียมสารไม่ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงมากในการเกิดปฏิกิริยา ฟิล์มที่ได้มีลักษณะบาง และมีความแข็งแรงยึดกับผิวรากเทียมสูง (high bonding strength) จึงไม่เกิดการฉีกขาดออกจากพื้นผิวของโลหะไทเทเนียม ซึ่งแตกต่างจากวิธีพลาสมาสเปรย์<sup>(22-24)</sup> ข้อจำกัดเพียงข้อเดียวของกระบวนการโซล-เจล คือต้องมีการผ่านขั้นตอนที่ต้องใช้ความร้อน เพื่อกำจัดสารประกอบอินทรีย์ ทำให้สามารถเคลือบได้เฉพาะชิ้นงานที่ทนต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงได้เท่านั้น<sup>(26)</sup>

มีการสรุปการศึกษาเกี่ยวกับความสำเร็จของงานรากเทียมว่าเกิดจากการที่รากเทียมสามารถยึดติดกับกระดูกรอบๆ นอกจากรูปร่าง (morphology) ของรากเทียม องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุแล้ว ลักษณะทางกายวิภาคเช่นความขรุขระ ก็ล้วนมีอิทธิพลต่อการยึดเกาะและ

ยึดติดของเซลล์สร้างกระดูก<sup>(17, 29)</sup> ดังนั้นจากอดีตถึงปัจจุบันจึงมีความพยายามหลากหลายรูปแบบในการดัดแปลงคุณสมบัติพื้นผิวและออกแบบรูปร่างของรากเทียมต่างๆกันไป เช่น ออกแบบรากเทียมให้มีรูปร่างสกรูหรือทรงกระบอก ทั้งที่มีลักษณะสอบเข้าหากัน ที่มีรูปร่างคล้ายกรวย รูปทรงไข่ หรือแม้กระทั่งเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู และที่มีรายละเอียดเพิ่มเติมเช่นเป็นร่องชั้น หรือเป็นทางระบาย (vent) เป็นต้น<sup>(30, 31)</sup> เพื่อให้เกิดการยึดติดระหว่างรากเทียมกับกระดูกที่รวดเร็ว และมีเสถียรภาพทั้งทางชีววิทยาและกลศาสตร์ แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาแบบมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ของ Jokstad และคณะ<sup>(30)</sup> พบว่าไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างและลักษณะจำเพาะของรากเทียมกับความสำเร็จทางคลินิก และเป็นความจริงที่ว่า การเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือลักษณะทางกายวิภาค ย่อมทำให้องค์ประกอบทางเคมีนั้นเปลี่ยนไปอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ซึ่งอาจส่งผลต่อการยึดเกาะ ยึดติดและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกด้วย เช่นเมื่อเปลี่ยนลักษณะทางกายวิภาคให้ผิวรากเทียมมีความขรุขระเพิ่มขึ้นพบว่าจำนวนเซลล์ที่มายึดเกาะมีปริมาณมากขึ้น<sup>(6, 32)</sup> อย่างไรก็ตามไม่ทราบแน่ชัดว่าความขรุขระทำให้รากเทียมนั้นมีพื้นที่ผิวมากขึ้น หรือความขรุขระทำให้มีปริมาณของไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มากขึ้นกันแน่

เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องเวลาและงบประมาณ ในงานวิจัยครั้งนี้สนใจศึกษาเฉพาะผลของไทเทเนียมไดออกไซด์เท่านั้น ดังนั้นเพื่อทดสอบสมมติฐานว่า การยึดติดและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก เกิดจากชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์หรือไม่ ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบริสุทธิ์ที่มีความสม่ำเสมอ และเป็นเนื้อเดียวกันในทุกตำแหน่ง (Homogeneous) เพื่อเป็นการควบคุมตัวแปรเกี่ยวกับความขรุขระ และความหนาของชั้นออกไซด์ โดยทำการเคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกสไลด์ซึ่งไม่มีสารประกอบชนิดออกไซด์ใดๆ ปะปนอยู่

## 1.2 คำถามการวิจัย

กระจกสไลด์เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีโซล-เจลมีผลช่วยให้เกิดการยึดติดและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกมากกว่ากระจกสไลด์ที่ไม่ได้เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมได้จากวิธีโซล-เจลหรือไม่

### 1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1) เพื่อทำการทดสอบอย่างเป็นรูปธรรมว่าชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์มีผลต่อการยึดติดของเซลล์สร้างกระดูก
- 2) เพื่อทำการทดสอบอย่างเป็นรูปธรรมว่าชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์มีผลต่อการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก

### 1.4 สมมุติฐานการวิจัย

- 1)
 

Ho : ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกสไลด์ที่เตรียมได้จากวิธีโซล-เจลมีผลต่อการยึดติดของเซลล์สร้างกระดูกไม่แตกต่างจากกระจกสไลด์ที่ไม่ได้เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์

Ha : ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกสไลด์ที่เตรียมได้จากวิธีโซล-เจลมีผลต่อการยึดติดของเซลล์สร้างกระดูกแตกต่างจากกระจกสไลด์ที่ไม่ได้เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์
- 2)
 

Ho : ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกสไลด์ที่เตรียมได้จากวิธีโซล-เจลมีผลต่อการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกไม่แตกต่างจากกระจกสไลด์ที่ไม่ได้เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์

Ha : ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกสไลด์ที่เตรียมได้จากวิธีโซล-เจลมีผลต่อการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกแตกต่างจากกระจกสไลด์ที่ไม่ได้เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์

### 1.5 สมมุติฐานทางสถิติ

1)  $H_0: \mu_1 = \mu_2$

$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$

โดยที่  $\mu_1$  คือ การยึดติดของเซลล์สร้างกระดูกบนกระจกสไลด์ที่ทำการเคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

$\mu_2$  คือ การยึดติดของเซลล์สร้างกระดูกบนกระจกสไลด์ที่ไม่ได้ทำการเคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

โดยกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

$$2) H_0: \mu_3 = \mu_4$$

$$H_a: \mu_3 \neq \mu_4$$

โดยที่  $\mu_3$  คือ การแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกบนกระจกใสที่ทำการเคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

$\mu_4$  คือ การแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกบนกระจกใสที่ไม่ได้ทำการเคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

โดยกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

## 1.6 ขอบเขตวิจัย

เป็นศึกษาเฉพาะการเกิดการยึดเกาะ ยึดติด และการแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์สร้างกระดูกซึ่งเป็นการตอบสนองของเซลล์ในระยะแรกเท่านั้น ในระยะที่มีการสร้างเนื้อเยื่อแข็งจะทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

## 1.7 คำสำคัญ

“Sol-gel”	กระบวนการโซล-เจล เป็นกระบวนการผลิตสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวหรือต้องการความบริสุทธิ์สูง
“Titanium-dioxide”	ไทเทเนียมไดออกไซด์
“Cell adhesion”	การยึดติดของเซลล์
“Cell differentiation”	การแปรสภาพของเซลล์
“Osteoblast”	เซลล์สร้างกระดูก

## 1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1) การยึดติดของเซลล์สร้างกระดูก คือ การที่เซลล์มีการแผ่ตัวและจับกับพื้นผิวใดๆ โดยมีตรรกะนี้ชี้วัดในการศึกษาคำนี้คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการทดสอบด้วยวิธีเอ็มทีที และศึกษารูปร่างและการแผ่ตัวจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

2) การแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก คือกระบวนการที่เซลล์มีพัฒนาการเพื่อสร้างโปรตีนที่เหมาะสม ซึ่งจะเอื้อต่อการแปรสภาพของเซลล์ต่อไป โดยมีตรรกะนี้ชี้วัดในการศึกษาคำนี้คือ การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

## 1.9 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Laboratory experimental research)

## 1.10 การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน

### ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาทำโครงการประมาณ 12 เดือน

### แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

ขั้นตอน	ระยะเวลา ( เดือน )												หมายเหตุ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.ศึกษาและรวบรวมข้อมูล													
2.เตรียมโครงร่างงานวิจัย													
3.แก้ไขและออกแบบงานวิจัย													
4.เริ่มงานวิจัย													
5.รวบรวมวิเคราะห์ข้อมูล													
6.สรุปงานวิจัยและทำรายงาน													

### สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

- 1) หน่วยวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์ ชั้น7 ตึกพีรคลินิก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2) ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 1.11 ประโยชน์ของการวิจัย

- 1) ได้ข้อมูลเพิ่มเติมจากการทำการทดสอบอย่างเป็นรูปธรรมของการรองรับการยึดเกาะ ยึดติดและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีโซลเจล
- 2) เป็นแนวทางในการนำเทคโนโลยีโซล-เจลมาใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวรากเทียมในอนาคต



### 1.12 ข้อจำกัดของการวิจัย

ผลการศึกษาที่ได้เป็นผลจากไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่มีการควบคุมองค์ประกอบ โครงสร้าง ความสม่ำเสมอ และความหนาของชั้นออกไซด์ตามที่เตรียมได้เท่านั้น

### 1.13 รายละเอียดงบประมาณการวิจัย

#### อุปกรณ์การวิจัย

##### 1) อุปกรณ์ที่มีอยู่แล้ว

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด  
(Scanning Electron Microscope JSM-6400, Tokyo, Japan)
- เครื่องมือวิเคราะห์ธาตุด้วยรังสีเอ็กซ์ (X-ray Diffractometry, XRD)
- เครื่องทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
- ตู้อบสำหรับเลี้ยงเซลล์
- เตาเผา (Oven) เพื่อทำการแคลซิเนชัน
- เครื่องผสมสาร (stirrer)
- ปีกเกอร์ขนาด 50 100 และ 500 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 1 มิลลิลิตร  
(automatic micropipette, P 10 pipetman, Gilson Medical Electronics France)
- น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- น้ำกลั่น
- ขวดฉีดล้าง ชั้นนตัก งานแก้วมีฝาปิด

##### 2) วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

- กระจกไลต์ยี่ห้อสุพีเรีย และกล่องเก็บ
- ที่ตัดกระจกชนิดปลายกากเพชร
- สารละลายไฮโดรเจนเพอออกไซด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์
- สารละลายกรดซัลฟิวริก
- สารละลายไทเทเนียมบิวทอกไซด์
- สารละลายเอทานอล
- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก
- สารละลายอะซีติลอะซีโตน

- อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM-Glasgow (MEM-G)
- จานเลี้ยงเซลล์
- สารละลายเอ็มทีที
- สารละลายดีเอ็มเอสโอ

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องจุ่ม (Dipping machine)

### สรุปค่าใช้จ่าย

1) หมวดค่าใช้จ่ายสอย ค่าถ่ายเอกสารและจัดทำรูปเล่มรายงาน	
ก) ค่าถ่ายเอกสารและจัดหาเอกสารอ้างอิง	3,000 บาท
ข) รายงานการวิจัย ถ่ายเอกสารพร้อมปก	3,000 บาท
2) ค่าธรรมเนียมการใช้เครื่องมือ	
ก) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	10,000 บาท
ข) เครื่องมือวิเคราะห์ธาตุด้วยรังสีเอ็กซ์ (XRD)	8,000 บาท
ค) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแรงอะตอม	8,000 บาท
3) หมวดค่าวัสดุ-อุปกรณ์	
ก) สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	40,000 บาท
ข) เครื่องจุ่ม	15,000 บาท
ค) ไมโครปิเปตอัตโนมัติขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร	15,000 บาท
ง) หลอดผสมสาร แท่งแก้ว บีกเกอร์ และ กระบอกตวง	3,500 บาท
จ) จานเลี้ยงเซลล์ขนาดต่างๆ	5,000 บาท
ฉ) กระจกสไลด์ กล่องเก็บ และที่ตัดกระจกปลายกากเพชร	1,500 บาท
รวมทั้งหมด 112,000 บาท	

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### 2.1 ไทเทเนียมและการเกิดออกไซด์ของไทเทเนียม

ไทเทเนียมเป็นแร่หรือธาตุบริสุทธิ์ที่ปรากฏอยู่ในตารางธาตุ มีเลขอะตอมเท่ากับ 22 มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 47.9 เป็นธาตุที่พบมากเป็นอันดับที่ 9 และเป็นธาตุโลหะที่พบมากเป็นอันดับที่ 4 บนเปลือกโลก รองจาก อะลูมิเนียม เหล็ก และแมกนีเซียม ไทเทเนียมถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลายในแง่ที่เป็นวัสดุชีวภาพ (biomaterials) เนื่องจาก<sup>(1)</sup>

- 1 มีความต้านทานต่อการกัดกร่อน (corrosion resistance)
- 2 มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility)
- 3 มีความสามารถทำให้เซลล์กระดูกเกิดการยึดติดและเจริญเข้ามาได้ (bioadhesion: bone ingrowth)
- 4 มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (ออกซิเดชัน-รีดักชัน) ณ.บริเวณที่มีการ สัมผัสกับเนื้อเยื่อ จึงมีส่วนในการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเซลล์และเนื้อเยื่อ
- 5 มีคุณสมบัติทางกล รวมไปถึงความแข็งแรงการล้า (fatigue strength) ค่ายัง โมดูลัสที่เหมาะสม (biofunctionality)
- 6 มีกระบวนการผลิตได้ (processability)
- 7 สามารถหาได้ง่าย (availability)
- 8 เท่าที่ผ่านมายังไม่มีรายงานการแพ้ในผู้ป่วย

เลขอะตอม	22 เป็นธาตุแรกของหมู่ IV B จัดเป็นโลหะและโลหะทรานซิชัน
น้ำหนักอะตอม	47.90 amu
จุดหลอมเหลว	1669° c
จุดเดือด	3260° c
ความหนาแน่น	4.507 g/cc ที่ 25° c
เลขออกซิเดชันสามัญ	+2, +3, +4

การจัดเรียงอิเล็กตรอนหลัก 2,8,10,2<sup>(3)</sup>

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของธาตุไทเทเนียม

## 2.1.1 ไทเทเนียมชนิดต่างๆ

2.1.1.1 **ไทเทเนียมบริสุทธิ์** ไทเทเนียมบริสุทธิ์เป็นโลหะที่มีคุณสมบัติที่ค่อนข้างอ่อน ไม่มีความเป็นแม่เหล็ก อีกทั้งยังเป็นโลหะเพียงชนิดเดียวที่สามารถเกิดการเผาไหม้ในบรรยากาศที่มีไนโตรเจนได้ ไทเทเนียมเป็นธาตุที่มีความไวต่อปฏิกิริยา ดังนั้นในธรรมชาติจึงไม่พบไทเทเนียมในรูปแบบธาตุบริสุทธิ์ แต่จะอยู่ในรูปของสินแร่ไทเทเนียม (Ti ores) ได้แก่ ไรต์ (rutile:TiO<sub>2</sub>) หรือ อิลเมนไนท์ (ilmenite : FeTiO<sub>3</sub>)<sup>(33)</sup>

Dr.Wilhelm Kroll ได้ค้นพบกระบวนการในการสกัดไทเทเนียมบริสุทธิ์ (commercially pure titanium : Cp-Ti) ออกจากสินแร่ไทเทเนียม หรือที่เรียกว่ากระบวนการของโครล (Kroll process) โดยการเผาสินแร่ไทเทเนียมได้แก่ ไรต์ หรืออิลเมนไนท์กับธาตุคาร์บอนและคลอรีนที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนได้ไทเทเนียมเตตระคลอไรด์ (TiCl<sub>4</sub>) จากนั้น ทำการรีดิวซ์ไทเทเนียมเตตระคลอไรด์ด้วยไซเดียมหรือแมกนีเซียมที่อุณหภูมิ 850 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดเป็นฟองไทเทเนียม (Ti sponge) และได้ผลผลิตพลอยได้คือ แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl<sub>2</sub>) หลังจากแยกแมกนีเซียมคลอไรด์ออก จึงรวมฟองไทเทเนียมเข้าด้วยกัน ภายใต้สภาวะอากาศหรือก๊าซอาร์กอน (argon atmosphere) ได้เป็นก้อนโลหะไทเทเนียม (Ti ingots) การค้นพบกระบวนการของ Dr. Wilhelm Kroll ทำให้เขาได้ชื่อว่าเป็นบิดาแห่งอุตสาหกรรมไทเทเนียมที่อุณหภูมิห้องไทเทเนียมบริสุทธิ์จะมีโครงสร้างผลึกเป็นทรงกระบอกหกเหลี่ยมแบบอัดแน่น (hexagonal close-pack: HCP) ซึ่งอยู่ในรูปแบบแอลฟา (alpha-form) เมื่อให้อุณหภูมิสูงถึง 883 องศาเซลเซียส จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกไปเป็นลูกบาศก์แบบบอดีเซ็นเตอร์ (body center cubic : BCC) ซึ่งอยู่ในรูปแบบเบต้า (beta-form) โดยโครงสร้างผลึกแบบลูกบาศก์บอดีเซ็นเตอร์จะคงอยู่จนถึงจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 1,700 องศาเซลเซียส เมื่อไทเทเนียมบริสุทธิ์มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกจะทำให้สมบัติของมันเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม<sup>(7)</sup> โดยไทเทเนียมบริสุทธิ์รูปแบบเบต้าจะมีความแข็งแรงสูงกว่า แต่มีความเปราะมากกว่ารูปแบบแอลฟา

ไทเทเนียมสามารถหลอมรวมได้กับแร่ธาตุหลายชนิด เช่น เงิน(Ag) อลูมิเนียม(Al) อาร์เซนิก(As) ทองแดง(Cu)<sup>(17)</sup> เหล็ก(Fe) แกลเลียม(Ga) ยูเรเนียม(W) วาเนเดียม(V) สังกะสี (Zn) กลายเป็นโลหะผสมไทเทเนียม นอกจากนี้การรวมตัวกับสารจำพวกคาร์บอน(C) ออกซิเจน(O) ไนโตรเจน(N) และเหล็ก(Fe) จะทำให้สมบัติเชิงกล(mechanical properties) ของโลหะผสมไทเทเนียมดีขึ้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ของไทเทเนียมโดยส่วนใหญ่แล้วจะมีส่วนประกอบของสารเหล่านี้อยู่น้อยมากก็น้อยและเป็นที่รู้จักโดยทั่วไปในชื่อของไทเทเนียมบริสุทธิ์ทางการค้า (commercially pure titanium)<sup>(5)</sup> ไทเทเนียมบริสุทธิ์สามารถจำแนกได้เป็น 4 เกรดตาม The American Society of Testing and Materials(ASTM) ซึ่งขึ้นอยู่กับการปริมาณของธาตุออกซิเจน ไนโตรเจน เหล็ก และคาร์บอนที่เติมลงไประหว่างขั้นตอนการผลิต ได้แก่

ไทเทเนียมบริสุทธิ์เกรด 1 (grade I Titanium) มีความบริสุทธิ์มากที่สุด ประกอบด้วยธาตุออกซิเจนไม่เกินร้อยละ 0.18 โดยน้ำหนัก และธาตุเหล็กไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก จึงมีความอ่อนมากที่สุด โดยมีค่าความแข็งแรงแบบบริเนลล์ (Brinell hardness number : BHN) เท่ากับ 120 มีสภาพดัดยัดได้ (ductility) มากสุด โดยมีค่าร้อยละของการยืดตัว (% elongation) เท่ากับ 37 และมีค่าความทนแรงดึงต่ำสุด (minimum tensile strength) เท่ากับ 240 เมกกะปาสคาล

ไทเทเนียมบริสุทธิ์เกรด 2 (grade II Titanium) มีธาตุออกซิเจนเป็นองค์ประกอบไม่เกินร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก และธาตุเหล็กไม่เกินร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก มีค่าความแข็งแรงแบบบริเนลล์เท่ากับ 160 และมีค่าร้อยละของการยืดตัวเท่ากับ 28

ไทเทเนียมบริสุทธิ์เกรด 3 (grade III Titanium) ประกอบด้วยธาตุออกซิเจนไม่เกินร้อยละ 0.35 โดยน้ำหนัก และธาตุเหล็กไม่เกินร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก มีค่าความแข็งแรงแบบบริเนลล์เท่ากับ 200 และมีค่าร้อยละของการยืดตัวเท่ากับ 25

ไทเทเนียมบริสุทธิ์เกรด 4 (grade IV Titanium) จะมีความแข็งแรงมากที่สุด โดยมีค่าความแข็งแรงแบบบริเนลล์เท่ากับ 250 มีสภาพดัดยัดได้น้อยสุด โดยมีค่าร้อยละของการยืดตัวเท่ากับ 23 ประกอบด้วยธาตุออกซิเจนไม่เกินร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก และธาตุเหล็กไม่เกินร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก มีค่าความทนแรงดึงต่ำสุดเท่ากับ 500 เมกกะปาสคาล

#### 2.1.1.2 โลหะผสมไทเทเนียม (Titanium alloys)

โลหะผสมไทเทเนียมเกิดจากการนำไทเทเนียมบริสุทธิ์มาผ่านกรรมวิธีทางความร้อน (heat treatment) และหลอมละลายรวมกับธาตุต่างๆ ในอัตราส่วนที่คงที่ ต่อมาจะถูกทำให้เย็นลงได้เป็นโลหะผสมไทเทเนียม ซึ่งโลหะผสมเหล่านี้จะให้สมบัติเชิงกลที่เป็นที่ต้องการสำหรับวัสดุรากเทียม กล่าวคือมีคุณสมบัติแข็งแรง เบา และยังมีความทนทานต่อความล้า (fatigue) และการสึกกร่อน ถึงแม้ว่าจะมีความแข็งแรงที่มากกว่ากระดูกแต่โลหะผสมเหล่านี้ก็มีค่าโมดูลัสของความยืดหยุ่น (modulus of elasticity) ที่ใกล้เคียงกับกระดูกมากกว่าวัสดุรากเทียมชนิดอื่นยกเว้นไทเทเนียมบริสุทธิ์ โดยคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้เกิดการกระจายแรงจากรากเทียมสู่กระดูกที่อยู่ล้อมรอบ (cortical bone-implant interface) ได้ดี อันเนื่องมาจากกระดูกและรากเทียมมีการงอตัว (flex) คล้ายกัน<sup>(7)</sup>

โลหะผสมไทเทเนียมที่นิยมมากที่สุดในทางทันตกรรม ได้แก่ โลหะผสมไทเทเนียมที่ประกอบด้วยไทเทเนียมร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก อะลูมิเนียมร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก และวานาเดียมร้อยละ 4 โดยน้ำหนักหรือ Ti-6Al-4V โดยอะลูมิเนียมจะทำหน้าที่เป็นตัวคงวัฏภาคแอลฟา ทำให้โลหะมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นและมีน้ำหนักเบา และวานาเดียมทำหน้าที่เป็นตัวคงวัฏภาคเบต้า เมื่อ

ให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 975 องศาเซลเซียส โลหะผสมดังกล่าวสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกไปเป็นโครงสร้างผลึกแบบลูกบาศก์แบบบอดีเซ็นเตอร์ ซึ่งประกอบด้วยวัฏภาคเบต้า ดังนั้น จึงสามารถทำการปรับปรุงสมบัติด้วยความร้อน(thermal treatment) เพื่อกำหนดปริมาณหรือโครงสร้างของวัฏภาคที่เกิดขึ้นเพื่อให้ได้สมบัติทางกลและสมบัติทางกายภาพของโลหะผสมตามต้องการ เช่น ให้ความแข็งแรงเพิ่มขึ้น มีการเชื่อมต้อและขึ้นรูปได้ง่ายขึ้น เป็นต้น

นอกจากนั้น มีการศึกษาพบว่า Ti-6Al-4V นั้นมีข้อดีกว่าไทเทเนียมบริสุทธิ์ในแง่ของความสามารถในการรับแรงได้มากกว่าเนื่องจากความแข็งแรงของโลหะผสม แต่อย่างไรก็ตามสำหรับการแตกหักของรากเทียมที่ทำมาจากไทเทเนียมบริสุทธิ์นั้นมียางานว่าพบน้อยมาก จึงแสดงให้เห็นว่าไทเทเนียมบริสุทธิ์ก็มีความแข็งแรงเพียงพอต่อการใช้งาน<sup>(8)</sup>

### 2.1.2 การเกิดออกไซด์ของไทเทเนียม

ไทเทเนียมบริสุทธิ์และโลหะผสมไทเทเนียม เป็นโลหะที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (reactive) เมื่อโลหะนี้สัมผัสกับอากาศ น้ำ หรืออิเล็กโทรไลต์ใดๆ จะเกิดออกไซด์ขึ้นเองตามธรรมชาติลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มขึ้นที่พื้นผิว เพื่อปกป้องโลหะจากการถูกทำลายทางเคมี<sup>(9)</sup> สารประกอบของออกไซด์ที่เกิดขึ้นและปกคลุมผิวโลหะนี้ทำหน้าที่ปกป้องไทเทเนียมบริสุทธิ์และโลหะผสมไทเทเนียมจากการสึกกร่อนเมื่ออยู่ในร่างกาย<sup>(7)</sup> ภายในเวลาเศษหนึ่งส่วนพันวินาที (millisecond) จะเกิดขึ้นออกไซด์ขนาด 10 อังสตรอมขึ้นที่ผิวของไทเทเนียมบริสุทธิ์ และภายในเวลา 1 นาที ชั้นของออกไซด์จะเพิ่มความหนาเป็น 50-100 อังสตรอม และไม่สลายไปเมื่ออยู่ในร่างกาย

แพสซีเวชัน (passivation) หมายถึง การที่โลหะถูกออกซิไดส์และเกิดเป็นชั้นออกไซด์ขึ้นปกคลุมพื้นผิว มีความคงทน มีเสถียรภาพ (stability) และความเฉื่อย (inertness) ไม่แตกสลายเมื่ออยู่ในร่างกาย พบว่าโลหะผสมไทเทเนียมที่มีไทเทเนียมเป็นองค์ประกอบร้อยละ 85-95 ยังคงมีคุณสมบัติแพสซีวิตีของไทเทเนียมบริสุทธิ์ มีความเป็นไปได้ของรูปแบบออกไซด์ที่จะเกิดบนโลหะไทเทเนียมถึง 7 รูปแบบ<sup>(34)</sup> ได้แก่

- 1) ไม่มีโครงสร้างผลึกที่ชัดเจน (amorphous oxide)
- 2) คิวบิกไทเทเนียมออกไซด์ (cubic titanium oxide, TiO)
- 3) เฮกซะโกนอล ไทเทเนียมเสกควิออกไซด์ (hexagonal titanium sesquioxide, Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)
- 4) เตตระโกนอล ไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบอนาเทส (tetragonal titanium dioxide; anatase, TiO<sub>2</sub>)

- 5) ออโรรอมบิก ไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบบรูคไคท์ (orthorhombic titaniumdioxide; brookite)
- 6) เตตระโกนอล ไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบรูไทล์ (tetragonal titaniumdioxide; rutile,  $TiO_2$ )
- 7) ไม่มีสูตรโครงสร้างที่แน่นอน (nonstoichiometric oxide,  $Ti_xO_y$ )

ในบรรดาออกไซด์ของไทเทเนียม ไทเทเนียมไดออกไซด์เป็นสารประกอบที่เสถียรที่สุด และถูกนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด ทั้งไทเทเนียมบริสุทธิ์และโลหะผสม Ti-6Al-4V จะมีออกไซด์ปกคลุมผิวแบบเดียวกัน โดยเกิดเป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ปกคลุมผิวโลหะ และชั้นออกไซด์นี้สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ทันทีที่ถูกทำลาย เช่นในขณะฝังรากเทียม<sup>(7)</sup>

ทันทีที่รากเทียมนั้นถูกนำไปใส่ในร่างกาย จะมีปฏิกิริยาที่ซับซ้อนมากมายเกิดขึ้นที่บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นออกไซด์และชีวแวดล้อม (oxide/bioenvironment interface) จะมีการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างกันโดยการแพร่<sup>(9)</sup> โดยปกติแล้วไทเทเนียมสะสมในเนื้อเยื่อมนุษย์ 50 ส่วนต่อล้านส่วน (ppm) แต่ในเนื้อเยื่อรอบรากเทียมไทเทเนียมแล้วจะพบปริมาณไทเทเนียมสะสมได้มากถึง 100-300 ส่วนต่อล้านส่วน โดยสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของเนื้อเยื่อได้ อย่างไรก็ตาม จากการติดตามผลการรักษาทางคลินิกของทั้งไทเทเนียมและโลหะผสมไทเทเนียมมากกว่า 20 ปี พบว่าอัตราการละลายออกสู่เนื้อเยื่อของไทเทเนียมนี้ ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแต่อย่างใด<sup>(7)</sup>

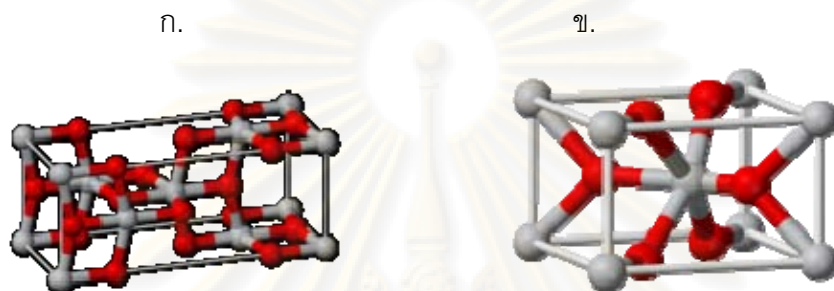
Parr และคณะ<sup>(7)</sup> ศึกษาเกี่ยวกับการนำไทเทเนียมมาใช้ในงานรากเทียมทางทันตกรรม ได้ข้อสรุปว่า ไทเทเนียมและโลหะผสมไทเทเนียมเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติทางกลเหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นรากเทียม เมื่อถูกออกซิไดส์ในอากาศจะเกิดออกไซด์ที่พื้นผิวซึ่งมีเสถียรภาพมากเมื่อนำมาใช้ในร่างกาย ซึ่งความมีเสถียรภาพ (stability) และเฉื่อย (inertness) ของออกไซด์บริเวณพื้นผิวจะทำหน้าที่ป้องกันการถูกกัดกร่อนของไทเทเนียมเมื่อนำมาใช้ในร่างกาย นอกจากนี้ไทเทเนียมยังสามารถนำไปรวมกับโลหะชนิดอื่นที่มีระดับความแพสซีฟ (passive) ที่เท่ากันได้ โดยไม่ทำให้เกิดการกัดกร่อนแบบกัลวานิก และในการเตรียมโลหะสำหรับการฝังรากเทียมนั้น การกำจัดสิ่งผิดปกติบริเวณพื้นผิว (surface irregularity) หรือสิ่งปนเปื้อนบนรากเทียมเป็นสิ่งสำคัญ

### 2.1.3 ไทเทเนียมไดออกไซด์ ( $TiO_2$ )

โลหะไทเทเนียมสามารถต้านทานการกัดกร่อนและสารเคมีได้ เกิดจากความมีเสถียรภาพทางเคมีของไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ปกคลุมอยู่ แต่ในสารละลายที่เป็นของเหลว เช่นในชีวแวดล้อม ไทเทเนียมไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยาและดูดซับและแยกเอาโมเลกุลอินทรีย์จาก

อากาศ เป็นที่ทราบกันดีในหมู่นักเคมีว่า ไทเทเนียมไดออกไซด์ที่พื้นผิวนั้นทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับปฏิกิริยาเคมีหลายๆอย่างได้<sup>(1)</sup>

ไทเทเนียมไดออกไซด์ที่พบในธรรมชาติ มีโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกัน 3 แบบ ได้แก่ รูไทล์ อนาเทส และบรูไคท์ ซึ่งตัวสำคัญที่พบมากคือ รูไทล์และอนาเทส ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้มีโครงสร้างผลึกแบบเตตระโกนอล ดังรูปที่ 1 โดยทั่วไปไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบอนาเทสสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากกว่า



รูปที่ 1 โครงสร้างผลึกไทเทเนียมไดออกไซด์ ก. แสดงโครงสร้างผลึกอนาเทส 1 หน่วยเซลล์ ข. โครงสร้างผลึกรูไทล์ 1 หน่วยเซลล์ โดยสีเทาแทนไทเทเนียมอะตอม สีแดงแทนออกซิเจนอะตอม (ภาพจาก [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))

ผลึกไทเทเนียมไดออกไซด์มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ขึ้นกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่ออุณหภูมิต่ำจะพบรูปแบบอนาเทสเป็นส่วนใหญ่ แต่ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 900 องศาเซลเซียส ไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบอนาเทสจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นแบบรูไทล์

จากการศึกษาที่ผ่านมาตั้งแต่อดีต พบว่าชั้นออกไซด์ที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวรากเทียมไทเทเนียมตามธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์เป็นส่วนใหญ่นั้น มีข้อดีต่องานรากเทียมมากมาย เช่น

Woodman JL และคณะ<sup>(35)</sup> Breme J และคณะ<sup>(36, 37)</sup> บอกว่าไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เกิดตามธรรมชาติบนพื้นผิวไทเทเนียม ( หนาประมาณ 2-6 นาโนเมตร) จะเกิดปฏิกิริสัมพันธ์กับร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยชั้นออกไซด์นี้มีความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ มีความเฉื่อยเคมี และมีอัตราการละลายตัวที่ต่ำเมื่ออยู่ในร่างกาย

Lautenschlager<sup>(33)</sup> ในปี 1993 กล่าวว่า เป็นเพราะไทเทเนียมไดออกไซด์ ที่ทำให้ไทเทเนียมมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ เมื่อชั้นออกไซด์นั้นจับกับน้ำ แล้วจะเกิดหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หรือหมู่ออกไซด์ (-O<sub>2</sub>) ที่พื้นผิวชั้นนอกที่สุด จากการศึกษาด้วยเครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนร่วมกับ SEM พบว่าชั้นออกไซด์นี้เมื่อเจอกับสารละลายของเหลวในร่างกาย จะรวมกับแคลเซียมหรือฟอสฟอรัสเกิดการสะสมเป็นชั้นของแคลเซียมฟอสเฟตหรืออะพาไทต์ได้<sup>(1, 38, 39)</sup> แต่จาก



กระบวนการข้างต้น ทำให้พื้นผิวมีประจุลบอ่อนๆ ส่งผลให้เกิดได้ทั้งปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน และการทำลายโปรตีน (denaturation) ที่กล่าวมานี้ยังเป็นหนึ่งในข้อโต้แย้งของความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของไทเทเนียมไดออกไซด์

## 2.2 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ของไทเทเนียม

จาก The glossary of prosthodontic terms eighth edition. ปี 2005<sup>(40)</sup> ให้นิยามดังนี้

Biocompatible : capable of existing in harmony with the surrounding biologic environment .

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ หมายถึง การที่วัสดุแปลกปลอมใดๆ สามารถดำรงอยู่ได้ในเนื้อเยื่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต ในความเป็นจริงแล้ว ไม่มีวัสดุใดที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยสมบูรณ์ (It may be that absolute biocompatibility is plain utopia : Williams) อาจกล่าวได้ว่า ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุใดๆ คือการที่วัสดุนั้นๆ ไม่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองที่ไม่พึงประสงค์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และในทางกลับกันวัสดุนั้นก็ไม่ถูกทำให้เสียหายโดยเนื้อเยื่อของร่างกาย<sup>(41)</sup>

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ได้แก่ ปัจจัยทางทางกล เคมี ทางไฟฟ้า และคุณสมบัติจำเพาะของพื้นผิว<sup>(41)</sup> สำหรับความเข้ากันได้ทางชีวภาพของรากเทียมชนิดฝังในกระดูก (endosteal implant) ต้องพิจารณาปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างกระดูก และสารประกอบที่พื้นผิวรากเทียมไม่ใช่ดูจากคุณสมบัติของโลหะนั้นๆ และเป็นที่เชื่อกันว่าความเข้ากันได้ทางชีวภาพของรากเทียมไทเทเนียม เกิดจากชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์ที่พื้นผิว หลายการศึกษาได้กล่าวถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับเรื่องต่างๆ เช่น การกัดกร่อนและปฏิกิริยาที่พื้นผิว (Corrosion and surface reaction) ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนและเซลล์ในร่างกาย (Interactions with proteins and cells) การปรับปรุงพื้นผิว (Surface modification) การหายของแผลในกระดูก (Healing in bone) เป็นต้น

## 2.3 การประสานยึดระหว่างเซลล์กระดูกและพื้นผิวรากเทียม

จาก The glossary of prosthodontic terms eighth edition. ปี 2005<sup>(40)</sup> ให้นิยามดังนี้

Osseous integration (1993) 1 : the apparent direct attachment or connection of osseous tissue to an inert, alloplastic material without intervening connective tissue 2 : the process and resultant apparent direct connection of an exogenous material's surface tissues , without intervening fibrous connective tissue present 3: the interface between alloplastic materials and bone.

การเป็นอันหนึ่งอันเดียวกันกับกระดูก หมายถึง 1. การเชื่อมกันของเนื้อเยื่อกระดูกกับวัสดุปลูกถ่ายที่เฉื่อย โดยไม่มีการขัดขวางจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน 2. กระบวนการและผลของการเชื่อมกันโดยตรงของเนื้อเยื่อกับพื้นผิวของวัสดุใดๆโดยไม่มีการขัดขวางจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดไฟบรัส 3. รอยต่อระหว่างวัสดุปลูกถ่ายและกระดูก

ความสำเร็จระยะยาวของรากเทียมเกิดจากการที่รากเทียมสามารถเกิดการเชื่อมประสานกันอย่างมั่นคงระหว่างกระดูกและพื้นผิวของรากเทียมนั้นๆ (Osseointegration) ในการทำให้เกิดและคงสภาวะดังกล่าวขึ้นกับ

1. กระบวนการหายของเนื้อเยื่อ การซ่อมแซม และการรีโมเดลลิง (remodeling)
2. การใช้เทคนิคศัลยกรรมที่ทำให้เนื้อเยื่อได้รับการบาดเจ็บน้อยที่สุด
3. ความพอดีและมีเสถียรภาพของรากเทียมหลังการฝังในช่วงแรก (stable initial fit)
4. จำกัดแรงที่ลงบริเวณที่ทำการฝังรากเทียมให้น้อยที่สุดระหว่างที่มีกระบวนการหายของเนื้อเยื่อ
5. ในการใช้งานตามปกติ ควบคุมให้แรงที่ลงบริเวณรากเทียมอยู่ในขอบเขตที่ร่างกายทนได้ (physiologic limits)
6. มีการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อ
7. ใช้รากเทียมที่สะอาดและมีระดับความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง

ในที่นี้จะกล่าวถึงกระบวนการหายของเนื้อเยื่อ การซ่อมแซม และการรีโมเดลลิงเท่านั้น

### กระบวนการหายของแผล

กระดูกเป็นเนื้อเยื่อที่มีแร่ธาตุ และสารประกอบที่เป็นโปรตีนจำนวนมาก รวมทั้งมีระบบหมุนเวียนเลือดที่ซับซ้อน จุดเริ่มต้นในกระบวนการหายของแผลเริ่มจากมีการอักเสบหรือบาดเจ็บเกิดขึ้น ซึ่งก็คือบริเวณที่ทำการผ่าตัดเพื่อฝังรากเทียมนั่นเอง ขบวนการหายของแผลประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

ก) การโมเดลลิง สำหรับในช่วงแรกของขบวนการหายของแผล (ประมาณ 24 ชั่วโมง) ในส่วนที่เป็นกระดูก ตัวรากเทียมจะมีความเสถียรเชิงกลได้ต้องได้รับแรงกดที่พอเหมาะ ในกระดูกที่มีความกว้างประมาณ 1 มิลลิเมตร มีเคลื่อนที่เพียงเล็กน้อยในส่วนของเนื้อเยื่อกระดูก

และจะเกิดการยึดเกาะที่แน่นตามมาระหว่างส่วนเกลียวของโลหะและกระดูกที่บดที่ขาดเลือดมาหล่อเลี้ยงเป็นบริเวณประมาณ 2/3 ของสันกระดูก ในระหว่างที่เตรียมบริเวณที่จะฝังรากเทียม เส้นใยกระดูกส่วนปลายจะถูกดันให้เคลื่อนที่เข้าไปในไขกระดูกและทำให้เส้นเลือดเกิดการฉีกขาดและเลือดออกตามมา ภายหลังจากนั้นจะเกิดการแข็งตัวของเลือดเกิดเป็นลิ่มเลือดระหว่างตัวรากเทียมและกระดูก ซึ่งในวันต่อๆมา จะเกิดเป็นลิ่มเลือดที่สมบูรณ์ และลิ่มเลือดที่สมบูรณ์นี้จะถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue) ซึ่งมีปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophils) และมาโครฟาจ (macrophages) เป็นจำนวนมาก และเม็ดเลือดขาวที่มาจากช่องไขกระดูกของกระดูกส่วนปลายที่ยังมีชีวิตเหล่านี้จะทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในแผลและจะสร้างโครงสร้างที่เป็นเส้นเลือดเข้าไปในส่วนของเนื้อเยื่อแกรนูเลชันที่สร้างขึ้นใหม่

ภายหลังจากทำการฝังรากเทียมเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ มาโครฟาจที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมและมีเซนไคมอลเซลล์ที่ไม่เกิดการแบ่งตัว จะเริ่มผลิตและหลั่งสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth factors) ไปกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของเส้นใยเหนียว (fibroplasias) ภายในเนื้อเยื่อยึดต่อชั่วคราวที่ไม่แบ่งตัว (undifferentiated provisional connective tissue) โดยเนื้อเยื่อยึดต่อชั่วคราวที่ไม่แบ่งตัวนี้จะมีปริมาณเส้นเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) และมีเซนไคมอลเซลล์ที่ไม่เกิดการแบ่งตัวมาก และกลายเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์สร้างเข้าไปในออสติออยด์ (osteoid) ที่มาจากกระดูกที่มีลักษณะเป็นคลื่นตามมาด้วยการสร้างและปิดส่วนที่เป็นช่องว่างในกระดูก

ภายหลังจากการฝังรากเทียม 2 สัปดาห์ จะพบกระดูกที่มีลักษณะเป็นคลื่น (woven bone) ที่มีโพรมาริโอสตีออน (primary osteons) ในบริเวณที่มีการฝังรากเทียมบริเวณส่วนฐาน และเกิดการสร้างกระดูกใหม่ทั้งในส่วนปลายและบริเวณช่องแยก (furcation sites) ของผิวรากเทียม นอกจากนี้ยังพบเส้นสมมติที่เรียกว่ารีเวอร์ซอลไลน์ (reversal lines) อยู่ติดกับตัวรากเทียมและด้านข้างของเนื้อเยื่อที่ตายแล้วที่ติดกับเกลียวรากเทียมที่ถูกละลาย สำหรับในบริเวณช่องแยกของรากเทียมพบว่าการสร้างกระดูกใหม่ขึ้น ซึ่งเป็นการประสานยึดระหว่างกระดูกและพื้นผิวรากเทียม แต่ในส่วนที่เป็นจุดยอด (peaks of the threads of the screw – type implants) ของเกลียวของรากเทียม จะเห็นบริเวณที่มีการละลายของกระดูกซึ่งแยกจากกัน (discrete areas of bone resorption) เนื่องจากกระดูกที่มีลักษณะเป็นคลื่นที่เพิ่งสร้างใหม่นั้นมีความสามารถในการรับแรงที่มากกระทำได้น้อย และความเสถียรของรากเทียมจะเกิดได้ก็ด้วยการคงสภาพแรงกดที่เหมาะสมในส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกที่ตายของกระดูกที่บด

ต่อมา หลังจากฝังรากเทียมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในบริเวณพื้นผิวของเกลียวรากเทียม ซึ่งแต่ละเกลียวมีความห่างกันประมาณ 1 มิลลิเมตร ในบริเวณที่เป็นกระดูกซึ่งอยู่ห่างจากรากเทียมไปทางด้านข้างประมาณ 1 มิลลิเมตร จะพบว่ายังคงมีส่วนของกระดูกเก่าอยู่บางส่วน ซึ่ง

จะถูกแทนที่ด้วยกระดูกที่มีลักษณะเป็นคลื่นที่สร้างขึ้นใหม่ โดยในส่วนของกระดูกใหม่ที่ไม่มีการสะสมของแร่ธาตุจะพบว่าไม่มีอะดิพไซท์(adipocytes) และมีการสร้างกระดูกใหม่ที่มีลักษณะเป็นคลื่นซึ่งบุอยู่เป็นส่วนใหญ่บริเวณพื้นผิวของรากเทียม ซึ่งการสร้างกระดูกในส่วนนี้สามารถเรียกได้ว่าเป็นการประสานยึดระหว่างกระดูกและพื้นผิวรากเทียมอย่างแท้จริง (true osseointegration)

ข) ริโมเดลลิง เป็นขั้นตอนที่กระดูกใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นคลื่นถูกแทนที่ด้วยชั้นกระดูกบาง(lamellar bone) ที่มีประสิทธิภาพในการกระจายแรง โดยการแทนที่กระดูกใหม่ที่มีลักษณะเป็นคลื่นที่เกิดจากการทำงานของออสติโอคลาสต(osteoclastic activity) และถูกแทนที่ด้วยชั้นกระดูกบางและไขกระดูก

ภายหลังจากฝังรากเทียมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ในบริเวณพื้นผิวของเกลียวรากเทียม จะถูกบุด้วยชั้นกระดูกบางซึ่งอยู่ด้านข้างต่อไขกระดูกที่ภายในมีอะดิพไซท์เป็นจำนวนมาก ภายในชั้นกระดูกบางในบริเวณที่ได้รับแรงกดที่พอเหมาะและกระดูกที่อยู่ใกล้เคียงจะพบเซคันดารีออสติออน(secondary osteons) กับชั้นกระดูกบางที่มีลักษณะเป็นวงกลม(concentric lamellae) และส่วนกลางของฮาร์เวอร์เซียนคาแนล (central Haversian canal) ในระหว่างที่เกิดขบวนการในการหายของแผลพบว่ากระดูกเก่าจะถูกแทนที่ด้วยกระดูกใหม่<sup>(42)</sup>

## 2.4 การยึดติดของเซลล์ (Cell adhesion)

หลังทำการผ่าตัดฝังรากเทียม มีเหตุการณ์ทางชีววิทยาต่างๆ เกิดขึ้นทั้งในเซลล์นอกเซลล์ และบริเวณพื้นผิวรากเทียมซึ่งมีการดูดซึมโปรตีน<sup>(17)</sup> โดยมีองค์ประกอบทางเคมีลักษณะกายวิภาคและพลังงานของพื้นผิวเป็นตัวควบคุม การดูดซึมโปรตีน การยึดเกาะของเซลล์ และพฤติกรรมอื่นๆ เช่น การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่ของเซลล์<sup>(17, 28, 43-46)</sup> Anselme และคณะ<sup>(28)</sup> ได้รวบรวมวรรณกรรมที่ศึกษาเกี่ยวกับการยึดติดของเซลล์สร้างกระดูกบนวัสดุชีวภาพ โดยเน้นไปที่การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้อง และพบว่าเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์และรากเทียมในช่วงแรก คือ เซลล์เกิดการยึดเกาะ ยึดติดและแผ่ตัว

ช่วงแรกที่เซลล์เกิดการยึดเกาะ จะเกิดในช่วงแรกเป็นระยะเวลาสั้นๆ คล้ายมีการเชื่อมกันทางกายภาพและชีวภาพระหว่างเซลล์และวัสดุ มีความเกี่ยวข้องกับพันธะไฮดรอกซิล แรงแวนเดอร์วาลส์ และอื่นๆ ต่อมาในช่วงที่เซลล์เกิดการยึดติด จะกินเวลานานกว่า มีความเกี่ยวข้องกับชีวโมเลกุลหลายประเภทโดยเฉพาะโปรตีน เช่น โปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) โปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างของเซลล์ (cytoskeletal protein) โดยโมเลกุลเหล่านี้จะชักนำให้เกิดการส่งสัญญาณ

(signal transduction) ส่งเสริมการทำงานของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factors) ซึ่งจะควบคุมการแสดงออกของยีนต่อไป (17, 28)

#### 2.4.1 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดติดและการเคลื่อนที่ของเซลล์

**โปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์** เมทริกซ์นอกเซลล์ของกระดูกประกอบด้วย

ก. โปรตีนชนิดคอลลาเจนร้อยละ 90 (ชนิดที่ 1 ร้อยละ 97 และชนิดที่ 5 ร้อยละ 3)

ข. โปรตีนชนิดไม่ใช่คอลลาเจนร้อยละ 10 (ออสทีโอแคลซินร้อยละ 20 ออสทีโอเนกตินร้อยละ 20 โบนไซฮาโลโปรตีนร้อยละ 12 โปรตีโอไกลแคนร้อยละ 10 ออสทีโอพอนตินไฟโบรเนกติน โกรทแฟคเตอร์ โบนมอโฟเจนิคโปรตีนและอื่นๆ)

โดยโปรตีนทั้งหมดนี้ถูกสร้างโดยเซลล์สร้างกระดูก และส่วนใหญ่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการยึดติดของเซลล์ โดยโปรตีนของกระดูกบางตัว (ไฟโบรเนกติน ออสทีโอพอนติน โบนไซฮาโลโปรตีน ทรอมโบสพอนติน ไวโทรเนกติน และคอลลาเจนชนิดที่ 1) ที่มีคุณสมบัติคือโมแทกติกหรือมีคุณสมบัติคล้ายก้าว เนื่องจากมีหมู่ อาร์-จี-ดี (Arg-Gly-As; RGD) ซึ่งมีความจำเพาะต่อตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane receptor) ตระกูลอินทิกริน ดังนั้นถ้าพื้นผิวของวัสดุชีวภาพสามารถดูดซับโปรตีนเหล่านี้ก็จะสามารถส่งเสริมการยึดติดกับเซลล์ได้หลายชนิดรวมทั้งเซลล์ที่มาจากกระดูกด้วย (17, 28, 43, 46)

**โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างของเซลล์** ตำแหน่งที่เกิดการยึดติดระหว่างเซลล์และพื้นผิวใดๆ เรียกว่าโฟคอลลคอนแทค (focal contact) หรือแอดฮีชันพลาค (adhesion plaque) ซึ่งตำแหน่งนี้จะเป็นรอยต่อที่แคบมาก คือประมาณ 10-15 นาโนเมตรจากพื้นผิววัสดุและเยื่อหุ้มเซลล์ ด้านนอกของโฟคอลลคอนแทคจะมีตัวรับโปรตีนที่จำเพาะ (specific receptor protein) เช่นอินทิกริน ส่วนด้านในจะมีโปรตีนบางชนิดเช่น ทาลิน แพคซีลิน วินคูลินและเทนซิน ซึ่งจะเป็นตัวควบคุมให้มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอกตินฟิลาเมนต์ และตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์ตระกูลอินทิกริน การเกิดโฟคอลลคอนแทคทำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่ช้าลง แอกตินฟิลาเมนต์มีส่วนในการคงรูปร่างและการยึดติดของเซลล์

**หมายเหตุ** โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดติดของเซลล์มี 4 ชนิดหลักได้แก่ ซีเลคติน อิมมูโนโกลบูลิน ซูเปอร์แฟมิลี แคดฮีรีน และอินทิกริน

เมื่อมีการยึดติดระหว่างเซลล์กับพื้นผิววัสดุ หรือระหว่างเซลล์กับเซลล์อื่นที่กรีนโมเลกุลซีเอเอ็ม (CAM) และแกปจังก์ชัน จะชักนำให้เกิดการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signal transduction) เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน การเคลื่อนที่ของเซลล์อาศัยการมีปฏิสัมพันธ์ที่ต่อเนื่องระหว่างเซลล์ พื้นผิวที่เซลล์เกาะอยู่ และโครงร่างของเซลล์ ชั้นแรก เซลล์จะยื่นส่วนที่อยู่ขอบๆของมันเพื่อสร้างสิ่งที่มีลักษณะคล้ายขา เรียกว่าลามेलลิโปเดียม ชั้นต่อมาหลังจากมีการสร้างและตรึงลามेलลิโปเดียม เซลล์จะใช้ปฏิสัมพันธ์แบบกาว (adhesive interaction) เพื่อให้เกิดการหดตัว และเกิดพลังงานสำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ ชั้นสุดท้ายในวงจรการเคลื่อนที่คือการปล่อยส่วนที่ใช้ในการยึดติดทางด้านหลังของเซลล์ออก ตามมาด้วยการหลุดออกและการหดตัวของเซลล์<sup>(28)</sup>

#### 2.4.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์สร้างกระดูกและวัสดุ

องค์ประกอบทางเคมี ลักษณะกายวิภาคเฉพาะส่วนและพลังงานของพื้นผิวของวัสดุเป็นตัวที่มีอิทธิพลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์สร้างกระดูกและวัสดุ เมื่อเซลล์มาสัมผัสกับพื้นผิวเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นก่อนคือ มีการเกาะ ยึดติด และแผ่ตัว ซึ่งขึ้นกับการดูดซึมโปรตีนที่ทำหน้าที่คล้ายกาว ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คุณภาพของการยึดติดของเซลล์ นี้จะส่งผลต่อรูปร่างเซลล์ ความสามารถในการเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อทำหน้าที่ของเซลล์<sup>(17, 28)</sup>

มีการสรุปการศึกษาเกี่ยวกับความสำเร็จของงานรากเทียมว่าเกิดจากการที่รากเทียมสามารถเกิดการเชื่อมประสานกับกระดูกรอบๆ ได้ โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยึดเกาะของเซลล์กระดูก ได้แก่ รูปร่างของรากเทียม องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุ ลักษณะทางกายวิภาคเฉพาะส่วน เช่นความขรุขระ หรือรูพรุนบริเวณพื้นผิว และคุณสมบัติอื่นๆ ได้แก่ ความชอบหรือไม่ชอบน้ำ ความเป็นประจุบวกหรือลบของพื้นผิว พลังงานที่พื้นผิว เป็นต้น จากหลายการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า **มีความสัมพันธ์กันระหว่างบางปัจจัย**ที่กล่าวมาข้างต้น

Lim และคณะ<sup>(34)</sup> ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความขรุขระพื้นผิวและความสามารถในการทำให้เปียก (wettability) ซึ่งได้จากการวัดค่ามุมสัมผัสที่คงตัวกับพื้นผิว (contact angle) ของไทเทเนียม 3 ชนิด ได้แก่ โลหะไทเทเนียมบริสุทธิ์ (cp T) โลหะผสมไทเทเนียม อะลูมิเนียม วานาเดียม (Ti-6Al-4V) และ โลหะผสมไทเทเนียม นิกเกิล (Ti-Ni) ผลพบว่า โลหะไทเทเนียมบริสุทธิ์จะมีค่ามุมสัมผัสที่คงตัวกับพื้นผิวน้อยที่สุด เมื่อผ่านการทำให้พื้นผิวมีความขรุขระด้วยวิธีทางเคมี โดยแช่พื้นผิวด้วยส่วนผสมของกรดไฮโดรฟลูออริก กรดไนตริกและน้ำ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอากาศ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า เมื่อโลหะไทเทเนียมมีค่ามุมสัมผัสที่คงตัวกับพื้นผิวมากกว่า 45

องศา มุมนั้นจะเพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าความขรุขระเฉลี่ย (Ra) ซึ่งเป็นธรรมชาติของคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ และบริเวณพื้นผิวจะปกคลุมด้วยออกไซด์ชนิดรูโกล์เท่านั้น ในทางกลับกันถ้ามุมสัมผัสที่คงตัวกับพื้นผิวลดลงน้อยกว่า 45 องศา แบบมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าความขรุขระเฉลี่ย ซึ่งเป็นธรรมชาติของคุณสมบัติความชอบน้ำ บริเวณพื้นผิวนั้นจะปกคลุมด้วยออกไซด์ชนิดผสมระหว่างรูโกล์และอนาเทส

Li และคณะ<sup>(39)</sup> พบว่า วัสดุใดก็ตามที่มีประจุลบหรือมีหมู่ไฮดรอกซิลที่พื้นผิว จะมีคุณสมบัติเป็นตัวชักนำอะพาไทต์และเหมาะที่จะเป็นวัสดุชีวภาพที่สามารถเชื่อมกับกระดูก อย่างไรก็ตามพื้นผิวที่มีพลังงานมากจะดูดซับสารอินทรีย์ที่มีประจุลบ และสารปนเปื้อนที่เป็นสารอินทรีย์พวกไฮโดรคาร์บอน จากบรรยากาศภายในเวลาระดับวินาทีถึง 1 นาที ส่งผลให้องค์ประกอบเคมีพื้นผิวเปลี่ยนไปและมีความชอบน้ำและพลังงานพื้นผิวลดลง<sup>(10)</sup>

เห็นได้ว่าความขรุขระที่พื้นผิวและพลังงานพื้นผิว เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการตอบสนองของเซลล์ต่อชีววัสดุ คุณสมบัติทางเคมีของพื้นผิวที่มีลักษณะชอบน้ำ มีพลังงานพื้นผิวสูง จะมีคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ (osteogenic) แต่การการดูดซับไฮโดรคาร์บอนและคาร์บอนเนตจากบรรยากาศของไทเทเนียมไดออกไซด์ทำให้ที่บริเวณพื้นผิวมีพลังงานพื้นผิวที่ต่ำลง ประกอบกับเกิดความขรุขระที่พื้นผิวซึ่งสามารถชักนำให้เกิดความไม่ชอบน้ำมากขึ้น ดังนั้น Zhao และคณะ<sup>(11)</sup> ในปี 2005 จึงทำการปรับเปลี่ยนให้บริเวณพื้นผิวไทเทเนียมเกิดหมู่ไฮดรอกซิลหรือไฮดรอกซ์เพื่อให้ไทเทเนียมไดออกไซด์ยังคงมีพลังงานพื้นผิวที่สูง เมื่อทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูก ผลพบว่าเซลล์สามารถเจริญบนพื้นผิว มีการเปลี่ยนแปลงตัวเพื่อทำหน้าที่โดยพบว่า มีการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และออสตีโอแคลซิน นอกจากนี้ยังพบการสังเคราะห์ ทีจีเอฟ-เบตาวัน (TGF- $\beta$ 1) พรอสตาแกรนดินอีทู (PGE<sub>2</sub>) และโอพีจี (OPG) ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่ส่งเสริมให้มีการสะสมแร่ธาตุเพื่อสร้างกระดูกได้ดีขึ้น ต่อมาในปี 2007 Zhao<sup>(12)</sup> และคณะได้ศึกษาเกี่ยวกับความขรุขระพื้นผิวในระดับเล็กกว่าไมครอน (submicron) รายงานว่าความขรุขระพื้นผิวและพลังงานพื้นผิวเป็นปัจจัยเสริมกันสนับสนุนการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูก และยืนยันว่าการทำพื้นผิวให้มีความขรุขระระดับไมครอนและเล็กกว่าไมครอน ยังเป็นสิ่งจำเป็น

## 2.5 การพัฒนาและปรับปรุงรากเทียม

เพื่อให้ประสบความสำเร็จในงานรากเทียม จึงมีความพยายามมากมายในการดัดแปลงคุณสมบัติพื้นผิวและออกแบบรูปร่างของรากเทียมต่างๆกันไป ซึ่งแบ่งได้กว้างๆ ดังนี้

2.5.1 รูปร่างของรากเทียม (implant morphology) มีการทำรากเทียมเป็นรูปร่างต่างๆ เช่น รากเทียมชนิดสกรูและทรงกระบอก ทั้งที่มีลักษณะสอบเข้าหากัน ที่มีรูปร่างคล้ายกรวย รูปทรงไข

หรือแม้กระทั่งที่มีด้านเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู และที่มีรายละเอียดเพิ่มเติมเช่นเป็นร่อง ชัน หรือเป็นทางระบาย เป็นต้น

Gotfredsen และคณะ<sup>(31)</sup> ทำการศึกษาเปรียบเทียบการยึดเกาะกับกระดูก โดยดูจากแรงที่ใช้ในการถอนรากเทียม (removal torque) จากกระดูกขากรรไกรของสุนัข ระหว่างรากเทียม 4 แบบ คือ รากเทียมชนิดสกรูพ่นด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ รากเทียมชนิดทรงกระบอกพ่นด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ รากเทียมชนิดสกรูแบบกลิ้ง รากเทียมชนิดทรงกระบอกแบบกลิ้ง ได้ข้อสรุปในประเด็นของรูปร่างว่า รากเทียมชนิดสกรูต้องใช้แรงในการถอนรากเทียมออกจากกระดูกขากรรไกรของสุนัขมากกว่ารากเทียมชนิดทรงกระบอก

ในขณะที่ Jokstad และคณะ<sup>(30)</sup> ทำการศึกษาแบบมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างหรือลักษณะจำเพาะของรากเทียมกับความสำเร็จทางคลินิกในรากเทียมมากกว่า 220 ชนิด จาก 80 บริษัท ซึ่งมีรูปร่างและการปรับปรุงคุณสมบัติพื้นผิวที่แตกต่างกัน กลับพบว่าไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด

## 2.5.2 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุ

เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิว มีการพัฒนาและประยุกต์ใช้สารต่างๆ เคลือบผิวรากเทียม ผลการศึกษาที่มีหลากหลายไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่า การเคลือบสารต่างๆ จะมีผลดีจริงหรือไม่<sup>(30)</sup> สารประกอบซึ่งเป็นที่นิยม คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต<sup>(4, 13, 47, 48)</sup> เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีคล้ายส่วนที่เป็นแร่ธาตุของกระดูกและฟัน มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ มีคุณสมบัติเหนียวทำให้เกิดการสร้างกระดูกที่เร็วกว่า และช่วยให้การหายของกระดูกเกิดรวดเร็วขึ้น<sup>(1, 49-51)</sup> มีการเปรียบเทียบระหว่างรากเทียมไทเทเนียมบริสุทธิ์ที่เคลือบผิวด้วย ไฮดรอกซีอะพาไทต์ กับรากเทียมไทเทเนียมบริสุทธิ์ที่ไม่ได้ทำการเคลือบไฮดรอกซีอะพาไทต์ มีหลายการศึกษาที่พบว่าเซลล์กระดูกมีการตอบสนองต่อรากเทียมที่เคลือบไฮดรอกซีอะพาไทต์อย่างรวดเร็วกว่าในระยะแรก

Chang และคณะ<sup>(52)</sup> พบว่าการเคลือบไฮดรอกซีอะพาไทต์บนรากเทียมโลหะสนับสนุนการเกิดการเชื่อมประสานระหว่างรากเทียมและกระดูก โดยในช่วงต้นมีส่วนช่วยให้เกิดการหายของกระดูก และช่วยให้เกิดการเชื่อมกับกระดูกอย่างแข็งแรง แม้ว่าปริมาณผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เคลือบบนรากเทียมโลหะไทเทเนียมไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อความสามารถในการสร้างกระดูก และความแข็งแรงในการเชื่อมยึดกับกระดูกก็ตาม แต่พบว่าถ้าเคลือบรากเทียมไทเทเนียมด้วยผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ปริมาณมาก รากเทียมนั้นจะมีความคงทน และคุณสมบัติออสติโอคอนดักทีฟ (Osteoconductive) ได้ดีกว่ารากเทียมไทเทเนียมบริสุทธิ์ที่ไม่ได้ทำ



การเคลือบ ในทำนองเดียวกันกับ Hulshoff<sup>(49)</sup> และ Coathup พร้อมคณะ<sup>(53)</sup> พบว่า ผิวโลหะไทเทเนียมที่ทำการเคลือบด้วยผลึกไฮดรอกซีอะพาไทด์ เซลล์สร้างกระดูกจะมีการตอบสนองในระยะแรกดีกว่าผิวโลหะไทเทเนียมที่ขรุขระด้วยการเป่าอนุภาคในลอนขนาด 6 ไมครอน

อย่างไรก็ตาม มีผลการศึกษาที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน Dhert และคณะ<sup>(50)</sup> เปรียบเทียบการเคลือบรากเทียมชนิดโลหะผสมไทเทเนียมด้วย ฟลูออโรอะพาไทด์ แมกนีเซียม-วิทลอคโคท และไฮดรอกซีอะพาไทด์ พบว่าการเคลือบด้วยฟลูออโรอะพาไทด์ มีการสร้างและสะสมของกระดูก (Bone apposition) ดีที่สุด โดยไม่พบการสลายของชั้นฟลูออโรอะพาไทด์ที่ทำการเคลือบ การเคลือบด้วยแมกนีเซียมวิทลอคโคทให้ผลไม่ค่อยดีนัก ชั้นเคลือบ มีความหนา ลดลงแสดงถึงการละลายตัวของชั้นเคลือบ ในสัปดาห์ที่ 12 มีการตอบสนองที่ไม่พึงประสงค์ของเนื้อเยื่อ เดือนที่ 6 มีการสร้างและสะสมของกระดูกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเดือนที่ 3 ส่วนการเคลือบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทด์ให้ผลแย่มากที่สุด คือในเดือนที่ 3 ไม่พบการสร้างและสะสมของกระดูกเลย มีแต่เนื้อเยื่อไฟบรัส เมื่อเดือนที่ 6 ก็ยังไม่พบสร้างและสะสมของกระดูกแต่อย่างใด

Caulier และคณะ<sup>(51)</sup> พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปหรือได้รับแรงกระทำ ไฮดรอกซีอะพาไทด์หรือ สารเคลือบชนิดแคลเซียม-ฟอสเฟตจะหลุดจากผิวรากเทียมไทเทเนียม เหลือเป็นไทเทเนียมบริสุทธิ์เท่านั้น แต่ไม่มีผลเสียทางคลินิกต่อรอยต่อระหว่างกระดูกและรากเทียม (bone-implant contact) ยังสามารถเกิดการเชื่อมกันโดยตรงกับกระดูกใหม่ที่มีลักษณะเป็นคลื่นและชั้นกระดูกบางตามมาได้แม้จะมีเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงก็ตาม

นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการเคลือบรากเทียมด้วยสารอื่นๆ Nanci และคณะ<sup>(54)</sup> ทดลองใช้อะมิโนอัลคิลซิลเลน (aminoalkylsilane) เคลือบผิวรากเทียม เพื่อให้เกิดพันธะโควาเลนต์เชื่อมกับโปรตีนในกระแผลเลือดอย่างจำเพาะ ผลการศึกษาพบว่าอะมิโนอัลคิลซิลเลนเกิดการเชื่อมที่มั่นคงกับชั้นนอกไฮดรอกซีอะพาไทด์ของรากเทียมไทเทเนียม และยังสามารถจับกับโปรตีนในกระแผลเลือด เช่นอัลคาไลด์ฟอสฟาเตส และอัลบูมินโดยยังคงคุณสมบัติเดิม คือความเป็นเอนไซม์และความเป็นแอนติเจน ตามลำดับ ดังนั้นวิธีนี้อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจให้เกิดการหายของแผลระหว่างที่เกิดการเชื่อมกันของรากเทียมกับกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

นอกจากชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO<sub>2</sub>) บนโลหะไทเทเนียมบริสุทธิ์ ที่พบว่ามีการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกที่ดีแล้ว Areva และคณะ<sup>(18)</sup> ทดลองเพิ่มชั้นนอกไฮดรอกซีอะพาไทด์อื่น ในที่นี้คือซิลิกา เพื่อให้เกิดเป็นส่วนผสมของไทเทเนียมไดออกไซด์และซิลิกอนไดออกไซด์ (TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>) บนโลหะไทเทเนียมบริสุทธิ์ พบว่าทั้งเซลล์สร้างกระดูกและไฟโบรบลาสต์ต่างก็เกิดการตอบสนองที่ดีต่อส่วนผสมของไทเทเนียมไดออกไซด์ร้อยละ 70 และซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 30 และเมื่อปรับส่วนผสมเป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ร้อยละ 30 และซิลิกอนไดออกไซด์ร้อยละ 70 พบว่าทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกที่ยาวนานกว่า และเกิดการก่อตัวของ

แคลเซียม อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดเกี่ยวกับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตอบสนองของเซลล์

### 2.5.3 ลักษณะทางกายวิภาคเฉพาะส่วน ( Topography )

ในส่วนของคุณลักษณะทางกายวิภาคเฉพาะส่วนมีการศึกษามากมายที่เน้นไปที่ การเพิ่มความขรุขระพื้นผิว นอกจากความขรุขระจะส่งผลต่อคุณสมบัติความชอบน้ำ พลังงานพื้นผิว พื้นผิว และประจุของพื้นผิวแล้ว<sup>(11, 12, 34, 55-58)</sup> ยังส่งผลต่อการตอบสนองของเซลล์อีกด้วย<sup>(6, 17, 32, 59)</sup> โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์สร้างกระดูก มีการศึกษามากมายที่ให้ผลแน่ชัดแล้วว่าองค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิวทุกชนิดที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ จะมีคุณสมบัติทำให้เกิดการสร้าง กระดูก (osteogenic)<sup>(11, 28, 58)</sup> ซึ่งเซลล์กระดูกมีแนวโน้มที่จะเกิดการยึดเกาะมากกว่า Eriksson<sup>(59)</sup> ศึกษาการตอบสนองของกระดูกในช่วง 3 อาทิตย์แรกหลังการฝังรากเทียม เปรียบเทียบระหว่างโลหะไทเทเนียมที่ทำพื้นผิวให้มีลักษณะชอบน้ำและไม่ชอบน้ำพบว่า พื้นผิวชอบน้ำจะมีพลังงานพื้นผิวสูงกว่า สามารถกระตุ้นการตอบสนองช่วงต้นและการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีพลังงานต่ำ Zhao และคณะ<sup>(11)</sup> ปรับปรุงพื้นผิวไทเทเนียมให้มีลักษณะชอบน้ำมากขึ้นหวังผลให้เกิดการสร้างกระดูก เนื่องจากไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จะมีพลังงานพื้นผิวต่ำและมีสมบัติไม่ชอบน้ำเนื่องจากพื้นผิวมีความขรุขระและมีการดูดซับไฮโดรคาร์บอนและคาร์บอนเนตจากบรรยากาศ ซึ่งผลจากการศึกษานี้พบว่าหลังการปรับปรุงพื้นผิวไทเทเนียมให้มีลักษณะชอบน้ำมากขึ้น ตัวบ่งชี้ของการสร้างกระดูกก็จะเพิ่มมากขึ้นตาม นอกจากนี้เซลล์สร้างกระดูกยังมีแนวโน้มที่จะยึดเกาะและเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อการทำหน้าที่กับพื้นผิวที่มีความขรุขระมากกว่าบนพื้นผิวเรียบ ทำให้เกิดการยึดกับกระดูกของรากเทียม<sup>(29, 60, 61)</sup> แม้ว่าจะยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดเกี่ยวกับระดับความขรุขระก็ตาม มีรายงานว่า ไทเทเนียมที่มีความขรุขระพื้นผิวน้อยกว่า 10 นาโนเมตร จะมีจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่เกิดการยึดเกาะเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์ไฮดรอกซีอะปาทิตฟอสเฟต และเกิดการสะสมของแร่ธาตุได้ดีขึ้น มีการศึกษาที่ทำการเตรียมพื้นผิวให้มีความขรุขระทั้งระดับไมครอน<sup>(6, 32, 58, 61)</sup> และนาโนเมตร<sup>(27, 62-66)</sup> เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลต่อการตอบสนองของเซลล์ เช่น

Mustafa และคณะ<sup>(61)</sup> ทำการเป่าอนุภาคระดับไมครอนของไทเทเนียมไดออกไซด์ขนาดต่างๆ บนรากเทียมไทเทเนียม เพื่อเพิ่มความขรุขระพื้นผิว พบว่ากระดูกขากรรไกรล่างของมนุษย์จะมีการตอบสนองเบื้องต้นที่ดีต่อพื้นผิวขรุขระระดับที่มีอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ขนาด 180-300 ไมครอน แต่เมื่อเพิ่มขนาดอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ให้มากกว่า 300 ไมครอน กลับพบว่าไม่มีผลเพิ่มการยึดเกาะช่วงต้นแต่อย่างใด

Kommireddy และคณะ<sup>(65)</sup> ทำการเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ในระดับนาโนเมตร โดยเคลือบแก้วด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมด้วยวิธีที่ใช้หลักการดึงดูระหว่างประจุที่ตรงข้ามกัน (Polyelectrolyte) ทีละชั้น พบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนชั้นที่ทำการเคลือบ ความขรุขระพื้นผิวไทเทเนียมไดออกไซด์จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรง ผลที่เกิดขึ้นคือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มายึดเกาะมากขึ้นเนื่องจากความขรุขระทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้นนั่นเอง

จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดเกี่ยวกับระดับความขรุขระที่พอเหมาะ แต่อย่างไรก็ตามแนวโน้มในปัจจุบันและในอนาคต พบว่ามีการศึกษา ออกแบบ และปรับปรุงพื้นผิวรากเทียมให้มีความขรุขระระดับนาโนสเกลมากขึ้น เพื่อให้เหมาะสมหรือเลียนแบบโปรตีนนอกเซลล์ที่พบในกระดูก ซึ่งมีโครงสร้างและโมเลกุลต่างๆขนาดเล็กระดับนาโนเมตร กระดูกใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นคลื่นมีอนุภาคที่เป็นแร่ธาตุอนินทรีย์ขนาดเฉลี่ย 10-50 นาโนเมตร ส่วนชั้นกระดูกบางมีอนุภาคที่เป็นแร่ธาตุอนินทรีย์ซึ่งมีความยาวเฉลี่ย 20-50 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 นาโนเมตร พบว่ารากเทียมที่ใช้กันทั่วไปทางคลินิกที่มีความขรุขระพื้นผิวระดับไมครอน หรือเสมือนมีพื้นผิวเรียบ จะมีการเกิดไฟโบรอินทีเกรชันหรือการสร้างแคลลัส กลายเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไฟบรัสครอบรากเทียมแทนที่จะเป็นกระดูก<sup>(67)</sup>

Webster และคณะ<sup>(64)</sup> เปรียบเทียบพื้นผิวที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกัน แต่มีความขรุขระต่างกันในระดับนาโนเมตรและไมครอน พบว่าในระดับนาโนเมตร (น้อยกว่า 100 นาโนเมตร) บริเวณพื้นผิวจะมีปริมาณอะตอมของโลหะที่มีขนาดเล็ก(เส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 100 นาโนเมตร) จำนวนมากกว่า ทำให้มีความพิเศษคือ เมื่อจำนวนอะตอมโลหะที่พื้นผิวมากกว่า จะมีขอบเขตผลึก (particle boundaries) และมีสัดส่วนอิเล็กตรอนที่เปลี่ยนตำแหน่งไป (delocalize electron) มากขึ้น ซึ่งคุณสมบัติพิเศษที่พื้นผิวเหล่านี้ ช่วยสนับสนุนการมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดติดของเซลล์ในช่วงแรก

## 2.6 กระบวนการจัดการพื้นผิว และการปรับปรุงคุณสมบัติพื้นผิวรากเทียม

ในการผลิตรากเทียมจากโลหะไทเทเนียม อาจต้องผ่านหลากหลายกรรมวิธีเช่น การรีด การกลึง การเหวี่ยง การหล่อหรือหลอมโลหะ<sup>(1)</sup> ระหว่างขั้นตอนการกลึงไทเทเนียมเพื่อให้ได้รูปร่างที่ต้องการ จะต้องมีการตัดโลหะทำให้มีการเผยผิวไทเทเนียมใหม่ ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พื้นผิวอย่างรวดเร็ว และจะต้องมีการใช้สารหล่อเย็นและสารหล่อลื่น (cooling/lubricating agents) ซึ่งอาจมีส่วนในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันซ้ำอีก นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบพลาสติก (plastic deformation) จะมีชั้นสเมียร์เกิดที่พื้นผิวและลึกลงไปในเนื้อวัสดุประมาณ 2-3 ไมครอน ในขั้นตอนการรีดและเหวี่ยงโลหะต้องมีการเพิ่มอุณหภูมิ เมื่อมี

การสัมผัสกับอากาศหรือเมื่อมีการสัมผัสกับพื้นผิวจะทำให้เกิดการสร้างชั้นออกไซด์ที่พื้นผิวใหม่ ระหว่างการตกแตงเพื่อให้เป็นรูปร่างตามที่ต้องการ จะมีความเครียดสะสมที่พื้นผิวอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ซึ่งเป็นตำแหน่งเริ่มต้นของการเกิดการร้าว (crack initiation) หรือเกิดการกร่อนเนื่องจากความเครียด (stress corrosion) จากกระบวนการผลิตดังกล่าว บริเวณพื้นผิวจึงมีลักษณะไม่เป็นแบบแผนเดียวกัน (nonuniform) และมีการปนเปื้อน ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ทางการแพทย์

นอกจากกระบวนการจัดการพื้นผิวจะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวแล้ว ในแง่ของวัสดุชีวภาพคุณสมบัติของพื้นผิววัสดุมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางชีววิทยา ดังนั้นการพัฒนาการปรับปรุงคุณสมบัติพื้นผิวรากเทียม (surface modification) จึงเป็นเสมือนเครื่องมือในการควบคุมการตอบสนองของเนื้อเยื่อร่างกาย

### จุดประสงค์ในการจัดการพื้นผิว ได้แก่

1. เพื่อทำความสะอาดและกำจัดชั้นออกไซด์ดั้งเดิม
2. เพื่อดัดแปลงโครงสร้างพื้นผิวและกายวิภาคเฉพาะส่วน เช่นทำให้ผิวเรียบ ขรุขระหรือมีลักษณะพรุน แบ่งตามลักษณะพื้นผิวที่เกิดขึ้นได้เป็น 2 แบบ คือ
  - ก) การทำให้พื้นผิวมีลักษณะนูน (convex texture) ด้วยวิธีการเติมอนุภาคบางอย่างที่พื้นผิว (additive treatment) เช่น ผงลึกละเอียดของไฮดรอกซีอะพาไทต์ อนุภาคไทเทเนียม หรือสารประกอบอื่นๆ ซึ่ง มีความเป็นไปได้ที่อนุภาคที่ทำการเติมลงไปนี้ จะหลุดออกจากพื้นผิวรากเทียม วิธีการสร้างให้พื้นผิวมีลักษณะนูน เช่น วิธีพลาสมาสเปย์ (plasma spray) และการทำให้ตกตะกอนด้วยไอทั้งทางเคมีหรือกายภาพ (physical or chemical vapor deposition)
  - ข) การทำให้พื้นผิวมีลักษณะเว้า (concave texture) ด้วยวิธีการเอาสารประกอบหรืออนุภาคที่พื้นผิวออก (subtractive treatment) โดยวิธีทางกล (mechanical treatment) เช่น การพ่นทราย (sandblasting) ซึ่งทำให้เกิดความขรุขระในระดับไมครอน หรือวิธีทางเคมี (chemical treatment) เช่นกัดพื้นผิวด้วยกรดหรือด่าง ซึ่งทำให้เกิดความขรุขระในระดับต่ำกว่าไมครอน
3. เพื่อดัดแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างของชั้นออกไซด์ หรือเพื่อควบคุมการเกิดชั้นออกไซด์ใหม่ให้มีความสม่ำเสมอที่พื้นผิว เช่นวิธีไฮลเจล

### วิธีในการจัดการพื้นผิว แบ่งได้ใหญ่ๆดังนี้

**วิธีที่ 1 วิธีทางกล** โดยทั่วไปใช้เพื่อทำให้วัสดุเป็นรูปร่างตามที่ต้องการหรือตัดเอาบางส่วนของวัสดุออก สามารถแบ่งได้เป็น

การกำจัดวัสดุที่พื้นผิว เช่นโดยการตัดหรือขัด

การทำให้วัสดุที่พื้นผิวเปลี่ยนรูปร่างหรือรูปแบบไป เช่นการเป่าด้วยอนุภาคใดๆ

### ก) บลาสติง (Blasting)

การเป่าด้วยทรายหรือกรวด (Grit blasting) อาศัยหลักของการที่อนุภาคของแข็งพุ่งเข้าชนพื้นผิวด้วยความเร็วสูง คล้ายการปล่อยระเบิด อนุภาคดังกล่าวอาจเป็นลักษณะแห้งหรือเป็นสารแขวนลอยในของเหลวก็ได้ เมื่ออนุภาคกระทบที่พื้นผิวอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบพลาสติก หรืออาจทำให้วัสดุถูกกำจัดไปบางส่วน วิธีนี้นิยมนำมาใช้ทำความสะอาดสิ่งปนเปื้อนแบบหยาบที่พื้นผิว และใช้ในขั้นตอนสุดท้าย (finishing) ของการผลิตส่วนประกอบที่เป็นโลหะ

วิธีแบบเดียวกันแต่มีความรุนแรงน้อยกว่าเรียกว่าชอต ฟินนิง (short peening) ถูกนำมาใช้ครั้งแรกเพื่อชักนำให้เกิดความเครียดกำลังอัด (compressive stress) ในเนื้อวัสดุ มีอนุภาคเซรามิกมากมายหลายขนาดที่นำมาใช้เป่าลงบนผิวไทเทเนียมเช่น อะลูมินา ซิลิกา และไทเทเนีย

ในการนำมาใช้ทางการแพทย์ นิยมใช้เทคนิคนี้เพื่อทำความสะอาดและทำให้รากเทียมมีผิวขรุขระ ขนาดของอนุภาคเป็นปัจจัยที่สำคัญระหว่างทำการเป่า อนุภาคที่เป่าออกมาจะฝังอยู่ในเนื้อไทเทเนียม เช่นอะลูมินาที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 20-75 ไมครอนทำให้เกิดพื้นผิวที่มีความขรุขระ 0.5-1.5 ไมครอน ขณะที่ถ้าใช้อนุภาคขนาดเฉลี่ย 200-600 ไมครอน จะให้พื้นผิวที่มีความขรุขระ 2-6 ไมครอน โดยทั่วไปแล้วการเป่าด้วยกรวดหรือทรายนี้จะให้พื้นผิวที่มีลักษณะคมต่างจากวิธีชอต ฟินนิงซึ่งจะให้พื้นผิวที่มีความเรียบและมนกว่า นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีที่พื้นผิวเช่นการเป่าอนุภาคไฮดรอกซีอะพาไทด์ เป็นต้น วิธีการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง คาดกันว่าพื้นผิวที่ได้จะมีไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีความบาง (น้อยกว่า 10 นาโนเมตร) ซึ่งคล้ายกับออกไซด์ที่พื้นผิว

### วิธีที่ 2 วิธีทางเคมี

#### ก) การทำความสะอาดด้วยตัวทำละลาย (Solvent cleaning)

วัตถุประสงค์หลักคือเพื่อกำจัดน้ำมัน , ไขมันบริเวณพื้นผิวที่ตกค้างอยู่หลังกระบวนการผลิต การเลือกชนิดของตัวทำละลายควรเลือกตามความเหมาะสมกับวัสดุและชนิดของสิ่งปนเปื้อน

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำความสะอาดสามารถทำได้โดยเพิ่มอุณหภูมิของตัวทำละลายหรือใช้เครื่องสั่นเหนือเสียง (ultrasonic agitation) แต่สำหรับรากเทียมไทเทเนียมแล้วพบว่าการใช้วิธีนี้จะมีผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีที่พื้นผิวชั้นนอกสุด แม้ว่าจะทำความสะอาดด้วยความระมัดระวังแล้วก็ตาม จากการวิเคราะห์พื้นผิวด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์จะพบธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่านอกจากตัวทำละลายจะกำจัดสิ่งปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวแล้วยังจะทิ้งสิ่งตกค้างจำพวกคาร์บอนไว้ด้วย

### ข) การกัดด้วยกระบวนการทางเคมี (Wet chemical etching)

เพื่อละลายชั้นพื้นผิวดังเดิมออกทั้งส่วนที่เป็นออกไซด์และโลหะข้างใต้และทำให้เกิดพื้นผิวที่ขรุขระสำหรับไทเทเนียมที่นำมาใช้ทางการแพทย์ ด้วยความมีเสถียรภาพของไทเทเนียมไดออกไซด์ทำให้มีกรดและด่างเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ได้

**การกัดด้วยกรด (พิกลิงค์)** สารละลายที่นิยมนำมาใช้ในการกัดพื้นผิวโลหะไทเทเนียมและไทเทเนียมอัลลอยด์คือ

- สารละลายกรดไนตริก ( $\text{HNO}_3$ ) ร้อยละ 10 ถึง 30 โดยปริมาตรและสารละลายกรดไฮโดรฟลูออริก ( $\text{HF}$ ) ร้อยละ 1 ถึง 3 โดยปริมาตรในน้ำกลั่น โดยกรดไฮโดรฟลูออริกจะจับกับไทเทเนียมไดออกไซด์ และทำปฏิกิริยากับโลหะไทเทเนียมข้างใต้ เกิดเป็นไทเทเนียมฟลูออไรด์ที่ละลายน้ำได้และก๊าซไฮโดรเจน การดูดซึ่มก๊าซไฮโดรเจนของไทเทเนียมทำให้พื้นผิวมีความเปราะ อัตราส่วนระหว่างกรดไนตริกต่อกรดไฮโดรฟลูออริกที่เหมาะสมคือ 10:1 เพื่อลดการเกิดไฮโดรเจนอิสระ
- กรดไฮโดรคลอริก ( $\text{HCl}$ ) 100 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก 100 มิลลิลิตร ความสามารถในการกัดด้วยกรดขึ้นกับความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ ปกติหลังจากกัดด้วยกรดจะทำให้เกิดชั้นออกไซด์บางๆ ที่พื้นผิว (น้อยกว่า 10 นาโนเมตร) องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ และจะพบสารตกค้างเสมอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟลูออรีนและไฮโดรเจนที่ชั้นไดออกไซด์ซึ่งจะยังคงค้างอยู่แม้จะผ่านกระบวนการจัดการด้วยความร้อนหลังการกัดด้วยกรดก็ตาม

### การกัดด้วยด่าง

การกัดพื้นผิวไทเทเนียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 4-5 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทำให้พื้นผิวมีชั้นเจลโซเดียมไททานเตหนา 1 ไมครอน มีกายวิภาคเฉพาะส่วนที่ไม่สม่ำเสมอ (irregular topography) มีรูพรุนระดับน้อยกว่า

ไมครอนอยู่เป็นจำนวนมาก จากการทดลองของ Wen และคณะปี 1998 โดยการต้มสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมงพบว่าทำให้เกิดหลุมขนาดระดับนาโนเมตรที่พื้นผิว และมีองค์ประกอบที่พื้นผิวที่เชื่อว่าเป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ พบว่าถ้าใช้กรดไฮโดรคลอริก/ซัลฟิวริก กัดก่อนทำการกัดด้วยต่างจะทำให้มีปริมาณรูพรุนมากขึ้น

### ค) การทำแพสซีเวชัน

ใช้เพื่อทำให้เกิดการออกซิไดส์พื้นผิวอย่างสม่ำเสมอ สำหรับเครื่องมือทางการแพทย์นิยมใช้วิธีนี้ในการปรับปรุงความต้านทานการกัดกร่อน (โดยการลดการปล่อยประจุ) ในกรณีโลหะไทเทเนียม กระบวนการแพสซีเวชันทำให้เกิดชั้นออกไซด์ฟิล์มที่มีเสถียรภาพ

การแพสซีเวชันด้วยกรดไนตริก (Nitric acid passivation) โดยทั่วไปนิยมแช่ในกรดที่มีความสามารถในการออกซิไดส์สูง สำหรับไทเทเนียมคือแช่ในสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 20 ถึง 40 โดยปริมาตร เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นพื้นผิวจะถูกทำให้เป็นกลาง ล้างและทำให้แห้ง โดยกระบวนการแพสซีเวชันโดยกรดไนตริกจะไม่มีผลกระทบต่อกายวิภาคเฉพาะส่วนที่พื้นผิวของไทเทเนียม พบว่ามีชั้นออกไซด์หนา 2-6 ไมครอนปกคลุม องค์ประกอบหลักคือไทเทเนียมไดออกไซด์ มีการศึกษาและพบว่าได้กว่าชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์ลงไปบริเวณรอยต่อระหว่างโลหะและชั้นออกไซด์ พบออกไซด์ชนิดอื่นปะปนอยู่เล็กน้อย ได้แก่ ไทเทเนียมไตรออกไซด์ ( $Ti_2O_3$ ) และไทเทเนียมโมโนออกไซด์ (TiO)

และเนื่องจากการทดลองเพื่อศึกษาโครงสร้างผลึกของออกไซด์ฟิล์มนี้ทำได้ยาก จึงยังไม่มีหลักฐานที่น่าเชื่อถือเกี่ยวกับคุณสมบัติของออกไซด์ฟิล์มบนไทเทเนียม แม้จะมีรายงานว่า เป็นชนิดอะนาเทสและรูไทท์ก็ตาม มีการศึกษาที่น่าสนใจพบว่าด้วยกระบวนการนี้ทำให้เกิดการปล่อยธาตุไทเทเนียม, อะลูมิเนียมและวานาเดียมออกจากโลหะผสม Ti-6Al-4V มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นผิวที่ไม่ผ่านกระบวนการแพสซีเวชัน แต่ไม่พบความแตกต่างนี้ในโลหะไทเทเนียมบริสุทธิ์

### วิธีที่ 3 ไฟฟ้าเคมี (Electrochemical methods)

อาศัยหลักของความแตกต่างของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นบริเวณขั้วอิเล็กโทรดในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยนำชิ้นงานที่ต้องการผ่านกระบวนการวางไว้ที่ขั้วแอโนด เมื่อให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านวงจรเกิดการออกซิเดชันและรีดักชันที่อิเล็กโทรด จะเกิดมีการแลกเปลี่ยนประจุผ่านอิเล็กโทรไลต์ มีวิธีการหลักๆ อยู่ 2 แบบคือ

### ก) การขัดด้วยกระแสไฟฟ้า (Electropolishing)

ปกติแล้วทางอุตสาหกรรมใช้ในการขัดโลหะชั้นตอนสุดท้าย สำหรับโลหะไทเทเนียมแล้วหลังจากกระบวนการนี้พื้นผิวจะมีลักษณะคล้ายกระจก คือเรียบ มีการสะท้อนแสง มีค่าความขรุขระพื้นผิว (Ra) น้อยกว่า 10 นาโนเมตร ชั้นออกไซด์ที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีความบาง (น้อยกว่า 5 นาโนเมตร) ประกอบด้วย ไทเทเนียมไดออกไซด์เป็นหลัก แต่มักพบสารอิเลกโทรไลต์ตกค้าง ชนิดคลอไรด์<sup>(68)</sup> และการดูดซับสารอินทรีย์ที่พื้นผิว

พื้นผิวที่ผ่านกระบวนการจะมีลักษณะเรียบ มีความสม่ำเสมอเป็นแบบแผนเดียวกัน จึงเหมาะจะนำมาใช้เป็นพื้นผิวควบคุมในการศึกษาอิทธิพลของความขรุขระพื้นผิวต่อพฤติกรรมของเซลล์หรือการตอบสนองของเนื้อเยื่อ

### ข) การชุบอะโนไดซ์ (Anodic Oxidation, Anodizing)

สำหรับไทเทเนียม ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติการเชื่อมยึด (adhesive bonding) เพื่อเพิ่มความหนาของออกไซด์ และเพื่อเพิ่มความสามารถในการต้านทานการกัดกร่อนและลดการปล่อยประจุ การเปลี่ยนสีและการเกิดรูพรุนของชั้นเคลือบโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของไทเทเนียมจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับศักย์ที่ขั้วบวก องค์ประกอบของสารละลายอิเลกโทรไลต์ อุณหภูมิและกระแสไฟฟ้า สารละลายกรดเจือจางหลายชนิด เช่น กรดซัลฟิวริก ฟอสฟอริก อะซิติก และอื่นๆ นิยมนำมาใช้เตรียมสำหรับการอะโนไดซ์ไทเทเนียม

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอกซเรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโตรสโคปี (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) พบว่าองค์ประกอบหลักของฟิล์มที่ได้คือ ไทเทเนียมไดออกไซด์ ความหนาของชั้นออกไซด์ส่งผลต่อความขั้วขั้วและโครงสร้างระดับไมครอนของทั้งไทเทเนียมและโลหะผสมไทเทเนียม โดยทั่วไปแล้วเมื่อความหนาของชั้นออกไซด์เพิ่มขึ้น ความขรุขระก็จะเพิ่มขึ้นด้วย

จากการศึกษาการหักเหแสงของฟิล์มแล้วพบว่ามีส่วนที่เป็นอสัณฐาน และบางส่วนเป็นผลึกและรูปแบบที่พบบ่อยคืออะนาเทสและรูไทล์ โดยบรูคไคท์พบน้อยกว่า

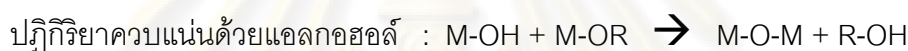
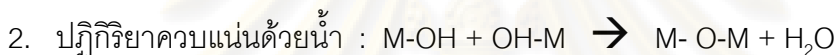
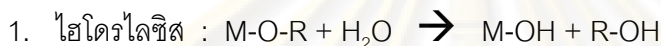
เป็นที่น่าสนใจว่ากายวิภาคเฉพาะส่วนของฟิล์มที่ได้มีทั้งลักษณะรูพรุนและขรุขระ แต่กลับไม่มีขอบคมเลย ซึ่งคล้ายกับการทำการเป่าด้วยทรายหรือกรวด รูพรุนเหล่านี้ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เช่นทดลองโดยการใส่ยาหรือสารบางอย่างเพื่อเตรียมให้เป็นพื้นผิวที่มีความว่องไวทางชีวภาพ ส่งเสริมให้เกิดการตกตะกอนของอะพาไทต์บนพื้นผิวออกไซด์



## 2.7 การเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยเทคโนโลยีโซลเจล

โซล-เจล เทคโนโลยีเป็นกระบวนการผลิตสารหรือวัสดุที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวหรือต้องการความบริสุทธิ์สูง สามารถนำมาผลิตเช่น เมทัลลิกออกไซด์กระจกใส ไบโอเซรามิกส์ และพื้นผิวคล้ายไบโอแอคทีฟไทเทเนีย<sup>(4, 17)</sup>

โดยทั่วไปกระบวนการโซลเจลจะเป็นการเปลี่ยนสถานะสารละลายจากของเหลวที่เรียกว่า “โซล” ซึ่งส่วนมากอยู่ในรูปของสารละลายแขวนลอย ไปเป็นของแข็งที่เรียกว่า “เจล” ปฏิกริยาที่สำคัญในกระบวนการมี 2 ปฏิกริยา คือ ไฮโดรไลซิส หรือ การใช้น้ำเพื่อตัดพันธะเคมีของสาร และปฏิกริยาควบแน่นด้วยน้ำหรือแอลกอฮอล์ ซึ่งจะเกิดเมื่อมีไฮดรอกไซด์ของโลหะ 2 โมเลกุลมารวมตัวกัน เกิดเป็นออกไซด์ของโลหะและน้ำหรือแอลกอฮอล์อีก 1 โมเลกุล ดังนี้

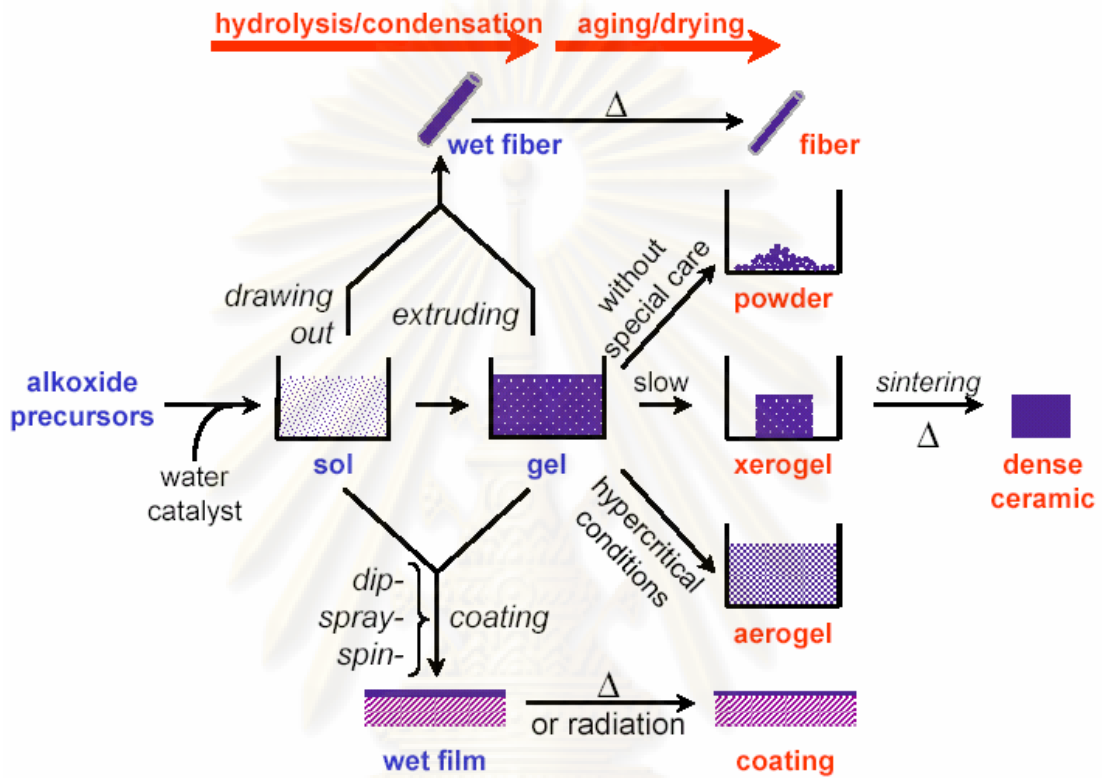


เมื่อ M แทนโลหะได้แก่ ซิลิกอน(Si) เซอโคเนียม(Zr) ไทเทเนียม(Ti) อะลูมิเนียม(Al) ดีบุก(Sn) ซีลีเนียม<sup>(69)</sup> OR แทนหมู่อัลคอกซิล (Alkoxy group) และ OH แทนหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl)

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของฟิล์มและอัตราการเกิดปฏิกริยา ได้แก่ความเป็นกรด-ด่าง (ถ้ามีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 2-4 พื้นผิวจะมีประจุบวก สามารถเชื่อมกับพื้นผิวด้วยพันธะทางไฟฟ้า) ตัวเร่งปฏิกริยา อัตราส่วนโมลของน้ำและโลหะ ชนิดของโลหะ และอุณหภูมิในการแคลไซน์ ดังนั้นการควบคุมปัจจัยเหล่านี้ในสภาวะที่ต่างกัน จะทำให้โซลและเจลที่ได้มีสมบัติและโครงสร้างต่างกัน จากการศึกษาของ Piveteau<sup>(2)</sup> รายงานว่า เมื่อทำการเผาหรือแคลไซน์ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนโลหะไทเทเนียมที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มจะมีลักษณะมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 650 องศาเซลเซียส พบไทเทเนียมไดออกไซด์ชนิดอนาเทสเกิดขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 850 องศาเซลเซียส จึงพบไทเทเนียมไดออกไซด์ชนิดรูไทล์ และเป็นที่น่าสังเกตว่าไทเทเนียมไดออกไซด์ชนิดรูไทล์จะสัมพันธ์กับการเกิดออกซิเดชันโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Thermal oxidation) ของชั้นโลหะข้างใต้ ยืนยันได้จาก การนำผงที่ได้จากสารละลายโซลไปวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ จะไม่สามารถพบไทเทเนียมไดออกไซด์ชนิดรูไทล์ได้เลย

โดยทั่วไปการขึ้นรูปฟิล์มด้วยวิธีโซลเจลทำได้หลายวิธี เช่น การสปินโคท (spin coating) การจุ่ม การพ่น และอาจใช้การขึ้นรูปโดยอิทธิพลของสนามไฟฟ้า (electrophoresis) อย่างไรก็ตามวิธีที่ได้รับความนิยมมากกว่า คือ การสปินโคท และการจุ่ม แต่การสปินโคทมีความยุ่งยากกว่า และเหมาะกับชิ้นงานที่เป็นพื้นผิวเรียบเท่านั้น<sup>(1)</sup>

ในกระบวนการผลิต เมื่อเข้าสู่กระบวนการทำให้แห้งจะได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น เส้นใย(fiber) แอโรเจล(aerogel) ซีโรเจล(xerogel) ผง(powder) และฟิล์มเคลือบ (coating film) เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมอื่นต่อไป ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงกระบวนการโซลเจล<sup>(70)</sup>

ข้อดีของวิธีโซลเจล มีรายงานไว้มากมาย เช่น

- ใช้สำหรับผลิตสารหรือวัสดุที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวหรือต้องการความบริสุทธิ์สูง มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากการเตรียมสารหรือวัสดุในระดับโมเลกุล ทำให้สามารถกำหนดสมบัติต่างๆที่ต้องการได้ง่าย
- เป็นเทคโนโลยีการผลิตที่ทำได้ที่อุณหภูมิห้อง ไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงซึ่งอาจส่งผลเสียต่อ คุณสมบัติทางกลทางชิ้นงาน หรือส่งผลเสียต่อชั้นเคลือบ เช่น มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก ทำให้เกิดการละลายตัวเพิ่มขึ้น หรือมีความคงตัวลดลง เป็นต้น
- ทำได้ง่าย และเร็ว
- เครื่องมือไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพง

- สามารถทำการเคลือบชิ้นงานได้ตั้งแต่ชิ้นงานที่มีพื้นที่เล็กจนถึงใหญ่ หรือที่มีรูปร่างซับซ้อนก็ตาม<sup>(20)</sup>
- ออกไซด์ฟิล์มที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน มีความสม่ำเสมอของพื้นผิว
- ภายใต้การควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม จะได้ชั้นออกไซด์ของโลหะที่มีความหนาในระดับนาโนเมตรเท่านั้น<sup>(13, 27)</sup>
- สามารถทำซ้ำเพื่อให้เกิดชั้น ออกไซด์ที่หนาขึ้นได้
- ฟิล์มที่เตรียมได้มีความว่องไวทางชีวภาพมากกว่าที่เตรียมโดยวิธีอื่น<sup>(4, 17)</sup> เนื่องจาก บนพื้นผิวเต็มไปด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากมายเป็นส่วนใหญ่ พื้นผิวจึงมีลักษณะสามารถทำให้เปียกได้ง่าย มีพลังงานระหว่างผิวหน้าเพิ่มขึ้น และมีพื้นผิวที่มีลักษณะชอบน้ำ ซึ่งช่วยสนับสนุนการดูดซับไฟโบรเนกตินและไวโทรเนกติน ซึ่งเป็นโปรตีนในเลือดที่มีคุณสมบัติเหนียว ทำให้มีความว่องไวทางชีวภาพ<sup>(4, 14, 15)</sup> คือสามารถเกิดการดูดซับโปรตีน และเกิดการยึดติดของเซลล์ได้มากกว่าไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมได้จากวิธีอื่นเช่นการทำแพสซีเวชันด้วยกรดไนตริก<sup>(17)</sup> สบัตเตอริง และพลาสมาสเปรย์<sup>(20)</sup> เป็นต้น
- วิธีโซลเจลนั้นสามารถผลิตฟิล์มที่มีความบางและมีความขรุขระพื้นผิวระดับนาโนเมตรได้ และเนื่องจากขั้นตอนเตรียมสารไม่ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงมากในการเกิดปฏิกิริยา ฟิล์มที่ได้มีลักษณะบาง จึงมีความแข็งแรงยึดสูงกับผิวรากเทียมมีความว่องไวทางชีวภาพที่ดี และไม่เกิดการฉีกขาดจากพื้นผิวของโลหะไทเทเนียม ซึ่งแตกต่างจากวิธีพลาสมาสเปรย์<sup>(22-24)</sup>
- ข้อจำกัดเพียงข้อเดียวของกระบวนการโซล-เจล คือต้องมีการผ่านกระบวนการทางความร้อนเพื่อกำจัดหมู่ไฮดรอกซิล และสารประกอบอินทรีย์ ทำให้สามารถเคลือบได้เฉพาะชิ้นงานที่ทนต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงได้เท่านั้น<sup>(26)</sup>

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ชั้นโทเทเนียมไดออกไซด์

#### 3.2 กลุ่มตัวอย่างวิจัย

แบ่งกระจกสไลด์เป็น 2 กลุ่ม

1. กลุ่มควบคุม คือ กระจกสไลด์ที่ไม่ได้เคลือบด้วยโทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมโดยวิธีโซลเจล
2. กลุ่มทดลอง คือ กระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยโทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมโดยวิธีโซลเจล

#### 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1. กระจกสไลด์ยี่ห้อซูพีเรีย และกล่องเก็บ
2. ที่ตัดกระจกชนิดปลายกากเพชร
3. สารละลายไฮโดรเจนเพอออกไซด์
4. สารละลายกรดซัลฟิวริก
5. สารละลายโทเทเนียมบิวทอกไซด์
6. สารละลายเอทานอล
7. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก
8. สารละลายอะซีติลอะซีโตน
9. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%MEM , Antibiotics , L-glutamine , FBS
10. จานเลี้ยงเซลล์
11. สารละลายเอ็มทีที
12. สารละลายดีเอ็มเอสโอ
13. สารละลายกลูตาอราลดีไฮด์
14. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) , น้ำกลั่น
15. สารละลายพีบีเอส (PBS)
16. สารละลายอัลคาไลน์ไลซิสบัฟเฟอร์
17. สารละลายพีเอ็นพีและอะมิโนโพรพานอล

18. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
19. สารละลายบีซีเอ

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

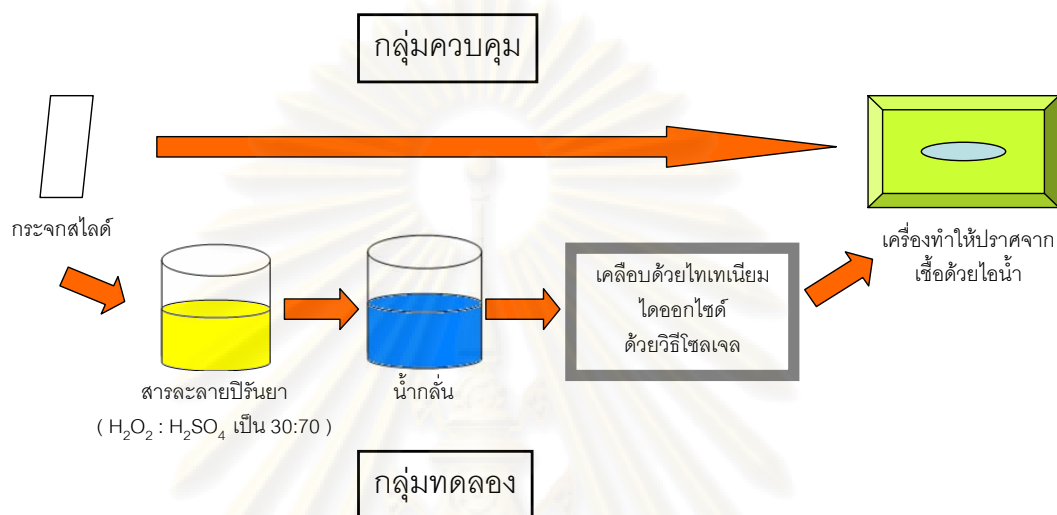
1. ปีกเกอร์
2. หลอดผสมสาร
3. แท่งแก้วสำหรับคน
4. เครื่องจุ่ม ( Dipping machine )
5. เครื่องทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
6. เตาเผา (Oven) เพื่อทำการแคลซิเนชัน
7. เครื่องผสมสาร ( stirrer )
8. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope JSM-6400,Tokyo,Japan)
9. เครื่องมือวิเคราะห์ธาตุด้วยรังสีเอ็กซ์ (X-ray Diffractometry,XRD)
10. เครื่องวัดความหยาบพื้นผิว (Profilometer )
11. กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม ( Atomic force microscope , AFM)
12. ตู้อบสำหรับเลี้ยงเซลล์
13. ปีกเกอร์ขนาด 50,100,500 มิลลิลิตร และกระบอกรวดขนาด 10,100 มิลลิลิตร
14. ไมโครปิเปตอัตโนมัติ (automatic micropipette,P 10 pipetman ,Gilson Medical Electronics France) ขนาด 1 มิลลิลิตร
15. ตู้แช่แข็ง

### 3.4 การดำเนินการวิจัย

#### 3.4.1 เตรียมกลุ่มตัวอย่างวิจัย

นำกระจกสไลด์ไปแช่ในสารละลายปิรันยา<sup>(17, 54)</sup> ซึ่งเป็นสารละลายผสมระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดซัลฟิวริกในอัตราส่วน 30:70 เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำความสะอาดและเพื่อให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิลใหม่บนพื้นผิว จากนั้นล้างกระจกสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปทดลองเคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เตรียมโดยวิธีโซลเจล

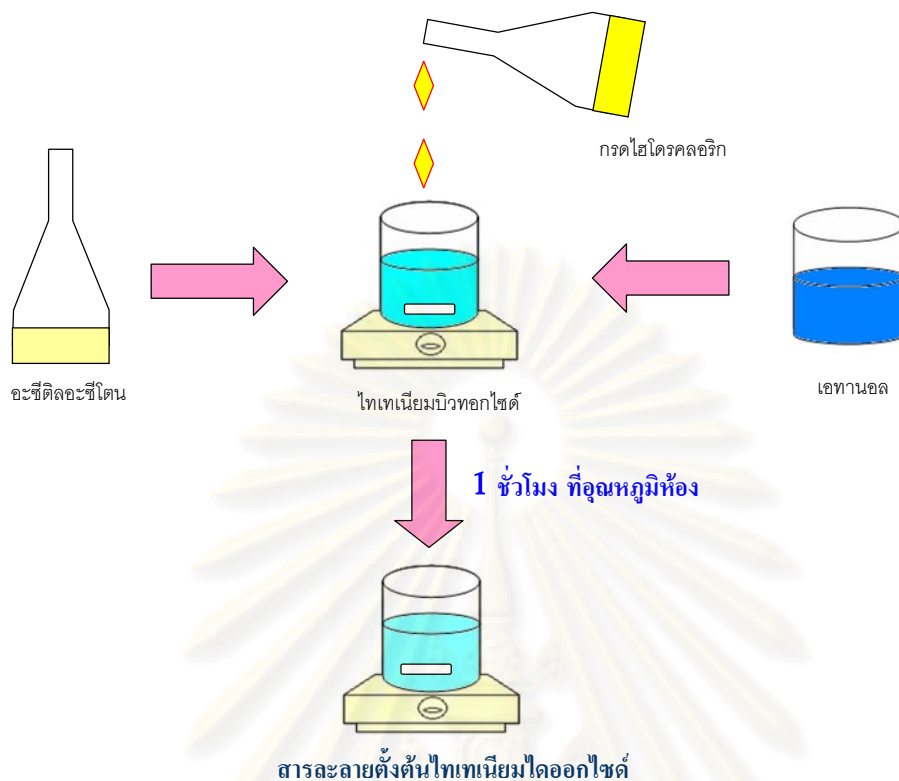
ต่อไป โดยชิ้นงานทั้ง 2 กลุ่มต้องถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีอบด้วยไอน้ำ (Autoclave) ก่อนนำไปทำการทดลองดังแผนภาพรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการเตรียมตัวอย่างชิ้นงานก่อนทำการทดลอง

### 3.4.2 เตรียมสารละลายโซล

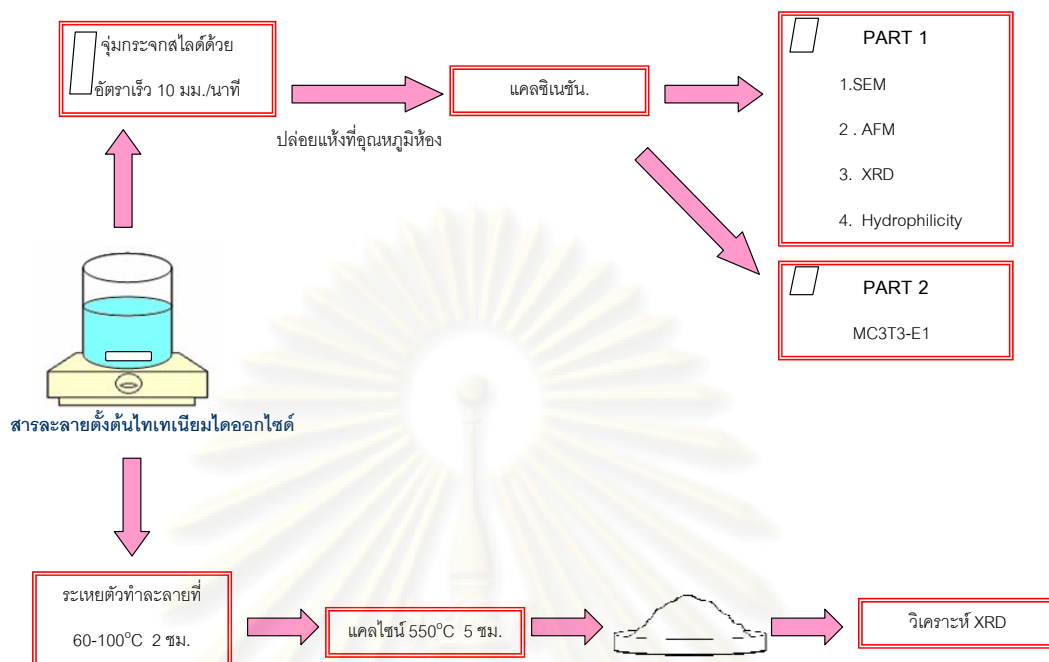
ผสมสารละลายไทเทเนียมบิวทอกไซด์ ( $Ti(OC_4H_9)_4$ ) ซึ่งใช้เป็นแหล่งของไทเทเนียมไดออกไซด์ กับสารละลายเอทานอล ( $C_2H_5OH$ ) ซึ่งช่วยให้ฟิล์มมีความเรียบ และลดการรบกวนตัวของฟิล์ม และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไทเทเนียมบิวทอกไซด์ และสารละลายอะซีติลอะซีโตน ( $CH_3COCH_3$ ) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวคงสภาพฟิล์ม ตามวิธีของ Pongpom S.<sup>(71)</sup> โดยมีอัตราส่วนโมลดังนี้ 1 : 30 : 0.5 : 1 จะได้สารละลายสีเหลืองใส จากนั้นปล่อยให้สารละลายผสมกันในเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ดังรูป



รูปที่ 4 แสดงการเตรียมสารละลายโซล (สารละลายตั้งต้นไทเทเนียมไดออกไซด์) ที่มีอัตราส่วนโมลเป็น  $1\text{TiO}_4\text{C}_{16}\text{H}_{36} : 30\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : 0.5\text{HCl} : 1\text{CH}_3\text{COCH}_3$

### 3.4.3 เคลือบกระจกสไลด์ด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีโซลเจล

นำกระจกสไลด์ที่ผ่านการแช่สารละลายปรีนยาและปล่อยให้แห้ง มาทำการยึดกับเครื่องจุ่ม และทำการจุ่มกระจกสไลด์ในสารละลายโซลที่เตรียมไว้ ณ อุณหภูมิห้องโดยใช้อัตราเร็วในการจุ่มเป็น 10 มิลลิเมตร/นาที หลังจากปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิห้อง นำชิ้นงานไปผ่านกระบวนการแคลซิเนชันเพื่อเปลี่ยนระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation state) โดยเข้าเตาเผา ให้ความร้อนที่มีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 2 องศาเซลเซียสต่ออนาที จนมีอุณหภูมิถึง 550 องศาเซลเซียสตามวิธีของ Phuphattarakul S.<sup>(72)</sup> คงอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงด้วยอัตราที่เท่ากันจนถึงอุณหภูมิห้อง จะได้กระจกสไลด์ที่มีไทเทเนียมไดออกไซด์เคลือบอยู่ที่ผิว



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการทดลอง เพื่อทดสอบลักษณะต่างๆของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้ และเพื่อศึกษาการยึดติดและแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกชนิดเอ็มซี3ที3-อี1

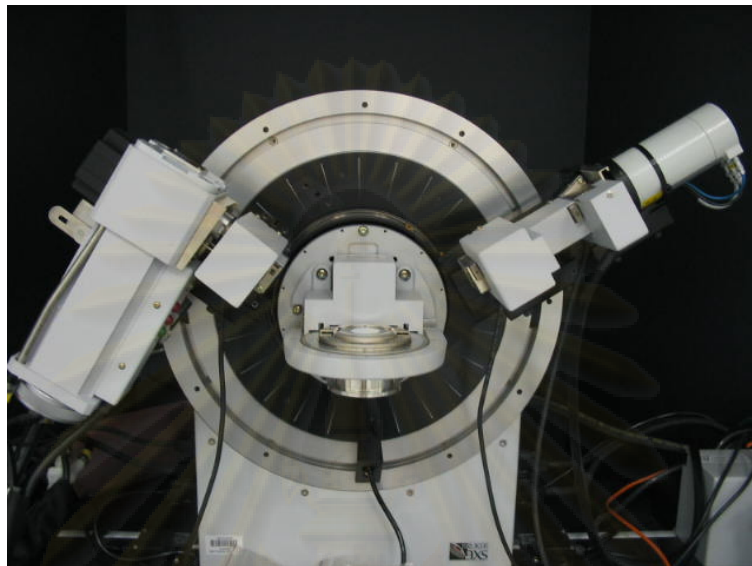
### 3.4.4 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้

#### 3.4.4.1 วิเคราะห์โครงสร้างผลึกไทเทเนียมไดออกไซด์ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray Diffraction ; XRD)

นำกระจกใสที่มีไทเทเนียมไดออกไซด์เคลือบอยู่ที่ผิว ไปวิเคราะห์วิฤภาคของผลึก (crystal phase) และโครงสร้างผลึกของฟิล์มด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ โดยใช้เครื่อง Bruker AXS Model D8 Discover บันทึกสเปกตรัมโดยใช้รังสีคอปเปอร์ เค แอลฟา (Cu K $\alpha$ ) เท่ากับ 1.54 อังสตรอม (40kV,40mA) ทำการวัดทุกๆ 0.02 องศา (step size=0.02) ในช่วงระหว่าง 20-80 องศา อัตราเร็วในการวัดเป็น 0.4 วินาที/ขั้น (0.4 sec/step) และนำสารละลายโซลที่เหลือจากการจุ่มกระจกใสเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 60 ถึง 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อระเหยตัวทำละลายออกจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 550 องศาเซลเซียส เป็น



เวลา 5 ชั่วโมง สารละลายโซลจะแปรสภาพเป็นผง จากนั้นทำการบดผงและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือและเทคนิคเดียวกันกับฟิล์ม



รูปที่ 6 แสดงเครื่องวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์

3.4.4.2 ทดสอบความหนาและลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (Atomic force spectroscopy : AFM)

ศึกษาลักษณะพื้นผิวจากภาพสามมิติ และวัดความหยาบเฉลี่ยด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม รุ่นนาโนสโคปรุ่นที่สี่ มัลติโหมด (NanoscopeIV, Multimode) โดยใช้โพรบวัดชนิดซิลิกอน (silicon probe) โหมดกึ่งสัมผัส (tapping mode)

ทดสอบความหนาโดย ชูดฟิล์มไทเทเนียมไดออกไซด์บนกระจกสไลด์ในแนวตั้งฉากด้วยเหล็กปลายแหลม จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม โดยใช้โพรบวัดชนิดเดิม เพื่อวัดระดับความสูงที่แตกต่างกันระหว่างผิวกระจก และส่วนบนของฟิล์ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม รุ่นนาโนสโคปรุ่นที่สี่

#### 3.4.4.3 ทดสอบความชอบน้ำ (Hydrophilicity)

เก็บกระจกสไลด์ และกระจกสไลด์เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาทีก่อนทำการวัดเพื่อเป็นมาตรฐาน เมื่อครบเวลาใช้กระบอกฉีด (syringe) หยดน้ำไร้ประจุ (deionized water) 10 ไมโครลิตร ในแนวตั้งจากลงบนกระจกสไลด์ และกระจกสไลด์เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ โดยไม่ให้ถูกสัมผัสโดยมือ วัดค่ามุมสัมผัสที่คงตัว (static contact angle) โดยใช้เครื่อง Kruss , model DSA10 ทำการวัดซ้ำ 10 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

#### 3.4.5 การทดสอบกับเซลล์

##### 3.4.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลือกใช้เซลล์เอ็มซี3ที3อี1 (MC3T3-E1) ซึ่งเป็นเซลล์ปฐมภูมิจากกระดูกซี่โครงของหนู เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ 10%เอ็มอีเอ็ม (HyQ® MEM/EBSS, Hycone, Logan Utah, USA) 10%เฟบปีเอส (fetal bovine serum; FBS, ICP biologicals, Handerson, Auckland, New Zeland) แอล-กลูตามีน(L-glutamine) 2 มิลลิโมลาร์ และยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เพนนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

และแอมโฟเทอรีซิน บี 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Gibco, Grand Island, New York, USA) โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน (ตู้บที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละร้อย และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 )เมื่อเซลล์บนจานเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:5 (หว่านเซลล์ 1 ใน 5 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) ด้วยวิธีทริปซิน (Trypsinization) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวันเว้นวัน

#### 3.4.5.2 ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl tetrazolium bromide)

ถ่ายเซลล์ MC3T3-E1 ที่มีความหนาแน่น 40,000 เซลล์/หลุม/มิลลิลิตร ลงบน กระดาษไลต์ที่เคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มขนาด 20x26 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชั้น และ กระดาษไลต์ที่ไม่ได้ทำการเคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มขนาดเท่ากัน จำนวน 3 ชั้น ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well plate) เลี้ยงในตู้บสภาวะมาตรฐาน เป็นเวลา 30 นาที 1 4 และ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ใส่สารละลายเอ็มทีที (MTT solution; USB Corporation, Cleveland, OH, USA) ที่ได้จากการเจือจางสารเอ็มทีที 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 10% อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดซีรัมที่ไม่มีฟินอลเรด จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บเป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายเอ็มทีทีออก แล้วใส่สารละลายที่เตรียมได้จากการผสมไกลซีนบัฟเฟอร์ (PH=10) และดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) เป็นอัตราส่วน 125:900 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายสีน้ำเงินซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาของฟอร์มazan จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าความเข้มแสงสำหรับเอ็มทีทีที่ 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermospectronic Genesis 10 UV-vis spectro photometer) ทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง

#### 3.4.5.3 ศึกษารูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์กับไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope ; JEOL JSM-5410 LV Scanning Microscope)

ถ่ายเซลล์ MC3T3-E1 ที่มีความหนาแน่น 80,000 เซลล์/หลุม/มิลลิลิตร ลงบน กระดาษไลต์ที่เคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มขนาด 20x26 มิลลิเมตร จำนวน 1 ชั้น และ กระดาษไลต์ที่ไม่ได้ทำการเคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มขนาดเท่ากัน จำนวน 1 ชั้น ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well plate) เลี้ยงในตู้บสภาวะมาตรฐาน เป็นเวลา 1 และ 4 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการยึดเกาะขั้นต้น (initial attachment) และการแผ่ตัวของเซลล์ (spreading)

ตามลำดับ เมื่อครบเวลาอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออก จากนั้นล้างเอาเซลล์ที่ไม่ได้ยึดติดออก ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ แล้วตรึงเซลล์ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde in phosphate buffer) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ซึ่งได้จากการเจือจางกลูตารัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 (Fluka, Steinheim, Germany) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำให้ปราศจากน้ำ (dehydration) ด้วยวิธีดีเอ็มเอสโอซีรีส์ (DMSO series) โดยดูดกลูตารัลดีไฮด์ออก และแทนที่ด้วยดีเอ็มเอสโอร้อยละ 30 เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลาดูดดีเอ็มเอสโอร้อยละ 30 ออก แทนที่ด้วยดีเอ็มเอสโอร้อยละ 50, 70, 90 และร้อยละ 100 ตามลำดับ โดยแต่ละความเข้มข้นของดีเอ็มเอสโอใช้เวลา 2 นาที เมื่อครบฝังให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากแห้งแล้วนำไปผ่านการเคลือบผิวด้วยทองเพื่อศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด



รูปที่ 8 แสดงกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; JEOL JSM-5410 LV Scanning Microscope)

#### 3.4.5.4 ทดสอบการแปรสภาพของเซลล์โดยวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ถ่ายเซลล์ MC3T3-E1 ที่มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม/มิลลิเมตร ลงบน กระดาษโลดท์ที่เคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มขนาด 20x26 มิลลิเมตร จำนวน 2 ชั้น และ กระดาษโลดท์ที่ไม่ได้ทำการเคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มขนาดเท่ากัน จำนวน 2 ชั้น ในจาน

เลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well plate) เลี้ยงในตู้บสภาวะมาตรฐาน เป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกล้างด้วยสารละลายพีบีเอส (PBS) แล้วใส่สารละลายอัลคาไลน์ไทริสบัฟเฟอร์ (10mM Tris-HCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton-X100, pH 10) หลุมละ 1000 ไมโครลิตร จากนั้นทำการขูดเซลล์ (scrap) แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำมาวางที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้น้ำแข็งละลายจนหมด จะได้สารละลายที่มีเซลล์แขวนลอย (Extract cell solution) จากนั้นแบ่งสารละลายที่ได้เป็น 2 ส่วน เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยวัดปริมาณผลิตภัณฑ์เอแอลพี เปรียบเทียบกับปริมาณผลิตภัณฑ์โปรตีนทั้งหมดที่เซลล์สร้าง

#### 3.4.5.4.1 วัดปริมาณผลิตภัณฑ์เอแอลพี

แบ่งสารละลายเซลล์แขวนลอย 200 ไมโครลิตรใส่หลอดผสมขนาด 1.5 มิลลิลิตร เตรียมเอนไซม์เพื่อวัด เอแอลพี แอคทีวิตี โดยผสม พีเอ็นพีพี (p-nitrophenyl phosphate หรือ PNPP substrate; Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10 ไมโครลิตรต่อหลอดผสม เข้ากับสารละลาย 0.1M อะมิโนไพโรพานอลใน 2 มิลลิโมลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์ ( ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5) จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลอดผสม จากนั้นดูดเอนไซม์ใส่หลอดผสมจำนวน 110 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำเข้าในตู้บที่สภาวะมาตรฐาน เป็นเวลา 15 นาทีหรือจนกระทั่งสารละลายในหลอดผสมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเทียบกับหลอดควบคุม (Blank) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายไฮเดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 900 ไมโครลิตรต่อหลอดผสม นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าความเข้มแสงสำหรับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่ 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความเข้มแสงที่ได้กับโค้งมาตรฐาน จะทราบปริมาณของผลิตภัณฑ์เอแอลพีเป็นค่าในหน่วย ไมโครโมลาร์ต่อไมโครลิตร

#### 3.4.5.4.2 วัดปริมาณผลิตภัณฑ์โปรตีนทั้งหมด (Protein assay for ALP)

แบ่งสารละลายเซลล์แขวนลอย 100 ไมโครลิตรใส่หลอดผสมขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดบีซีเอ (a bicinchoninic acid; BCA<sup>TM</sup> Protein assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) จำนวน 1000 ไมโครลิตร ซึ่งได้จากการผสมสารเอ จำนวน 1000 ไมโครลิตรต่อหลอดผสม และสารบี จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อหลอดผสม เขย่าให้เข้ากันแล้วนำเข้าตู้บที่สภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 15 นาทีหรือจนกระทั่งสารละลายในหลอดผสมเปลี่ยนเป็นสีม่วงเมื่อเทียบกับหลอดควบคุม จากนั้นนำไปวัดค่าความเข้มแสงสำหรับโปรตีน ที่ 562 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความเข้มแสงที่ได้กับโค้งมาตรฐาน จะทราบปริมาณผลิตภัณฑ์โปรตีนทั้งหมดเป็นค่าในหน่วยไมโครโมลาร์ต่อไมโครลิตร

### 3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection)

- 3.5.1 การยึดติดของเซลล์ ได้จากภาพถ่ายที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด
- 3.5.2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต นับได้โดยเปรียบเทียบค่าความเข้มแสงสำหรับเอ็มทีทีที่ได้จากการทดลองเลี้ยงในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที 1 4 และ 8 ชั่วโมง กับโค้งมาตรฐานที่ได้จากการหว่านเซลล์ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์ที่เท่ากัน
- 3.5.3 การแปรสภาพของเซลล์ ใช้โปรแกรม Biosoft แปลงค่าความเข้มแสงให้เป็นค่าการวิเคราะห์ทางเคมี (assay) ในหน่วยไมโครโมลาร์ต่อไมโครลิตร โดยวัดค่าความเข้มแสงดังนี้
- 3.5.3.1 ค่าความเข้มแสงสำหรับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่ 410 นาโนเมตร
  - 3.5.3.2 ค่าความเข้มแสงสำหรับโปรตีน ที่ 562 นาโนเมตร
- คำนวณค่าเอนไซม์แอกทิวิตีที่เป็น ผลิตภัณฑ์เอนแอลพี(ไมล) ต่อปริมาณผลิตภัณฑ์โปรตีนทั้งหมด (ไมโครกรัม) / เวลา (นาที)

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Data Analysis)

ใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส สำหรับวินโดว์ รุ่นที่ 13.0 (SPSS version 13.0) ในการวิเคราะห์และสรุปผล โดยใช้วันแซมเปิล โคลโมโกรอฟ สเมอ์นอฟ (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) ทำการวิเคราะห์ประเภทของการแจกแจงข้อมูลก่อน

เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ เลือกใช้การทดสอบอินดีเพนเดนท์แซมเปิลทีเทส (Independent-Sample T Tests) และใช้การทดสอบลีวีเนส (Levene's Test) เพื่อทดสอบความแปรปรวนก่อนเลือกการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

กำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ในทุกการทดลอง

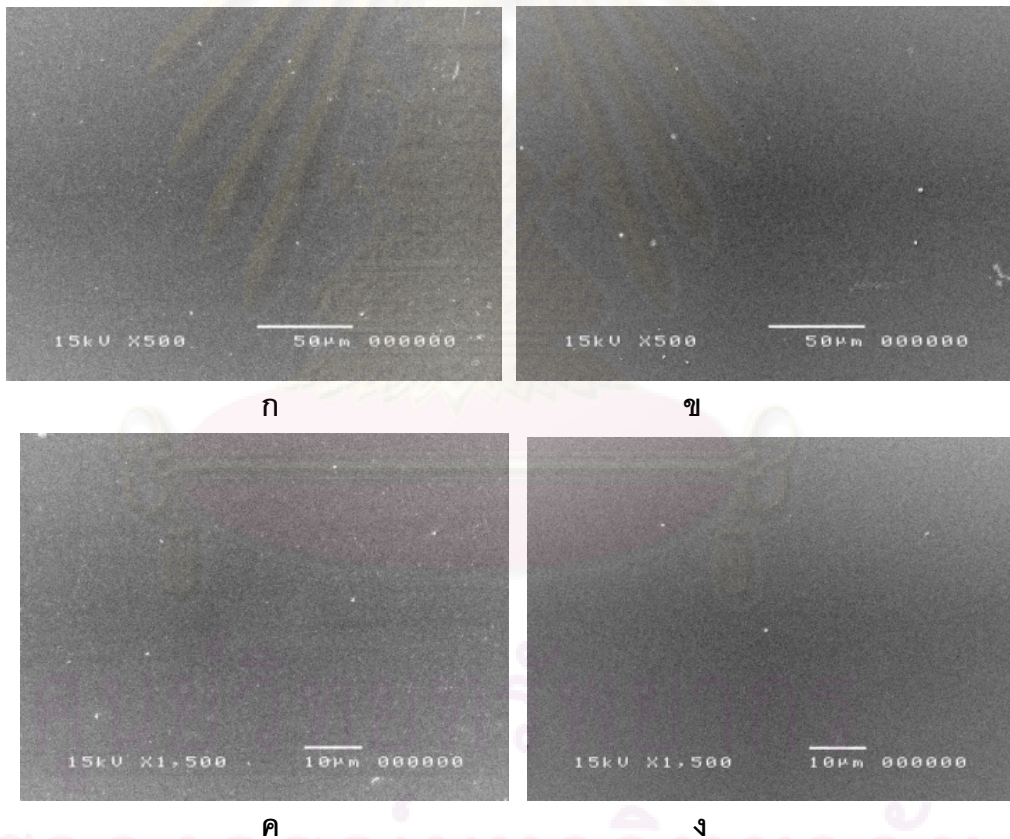
## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การทดสอบคุณลักษณะต่างๆของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้

##### 4.1.1 การตรวจสอบลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

แม้ว่าพื้นผิวของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มจะมีลักษณะเรียบกว่าเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนระหว่างพื้นผิวของกระจกใสและกระจกใสที่เคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มทั้งในเรื่องลักษณะกายวิภาค และความขรุขระพื้นผิว



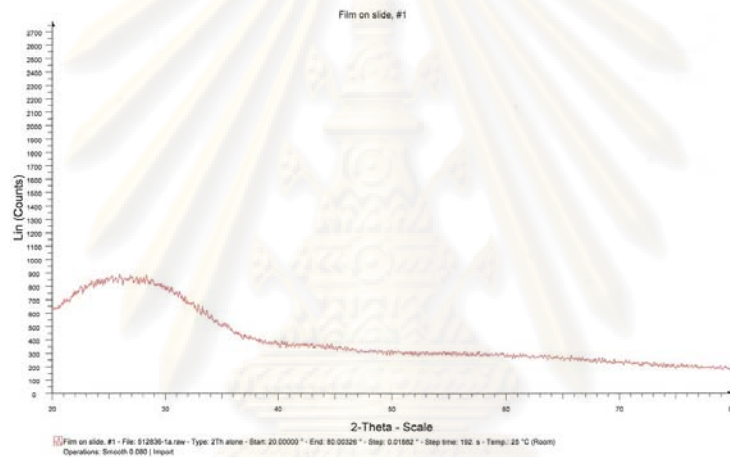
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 แสดงลักษณะพื้นผิวจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ก. แสดงพื้นผิวของกระจกใสกำลังขยาย 500 เท่า เปรียบเทียบกับ ข. พื้นผิวไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มกำลังขยาย 500 เท่า และ ค. แสดงพื้นผิวของกระจกใสกำลังขยาย 1,500 เท่า เปรียบเทียบกับ ง. พื้นผิวไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มกำลังขยาย 1,500 เท่า ตามลำดับ

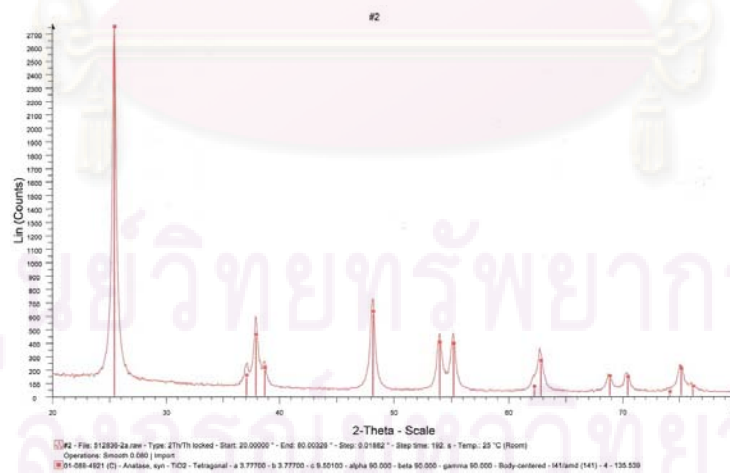
#### 4.1.2 การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์

เพื่อทดสอบความเป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ การศึกษาครั้งนี้ไม่พบรูปแบบของผลึกที่จำเพาะใดๆ เกิดขึ้นบนกระจกสไลด์ และกระจกสไลด์เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันถึงชนิดของสารละลายที่เตรียมได้ การศึกษาครั้งนี้ได้นำสารละลายซิลที่เหลือจากการจุ่มชิ้นงานไปทำให้แห้ง และแคลไซน์โดยใช้อุณหภูมิต่ำในการเผาเดียวกันกับชิ้นงาน จากนั้นนำไปบดเป็นผงเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างผลึก ผลพบว่า มีสเปกตรัมที่มุมสองเซตา ( $2\theta$ ) เท่ากับ 25.4, 37.04, 37.82, 38.61, 48.10, 53.97, 55.16, 62.2, 62.72, 68.76, 70.37, 75.09, 76.06 องศาตามลำดับ ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่บ่งชี้ว่า เป็นผลึกไทเทเนียมไดออกไซด์ชนิดอนาเทส ตรงตาม เจซีพีดีเอส ลำดับที่ 21-1272 (JCPDS 21-1272)

ก.



ข.



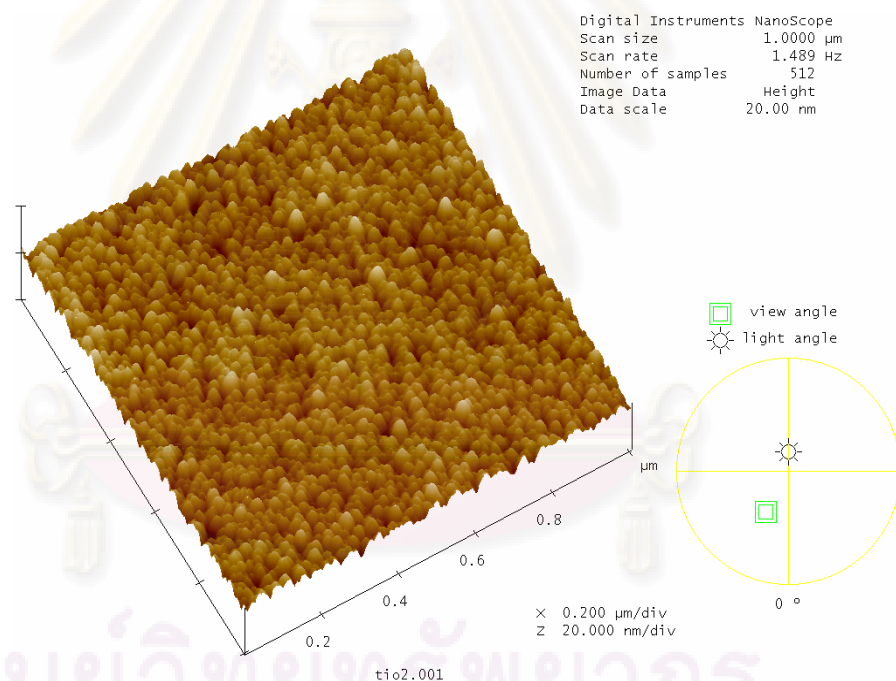
รูปที่ 10 แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ ก. กระจกสไลด์กลุ่มทดลองมีลักษณะอสัณฐาน ข. สเปกตรัมจากการวิเคราะห์ผงที่ได้จากสารละลายซิล แสดงความเป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ ชนิดอนาเทส



#### 4.1.3 การตรวจสอบลักษณะพื้นผิว ความขรุขระเฉลี่ยและความหนาฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม

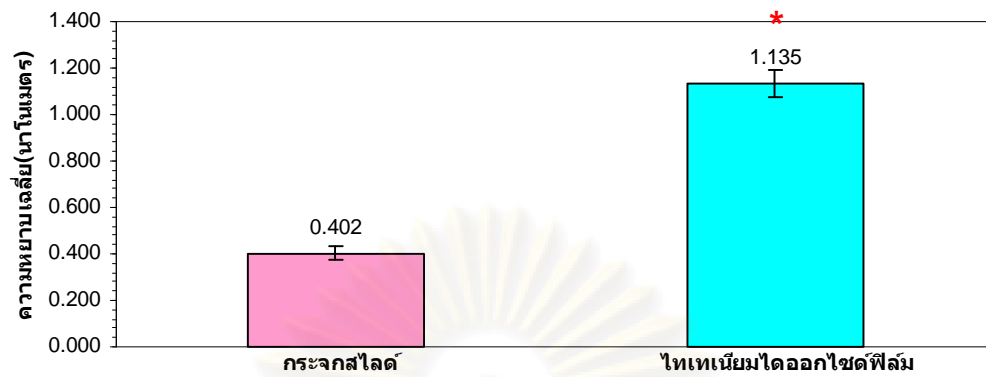
ผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม ยืนยันความแตกต่างระหว่างพื้นผิวของกระจกใสและไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม ภาพ 3 มิติแสดงให้เห็นลักษณะความเป็นอนุภาคที่มีขนาดใกล้เคียงกัน สม่ำเสมอ และเป็นเนื้อเดียวกันในทุกตำแหน่งบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม (รูปที่ 11) ในขณะที่บนกระจกใสไม่ปรากฏความเป็นอนุภาคใดเคลือบอยู่ (ไม่แสดงรูป)

วัดความหยาบเฉลี่ยของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มได้เท่ากับ  $1.135 \pm 0.061$  นาโนเมตร ความหยาบเฉลี่ยของกระจกใสได้เท่ากับ  $0.402 \pm 0.028$  นาโนเมตร (รูปที่ 12) วัดความหนาเฉลี่ยของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มได้เท่ากับ  $89.331 \pm 2.572$  นาโนเมตร (รูปที่ 13)

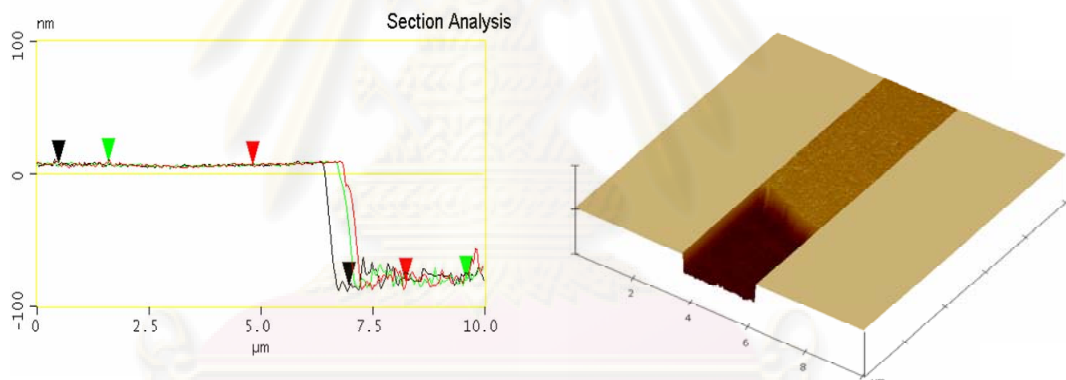


รูปที่ 11 แสดงลักษณะพื้นผิวแบบสามมิติของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



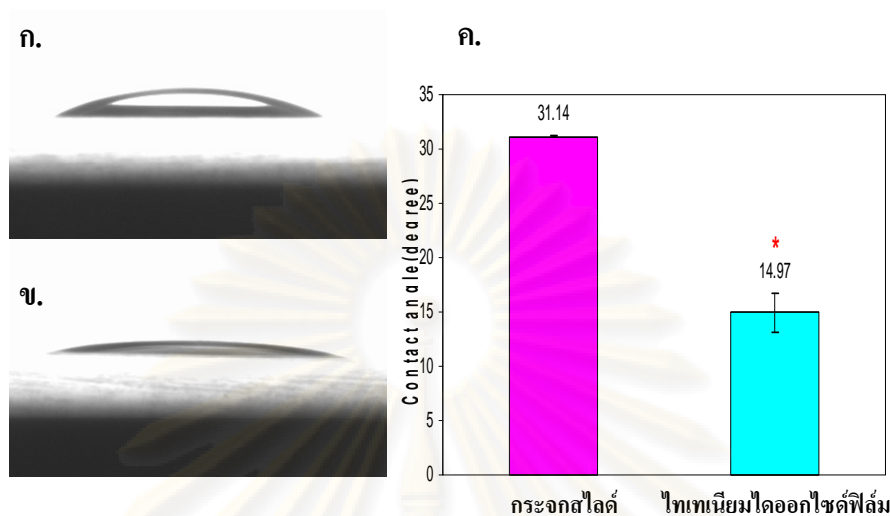
รูปที่ 12 ความหนาแน่นแสงของกระจกสไลด์และกระจกสไลด์เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 13 แสดงระยะห่างแนวตั้งหรือความหนาของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม ซึ่งมีความหนาเฉลี่ย  $89.331 \pm 2.572$  นาโนเมตร

#### 4.1.4 ทดสอบความชอบน้ำ

ทดสอบความชอบน้ำ จากการวัดค่ามุมสัมผัสที่คงตัวของหยดน้ำที่ทำกับพื้นผิว (รูปที่ 14) พบว่าค่ามุมสัมผัสที่คงตัวของหยดน้ำทำกับกระจก ( $31.14 \pm 0.088^\circ$ ) มีค่าสูงกว่าค่ามุมสัมผัสที่คงตัวของหยดน้ำทำกับไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม ( $14.97 \pm 1.796^\circ$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

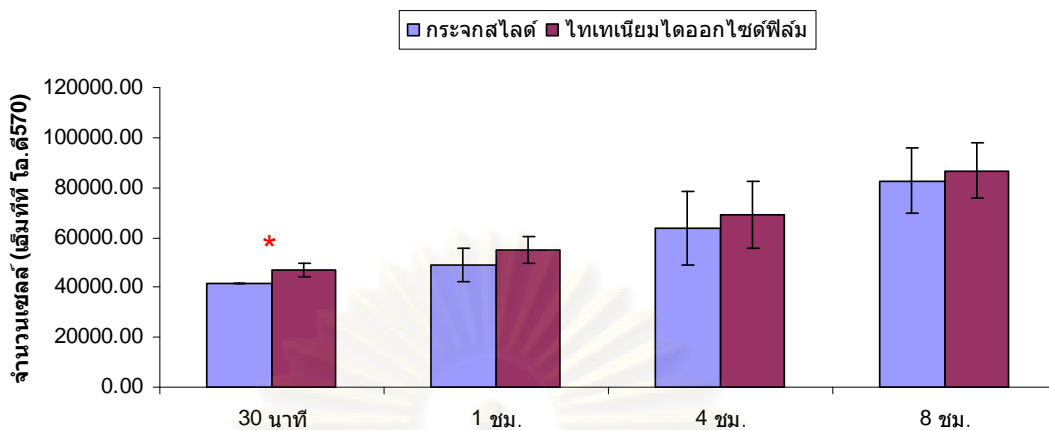


รูปที่ 14 แสดงความชอบน้ำ ก. ภาพถ่ายด้านข้างแสดงมุมสัมผัสที่หยดน้ำทำกับพื้นผิวกระจกใส ข. ภาพถ่ายด้านข้างแสดงมุมสัมผัสที่หยดน้ำทำกับพื้นผิวกระจกใสเคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม ค. ค่ามุมสัมผัสคงตัวที่หยดน้ำทำกับกระจกใส ( $31.14 \pm 0.088$ ) และไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม ( $14.97 \pm 1.796$ ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

#### 4.2 การทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูก (เอ็มซี3ที3-อี1)

##### 4.2.1 การทดสอบความมีชีวิตจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที

ที่เวลา 30 นาที 1 4 และ 8 ชั่วโมง เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีปริมาณของเซลล์มากกว่าในทุกช่วงเวลา โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่เวลา 30 นาที จากนั้นเซลล์บนกระจกใสกลุ่มควบคุมมีปริมาณเพิ่มขึ้นใกล้เคียงเซลล์บนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม



รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตบนกระจกสไลด์ และไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มด้วยวิธีเอ็มทีที ที่เวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยที่เวลา 30 นาที พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

#### 4.2.2 การศึกษารูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์กับไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ผลการศึกษาสอดคล้อง และยืนยันผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์จากวิธีเอ็มทีที โดยพบว่า

ที่เวลา 30 นาทีหลังการหว่าน จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีปริมาณมากกว่าที่ยึดเกาะบนกระจกสไลด์ โดยรวมแล้วรูปร่างของเซลล์บนทั้งสองพื้นผิวมีลักษณะกลม (รูปที่ 16ก. แถวบน ภาพมีกำลังขยาย 500 เท่า) เป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ส่วนใหญ่บนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มเริ่มมีการแผ่ตัวก่อน ดังจะเห็นได้ชัดในกำลังขยายที่สูงขึ้น (รูปที่ 16ก. แถวล่าง ภาพมีกำลังขยาย 1000 เท่า)

ที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังการหว่าน เซลล์บนทั้งสองพื้นผิวมีการแผ่ตัวบางส่วน ลักษณะการแผ่ตัวไม่สมบูรณ์ โดยเซลล์ส่วนใหญ่ก็ยังคงรูปร่างกลมอยู่ (รูปที่ 16ข แถวบน ภาพมีกำลังขยาย 500 เท่า และแถวล่าง ภาพมีกำลังขยาย 1000 เท่า)

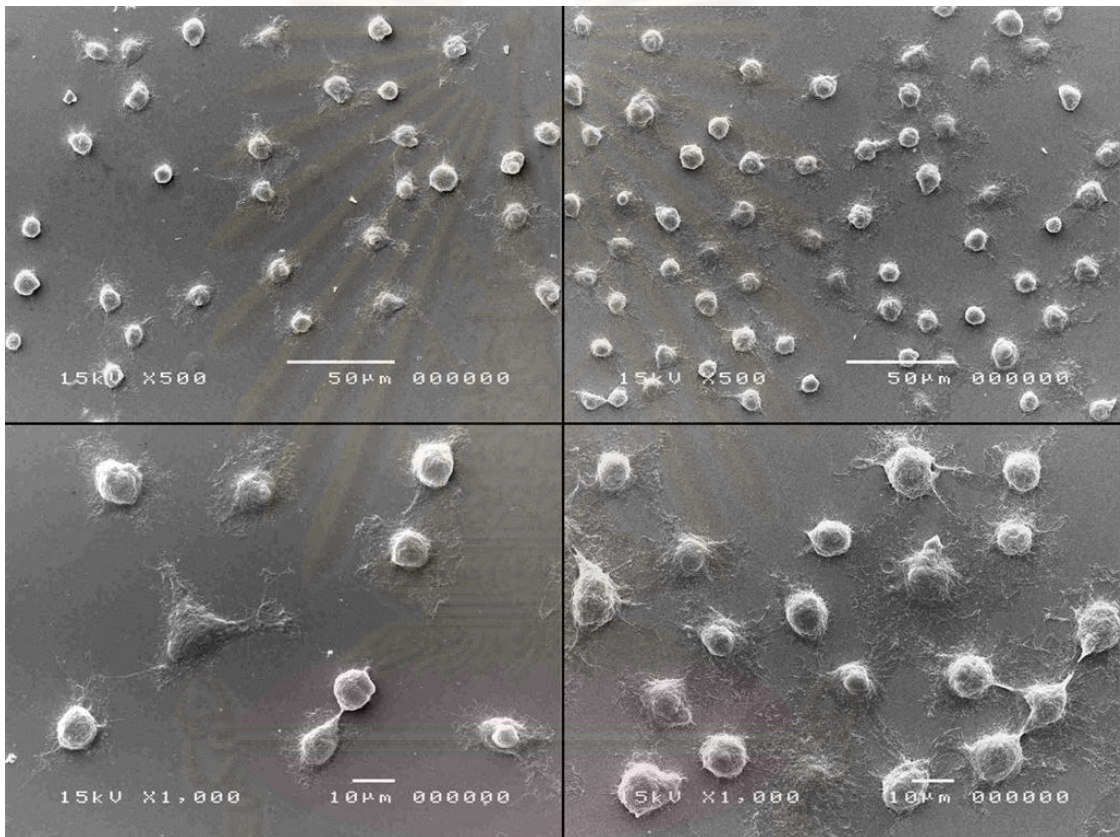
ที่เวลา 4 ชั่วโมงหลังการหว่าน เซลล์ทั้งหมดบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีการแผ่ตัวอย่างสมบูรณ์ ขณะที่บนกระจกสไลด์ มีเซลล์ปริมาณเล็กน้อยยังคงรูปร่างกลม (รูปที่ 16ค แสดงภาพกำลังขยาย 500 เท่า.)

ที่เวลา 8 ชั่วโมงหลังการหว่าน เซลล์บนทั้งสองพื้นผิวมีการแผ่ตัวอย่างสมมาตรกัน  
กัน ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสองพื้นผิวได้ (ไม่แสดงรูป)

ก. ที่เวลา 30 นาที (แถวบนแสดงกำลังขยาย 500 เท่า แถวล่างแสดงกำลังขยาย 1,000 เท่า)

กระจกไลต์

ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

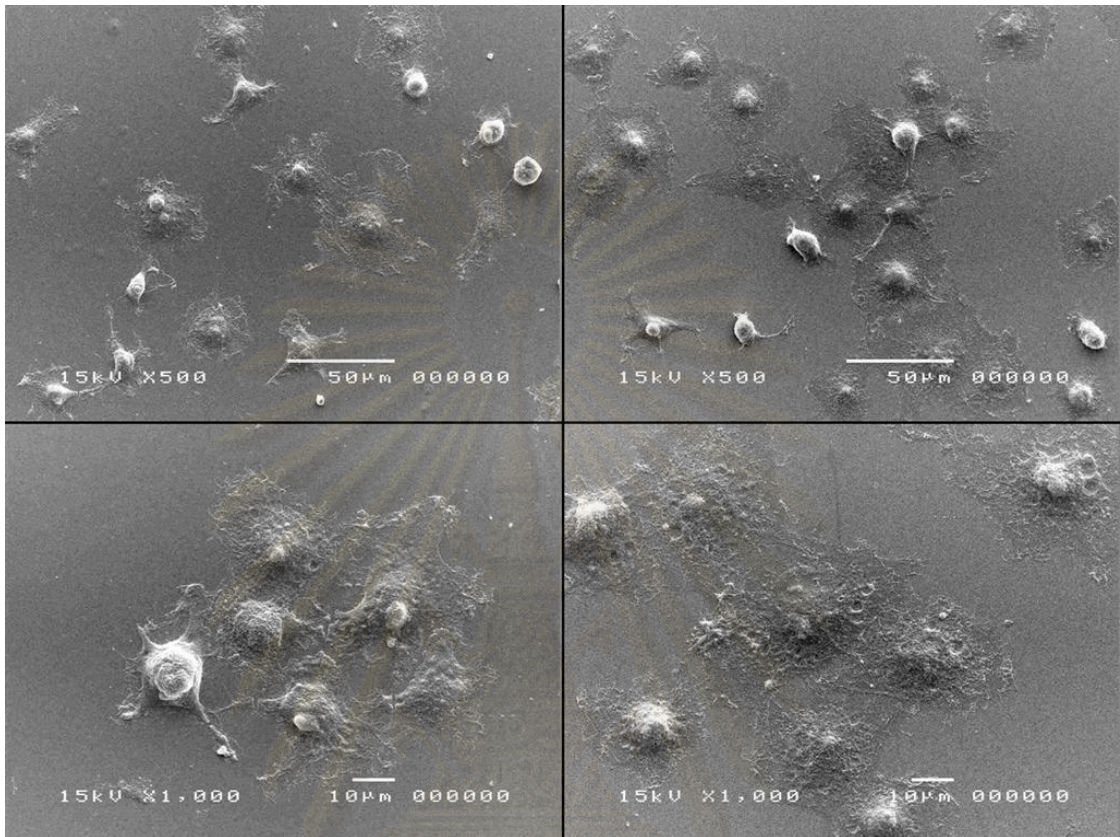


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. ที่เวลา 1 ชั่วโมง (แถวบนแสดงกำลังขยาย 500 เท่า แถวล่างแสดงกำลังขยาย 1,000 เท่า)

กระจกใส

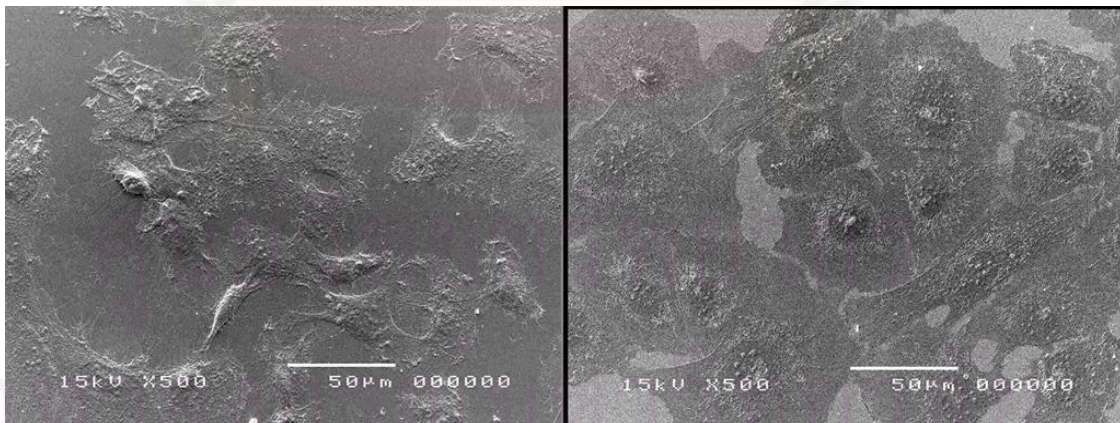
ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม



ค. ที่เวลา 4 ชั่วโมง (แสดงกำลังขยาย 500 เท่า)

กระจกใส

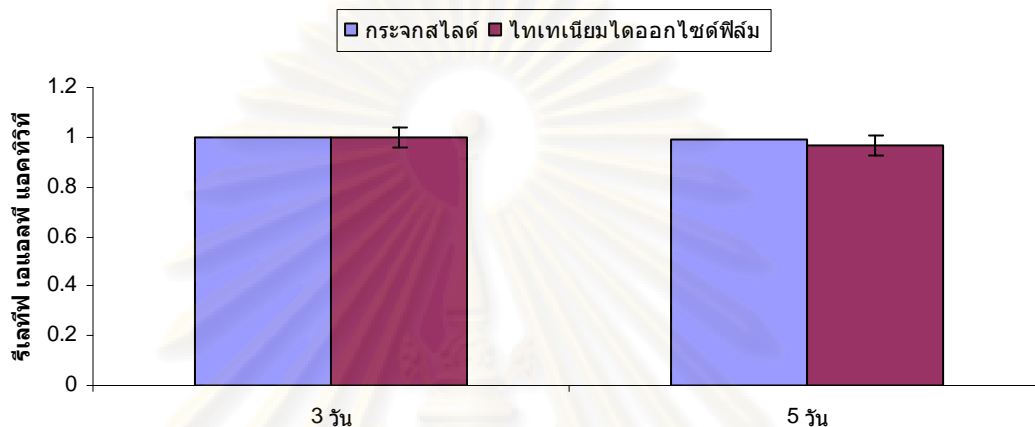
ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม



รูปที่ 16 แสดงรูปร่างและแผ่ตัวของเซลล์บนกระจกใสเปรียบเทียบกับไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เวลา ก. 30 นาที ข. 1 ชั่วโมง และ ค. 4 ชั่วโมง หลังการหว่านเซลล์ตามลำดับ

#### 4.2.3 การทดสอบการแปรสภาพของเซลล์โดยวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ผลไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 3 และ 5 ของการเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนกระบอกสไลด์และไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม ที่เวลา 3 และ 5 วันตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 การอภิปรายวิธีและผลการวิจัย

จากการค้นคว้าในฐานข้อมูลต่างๆ เท่าที่ทราบ การศึกษาครั้งนี้อาจเป็นครั้งแรกที่ทำการทดสอบอย่างเป็นรูปธรรม เพื่อพิสูจน์ความสามารถของไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เชื่อมต่อการยึดติดและแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกโดยการเคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกสไลด์ การเลือกเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกสไลด์ เพื่อให้แน่ใจว่าฟิล์มที่เตรียมได้เป็นไทเทเนียมไดออกไซด์บริสุทธิ์เท่านั้น เนื่องจากกระจกสไลด์หรือแก้วไม่มีคุณสมบัติในการเกิดออกไซด์ที่พื้นผิวได้เอง ซึ่งแตกต่างจากโลหะต่างๆไปที่อาจเกิดออกไซด์ของโลหะนั้นๆ มาปนเปื้อนระหว่างผ่านขั้นตอนการเตรียม

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการใช้วิธีโซลเจล เพื่อเตรียมชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์บริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างผลึกเป็นออสถูฐานเช่นเดียวกับไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เกิดเองตามธรรมชาติ และได้ฟิล์มที่มีลักษณะบาง มีความสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกันในทุกตำแหน่ง และมีความหนาแน่นสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระจกสไลด์กลุ่มทดลอง ดังแสดงผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม เครื่องวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ และจากผลค่ามุมสัมผัสที่หยดน้ำทำกับพื้นผิว

เพื่อยืนยันว่าลักษณะออสถูฐานที่เกิดขึ้น เป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ไม่ใช่ลักษณะออสถูฐานของกระจก ได้นำสารละลายโซลที่เหลือจากการใช้จุ่มชิ้นงาน ไปทำให้แห้ง แคลไซน์และเผาที่อุณหภูมิเดียวกัน ผลพบว่าเกิดผลึกรูปแบบอนาเทส ซึ่งเป็นโครงสร้างผลึกรูปแบบหนึ่งของไทเทเนียมไดออกไซด์ และจากการตรวจสอบพื้นผิวฟิล์มที่เกิดขึ้น แม้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดจะไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพื้นผิวทั้งสองกลุ่มทดลองได้อย่างชัดเจน แต่ผลจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถวัดได้อย่างละเอียดในระดับอะตอมหรือโมเลกุล มีความละเอียดอยู่ในระดับสูงถึง 0.1 นาโนเมตร แสดงให้เห็นในภาพ 3 มิติ (รูปที่ 11) ว่าบนพื้นผิวของกระจกที่มีฟิล์มเคลือบอยู่ แสดงลักษณะความเป็นอนุภาคที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีความสม่ำเสมอตลอดทั้งพื้นผิว ในขณะที่กระจกสไลด์กลุ่มควบคุมแสดงความเป็นออสถูฐานหรือไม่ปรากฏลักษณะผลึกใดๆ ที่ชัดเจน ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษานี้ยังสามารถวัดความหนาของฟิล์มที่เกิดขึ้นได้ดังรูปที่ 13 จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น



ทั้งหมด แสดงให้เห็นว่ามีไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบอสัณฐานเกิดขึ้นจริงบนกระจกใสที่ทำการเคลือบ

สำหรับความเป็นอสัณฐานของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยปกติแล้วด้วยวิธีโซลเจล การเปลี่ยนวิฤภาคของไทเทเนียมไดออกไซด์จะขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเผา จากการศึกษาล่าสุดพบว่า ถ้าทำการเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนชิ้นโลหะไทเทเนียม จะเริ่มเห็นความเป็นผลึกได้ที่อุณหภูมิประมาณ 450-550 องศาเซลเซียส (4, 13, 19) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพื้นผิวของโลหะไทเทเนียมเอื้อต่อการเกิดผลึกอยู่แล้วจึงไม่ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงมากนักในการเกิดผลึกรูปแบบต่างๆ แตกต่างจากการเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนชิ้นงานที่มีลักษณะอสัณฐาน เช่น กระจก ที่อาจต้องใช้อุณหภูมิในการเผาที่สูงมากขึ้น เพื่อสร้างผลึกรูปแบบต่างๆ จากการศึกษาของ K.K.Saini (26) เตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบนกระจกและซิลิกาเคลือบด้วยการจุ่ม โดยวิธีโซลเจล เพื่อศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางแสง (optical properties) ก่อนทำการเผาฟิล์มจะมีลักษณะเป็นอสัณฐาน พบว่าที่อุณหภูมิมากกว่า 300 องศาเซลเซียส จะเริ่มพบผลึกเล็กๆแต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 300-700 องศาเซลเซียส จะมีการเพิ่มขนาดของผลึก โดยจะสามารถพบไทเทเนียมรูปแบบอนาเทสที่อุณหภูมิประมาณ 700 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 700 องศาเซลเซียส พบว่าฟิล์มหลุดจากชิ้นงานเนื่องจากมีสัมประสิทธิ์การขยายตัวที่ไม่เท่ากันของชิ้นงานและฟิล์ม จากการศึกษาของ K.K.Saini อาจเป็นคำอธิบายความเป็นอสัณฐานของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากการศึกษาครั้งนี้

อย่างไรก็ตามข้อสงสัยเกี่ยวกับบทบาทของโครงสร้างผลึกแบบต่างๆของไทเทเนียมไดออกไซด์ ที่มีผลต่อการตอบสนองของแบบลอกเลียนแบบกระบวนการของเซลล์ (biomimic response) ยังไม่สามารถหาข้อสรุปที่ชัดเจนได้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Jokinen และคณะ (73) ใช้วิธีโซลเจลเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับฟิล์มที่มีส่วนผสมระหว่างไทเทเนียมไดออกไซด์และซิลิกอนไดออกไซด์บนโลหะไทเทเนียมโดยวิธีจุ่ม โดยไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้ไม่มีโครงสร้างผลึกที่ชัดเจน แต่ผลการศึกษาก็ยังพบว่าบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มบริสุทธิ์มีการตกตะกอนของแคลเซียมดีกว่าฟิล์มที่มีส่วนผสมระหว่างไทเทเนียมไดออกไซด์และซิลิกอนไดออกไซด์ ส่วนการศึกษาของ Kern และคณะ (74) ที่ทำการเตรียมพื้นผิวโลหะไทเทเนียมให้มีไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบอนาเทสด้วยวิธีแพสซิเวชันด้วยกรดไนตริก เปรียบเทียบกับโลหะไทเทเนียมที่ไม่มีผลึกออกไซด์ที่พื้นผิว ผลคือฟิล์มอนาเทสที่ได้มีความชอบน้ำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างของการดูดซับโปรตีนที่พื้นผิวและการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกระหว่างทั้งสองกลุ่ม ทั้งนี้สรุปว่าโครงสร้างผลึกและความชอบน้ำ ไม่มีผลต่อการดูดซับโปรตีนที่พื้นผิวและการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูก

ในขณะที่ Zhou และคณะ<sup>(75, 76)</sup>เตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีโครงสร้างผลึก 3 แบบคือ อสังฐานอนาเทส และรูไทล์บนชั้นซิลิกอนเวเฟอร์ ด้วยวิธีแมกนีครอน พลาสมา สเป็คเตอริงแบบแห้ง โดยควบคุมให้ทั้ง 3 กลุ่มมีความขรุขระพื้นผิวใกล้เคียงกัน แล้วศึกษาการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูก พบว่า ไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบอนาเทสสนับสนุนการยึดเกาะ การแผ่ตัว การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการแปรสภาพของเซลล์มากกว่าไทเทเนียมไดออกไซด์รูปแบบอสังฐานและรูไทล์ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มแบบอสังฐานที่เตรียมได้ ก็มีความสอดคล้องกับรายงานของ Tsukimura<sup>(77)</sup> ที่ทำการศึกษาผลขององค์ประกอบทางเคมีของไทเทเนียมไดออกไซด์พื้นผิวต่อการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูก โดยการเตรียมไทเทเนียมและไทเทเนียมไดออกไซด์ร้อยละ 99.99 เพื่อเคลือบบนแผ่นไทเทเนียมโดยวิธีสเป็คเตอริง ฟิล์มที่เตรียมได้มีลักษณะอสังฐาน ผลทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูกพบว่า ไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีคุณสมบัติเพิ่มจำนวนเซลล์ เชื้อต่อการแปรสภาพและสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์สร้างกระดูกมากกว่าฟิล์มไทเทเนียม จากผลดังกล่าวอาจพอให้อนุมานได้ว่าความเป็นอสังฐานของไทเทเนียมไดออกไซด์ไม่ได้ส่งผลเสียต่อการตอบสนองของเซลล์แต่อย่างใด

จากผลการศึกษานี้พบว่า ชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์มีผลทำให้การยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 30 นาทีแรกหลังการหว่านเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกระจกสไลด์กลุ่มควบคุม จากนั้นที่เวลา 1 4 และ 8 ชั่วโมง เซลล์สร้างกระดูกบนกระจกสไลด์ มีการยึดติดและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนใกล้เคียงเซลล์บนไทเทเนียมไดออกไซด์ และเมื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปร่างของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าเซลล์ที่อยู่บนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มจะมีการแผ่ตัวที่เร็วกว่าและกินพื้นที่ในการแผ่ตัวมากกว่าบนกระจกสไลด์ ซึ่งแสดงถึงการที่เซลล์ชอบพื้นผิวมากกว่า ทำให้อาจกล่าวได้ว่าระบบการเคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มด้วยวิธีโซลเจลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว ยังเชื้อต่อการยึดเกาะและแผ่ตัวของเซลล์สร้างกระดูกอีกด้วย ไม่ว่าจะด้วยกลไกใดก็ตาม เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า สำหรับเซลล์ที่ต้องการการยึดเกาะ เช่นเซลล์สร้างกระดูกจำเป็นต้องมีการยึดเกาะหรือยึดติดที่ดีก่อน เซลล์จึงจะพัฒนาและสามารถทำหน้าที่อื่นๆตามมาได้ การยึดเกาะหรือยึดติดจะส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของเซลล์ เมื่อเริ่มต้นเซลล์มีการยึดเกาะและแผ่ตัวที่ดี ย่อมส่งผลต่อกระบวนการทำงานขั้นต่อไปของเซลล์ เช่น การแปรสภาพของเซลล์ การสร้างโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดต่างๆ และการสร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นต้น

และเป็นที่น่าสนใจว่า ในการศึกษาครั้งนี้ ไทเทเนียมไดออกไซด์ไม่ได้มีผลเชื้อต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสหลังวันที่ 3 และ 5 มากไปกว่ากระจกสไลด์กลุ่ม

ควบคุม อย่างไรก็ตามก็ดี จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น ยังไม่อาจสรุปได้ว่าชั้นไทเทเนียมไดออกไซด์ไม่มีผลต่อการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกด้วยเหตุผล 2 ประการคือ

1. กระจกสไลด์อาจจัดได้ว่าเป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) ทั้งนี้เนื่องจากกระจกสไลด์มีองค์ประกอบหลักคือ ซิลิกา ( $\text{SiO}_2$ ) มีการศึกษามากมายรวมถึงการปรับปรุงพื้นผิววากเทียมที่เกี่ยวข้องกับการใช้ซิลิกา พบว่าเซลล์สร้างกระดูกมีการตอบสนองที่ดีขึ้นเนื่องจากผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์จะเกิดการจับกับพื้นผิวซิลิกาอย่างรวดเร็วในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นผลมาจากการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างแคลเซียมและซิลิกา โดยไฮดรอกซีอะพาไทต์จะรวมตัวเป็นผลึก และจับกับโปรตีนทั้งชนิดคอลลาเจนและไม่ใช่อคอลลาเจนซึ่งเป็นผลผลิตจากเซลล์สร้างกระดูก ทำให้เกิดเป็นพันธะเคมีโดยตรงเชื่อมระหว่างโครงสร้างของกระดูกและไบโอแอกทีฟกลาส การศึกษาของ Gao และคณะ<sup>(78)</sup> พบว่าไบโอแอกทีฟกลาสมีส่วนสนับสนุนการแสดงออกของเซลล์สร้างกระดูก (osteogenic phenotype) เช่นการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอสำหรับการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส และคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง โดยซิลิกาในไบโอแอกทีฟกลาสมีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนบางตัวอย่างจำเพาะกว่าเช่น มีผลเพิ่มระดับการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอสำหรับบีเอ็มพีทู (BMP-2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างกระดูกของเซลล์เป็นต้น

2. การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเพียงแค่ตัวบ่งชี้หนึ่งเท่านั้น มีตัวบ่งชี้ถึงการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูกตัวอื่นอีกที่ควรทำการพิจารณาร่วมด้วย เช่น การแสดงออกของยีนสำหรับการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 (ตัวบ่งชี้ช่วงต้น) ออสตีโอพอนติน (ตัวบ่งชี้ช่วงกลาง) และออสตีโอแคลซิน (ตัวบ่งชี้ช่วงท้าย) นอกจากนี้ จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มด้วยวิธีโซลเจล จะทำให้มีหมู่ไฮดรอกซิลเกิดขึ้นมากมายบนพื้นผิวไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม ( $\text{Ti-OH}$ ) ซึ่งเมื่อสัมผัสกับของเหลวในร่างกายสิ่งมีชีวิต หรือของเหลวเทียม (Simulated Body Fluid, SBF) ในห้องทดลอง จะเกิดประจุลบที่พื้นผิว ( $\text{Ti-O}^-$ ) ซึ่งจะดึงดูดประจุบวกของแคลเซียม และตามด้วยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ฟอสเฟต (electrostatic attraction of calcium) ผลคือ จะช่วยสนับสนุนการตกผลึกของแคลเซียมอะพาไทต์หรือการสร้างเมทริกซ์ที่เป็นแร่ธาตุโดยเซลล์ออสตีโอบลาสต์ได้<sup>(13, 17, 19, 21, 39, 79-81)</sup> ดังนั้นจึงควรจะต้องทำการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับความสามารถในการสร้างกระดูกบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

## 5.2 สรุปผลการวิจัย

ผลการทดสอบการตอบสนองช่วงต้นของเอ็มซี3ที่3-อี1 พบว่าที่ 30 นาที เซลล์ที่ยืดเกาะบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีปริมาณมากกว่าบนกระจกสไลด์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์บนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีการแผ่ตัวเร็ว และกินพื้นที่ในการแผ่ตัวมากกว่า โดยที่เวลา 1 4 และ 8 ชั่วโมง ปริมาณของเซลล์บนทั้งสองชิ้นงานมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่เซลล์บนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีการแผ่ตัวก่อน ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ของการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส หลังวันที่ 3 และ 5

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

เพื่อศึกษาถึงผลของความขรุขระพื้นผิว ควรทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้วิธีไฮลเจลเตรียมไทเทเนียมไดออกไซด์ให้มีความขรุขระพื้นผิวที่แตกต่างกัน แล้วศึกษาการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูก

และจากการที่เซลล์สร้างกระดูกบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มมีการยึดเกาะที่เร็วรวมทั้งมีปริมาณมากกว่า มีการแผ่ตัวเร็วและและกินพื้นที่มากกว่าบนกระจกสไลด์กลุ่มควบคุม ผลดังกล่าว น่าจะมีส่วนช่วยสนับสนุนการทำหน้าที่ของเซลล์ให้ดีขึ้น ส่วนในเรื่องการแปรสภาพของเซลล์ ก่อนทำการสรุปผลควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงตัวชี้วัดอื่นๆ เช่น การสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอสำหรับการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ออสตีโอพอนติน โบนไฮโลโปรตีน และออสตีโอแคลซิน เป็นต้น และจากหลักฐานเกี่ยวกับคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมอะพาไทต์ของหมู่ไฮดรอกซิลบนไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์มที่เตรียมได้จากวิธีไฮลเจล การทดสอบความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ก็เป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาต่อไป

## รายการอ้างอิง

- [1] Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor, M., and Thomsen, P. Titanium in Medicine. Berlin: Springer, 2001.
- [2] Piveteau, L.D., et al. Thin films of calcium phosphate and titanium dioxide by a sol-gel route: a new method for coating medical implants. J Mater Sci Mater Med 10 (Mar 1999): 161-167.
- [3] เชนวาทิษฐ์, ช. หนังสือพจนานุกรมเคมี. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2547.
- [4] Harle, J., Kim, H.W., Mordan, N., Knowles, J.C., and Salih, V. Initial responses of human osteoblasts to sol-gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition. Acta Biomater 2 (Sep 2006): 547-556.
- [5] W., L. Implant : Reconstructing the human body. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1982.
- [6] Martin, J.Y., et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). J Biomed Mater Res 29 (Mar 1995): 389-401.
- [7] Parr, G.R., Gardner, L.K., and Toth, R.W. Titanium: the mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects. J Prosthet Dent 54 (Sep 1985): 410-414.
- [8] Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., and Branemark, P.I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Int J Oral Surg 10 (Dec 1981): 387-416.
- [9] Ducheyne, P. Titanium and calcium phosphate ceramic dental implants, surfaces, coatings and interfaces. J Oral Implantol 14 (1988): 325-340.
- [10] Kasemo, B. and Lausmaa, J. Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. J Biomed Mater Res 22 (Aug 1988): 145-158.
- [11] Zhao, G., et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. J Biomed Mater Res A 74 (Jul 1 2005): 49-58.

- [12] Zhao, G., Raines, A.L., Wieland, M., Schwartz, Z., and Boyan, B.D. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. Biomaterials 28 (Jun 2007): 2821-2829.
- [13] Kim, H.W., Kim, H.E., Salih, V., and Knowles, J.C. Sol-gel-modified titanium with hydroxyapatite thin films and effect on osteoblast-like cell responses. J Biomed Mater Res A 74 (Sep 1 2005): 294-305.
- [14] Ramires, P.A., Romito, A., Cosentino, F., and Milella, E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. Biomaterials 22 (Jun 2001): 1467-1474.
- [15] Ramires, P.A., et al. Biological behavior of sol-gel coated dental implants. J Mater Sci Mater Med 14 (Jun 2003): 539-545.
- [16] Aaritalo, V., Areva, S., Jokinen, M., Linden, M., and Peltola, T. Sol-gel-derived TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> implant coatings for direct tissue attachment. Part I: design, preparation and characterization. J Mater Sci Mater Med 18 (Sep 2007): 1863-1873.
- [17] Advincula, M.C., et al. Osteoblast adhesion and matrix mineralization on sol-gel-derived titanium oxide. Biomaterials 27 (Apr 2006): 2201-2212.
- [18] Areva, S., et al. Sol-Gel-derived TiO<sub>2</sub>- SiO<sub>2</sub> implant coatings for direct tissue attachment. Part II: Evaluation of cell response. J Mater Sci Mater Med 18 (Aug 2007): 1633-1642.
- [19] Kim, H.W., Kim, H.E., Salih, V., and Knowles, J.C. Hydroxyapatite and titania sol-gel composite coatings on titanium for hard tissue implants; mechanical and in vitro biological performance. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 72 (Jan 15 2005): 1-8.
- [20] Massaro, C., et al. Surface and biological evaluation of hydroxyapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques. J Biomed Mater Res 58 (2001): 651-657.
- [21] Peltola, T., Patsi, M., Rahiala, H., Kangasniemi, I., and Yli-Urpo, A. Calcium phosphate induction by sol-gel-derived titania coatings on titanium substrates in vitro. J Biomed Mater Res 41 (Sep 5 1998): 504-510.

- [22] Jarcho, M. Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications. Dent Clin North Am 36 (Jan 1992): 19-26.
- [23] Kangasniemi, I.M., Verheyen, C.C., van der Velde, E.A., and de Groot, K. In vivo tensile testing of fluorapatite and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings. J Biomed Mater Res 28 (May 1994): 563-572.
- [24] Zheng, X., Huang, M., and Ding, C. Bond strength of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti composite coatings. Biomaterials 21 (Apr 2000): 841-849.
- [25] De Oliveira, P.T., and Nanci, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials 25 (Feb 2004): 403-413.
- [26] Saini, K.K., Chanderkant, S.D.S., Kar, M., Singh, D.A., and Sharma, C.P. Structural and optical properties of TiO<sub>2</sub> thin films derived by sol-gel dip coating process. Journal of Non-Crystalline Solids 353 (2007): 2469-2473.
- [27] Eisenbarth, E., Velten, D., and Breme, J. Biomimetic implant coatings. Biomol Eng 24 (Feb 2007): 27-32.
- [28] Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21 (Apr 2000): 667-681.
- [29] Lincks, J., et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. Biomaterials 19 (Dec 1998): 2219-2232.
- [30] Jokstad, A., et al. Quality of dental implants. Int Dent J 53 (2003): 409-443.
- [31] Gotfredsen, K., Nimb, L., Hjorting-Hansen, E., Jensen, J.S., and Holmen, A. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO<sub>2</sub>-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. Clin Oral Implants Res 3 (Jun 1992): 77-84.
- [32] Kawahara, H., et al. In vitro study on bone formation and surface topography from the standpoint of biomechanics. J Mater Sci Mater Med 15 (Dec 2004): 1297-1307.
- [33] Lautenschlager, E.P., and Monaghan, P. Titanium and titanium alloys as dental materials. Int Dent J 43 (Jun 1993): 245-253.

- [34] Lim, Y.J., Oshida, Y., Andres, C.J., and Barco, M.T. Surface characterizations of variously treated titanium materials. Int J Oral Maxillofac Implants 16 (May-Jun 2001): 333-342.
- [35] Woodman, J.L., Jacobs, J.J., Galante, J.O., and Urban, R.M. Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study. J Orthop Res 1 (1984): 421-430.
- [36] Breme, J., Steinhauser, E., and Paulus, G. Commercially pure titanium Steinhauser plate-screw system for maxillofacial surgery. Biomaterials 9 (Jul 1988): 310-313.
- [37] Breme, J., and Wadewitz, V. Comparison of titanium-tantalum and titanium-niobium alloys for application as dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants 4 (Summer 1989): 113-118.
- [38] Sundgren, J.E., Bodo, P., Lundstrom, I., Berggren, A., and Hellem, S. Auger electron spectroscopic studies of stainless-steel implants. J Biomed Mater Res 19 (Jul-Aug 1985): 663-671.
- [39] Li, P., et al. The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. J Biomed Mater Res 28 (Jan 1994): 7-15.
- [40] The glossary of prosthodontic terms. J Prosthet Dent 94 (Jul 2005): 10-92.
- [41] Steinemann, S.G. In Schoder A.; Sutter F.; and Krekler G. (eds) Oral implantology. New York: Georg Thieme Verlag, 1991.
- [42] Albrektsson, T., Berglundh, T., and Lindhe, J. Osseointegration : Historic background and current concepts, 2003.
- [43] Puleo, D.A., and Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 20 (Dec 1999): 2311-2321.
- [44] Bowers, K.T., Keller, J.C., Randolph, B.A., Wick, D.G., and Michaels, C.M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. Int J Oral Maxillofac Implants 7 (Fall 1992): 302-310.
- [45] Larsson, C., et al. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. Biomaterials 15 (Oct 1994): 1062-1074.



- [46] Siebers, M.C., ter Brugge, P.J., Walboomers, X.F., and Jansen, J.A. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. Biomaterials 26 (Jan 2005): 137-146.
- [47] Sato, M., Slamovich, E.B., and Webster, T.J. Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings. Biomaterials 26 (Apr 2005): 1349-1357.
- [48] Porter, A.E., Hobbs, L.W., Rosen, V.B., and Spector, M. The ultrastructure of the plasma-sprayed hydroxyapatite-bone interface predisposing to bone bonding. Biomaterials 23 (Feb 2002): 725-733.
- [49] Hulshoff, J.E., and Jansen, J.A. Initial interfacial healing events around calcium phosphate (Ca-P) coated oral implants. Clin Oral Implants Res 8 (Oct 1997): 393-400.
- [50] Dhert, W.J., et al. A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. J Biomed Mater Res 27 (Jan 1993): 127-138.
- [51] Caulier, H., et al. Effect of calcium phosphate (Ca-P) coatings on trabecular bone response: a histological study. J Biomed Mater Res 29 (Sep 1995): 1061-1069.
- [52] Chang, Y.L., Lew, D., Park, J.B., and Keller, J.C. Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity. J Oral Maxillofac Surg 57 (Sep 1999): 1096-1108; discussion 1108-1099.
- [53] Coathup, M.J., et al. Osseo-mechanical induction of extra-cortical plates with reference to their surface properties and geometric designs. Biomaterials 20 (Apr 1999): 793-800.
- [54] Nanci, A., et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. J Biomed Mater Res 40 (May 1998): 324-335.

- [55] Rupp, F., Scheideler, L., Rehbein, D., Axmann, D., and Geis-Gerstorfer, J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. Biomaterials 25 (Mar-Apr 2004): 1429-1438.
- [56] Thomas, K.A., Kay, J.F., Cook, S.D., and Jarcho, M. The effect of surface macrotecture and hydroxylapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials. J Biomed Mater Res 21 (Dec 1987): 1395-1414.
- [57] Kilpadi, D.V., and Lemons, J.E. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. J Biomed Mater Res 28 (Dec 1994): 1419-1425.
- [58] Liao, H., et al. Response of rat osteoblast-like cells to microstructured model surfaces in vitro. Biomaterials 24 (Feb 2003): 649-654.
- [59] Eriksson, C., Nygren, H., and Ohlson, K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. Biomaterials 25 (Aug 2004): 4759-4766.
- [60] Gotfredsen, K., Wennerberg, A., Johansson, C., Skovgaard, L.T., and Hjorting-Hansen, E. Anchorage of TiO<sub>2</sub>-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. J Biomed Mater Res 29 (Oct 1995): 1223-1231.
- [61] Mustafa, K., et al. Determining optimal surface roughness of TiO<sub>2</sub> blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. Clin Oral Implants Res 12 (Oct 2001): 515-525.
- [62] Webster, T.J., Siegel, R.W., and Bizios, R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. Biomaterials 20 (Jul 1999): 1221-1227.
- [63] Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel, R.W., and Bizios, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. Biomaterials 21 (Sep 2000): 1803-1810.
- [64] Webster, T.J., and Ejiófor, J.U. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. Biomaterials 25 (Aug 2004): 4731-4739.

- [65] Kommireddy, D.S., Sriram, S.M., Lvov, Y.M., and Mills, D.K. Stem cell attachment to layer-by-layer assembled TiO<sub>2</sub> nanoparticle thin films. Biomaterials 27 (Aug 2006): 4296-4303.
- [66] Wan, Y., et al. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(L-lactide). Biomaterials 26 (Jul 2005): 4453-4459.
- [67] Kaplan, F., et al. Form and function of bone. In : Simon SP, editor. Orthopedic basic science.: Columbus, OH : American academy of Orthopedic Surgeons 1994.
- [68] Lampin, M., Warocquier, C., Legris, C., Degrange, M., and Sigot-Luizard, M.F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. J Biomed Mater Res 36 (Jul 1997): 99-108.
- [69] Ramires, P.A., et al. In vitro response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells. J Mater Sci Mater Med 13 (Aug 2002): 797-801.
- [70] Sol-Gel Technology. 2005 [cited 05 11]; Available from: <http://www.phys.suwon.ac.kr/~jgyoon/lab/solgel.htm> [2005, January 11]
- [71] Pongpom, S. Preparation of titanium dioxide thin film on glass plate using sol-gel technique for photocatalytic reduction of chromium (VI). Bangkok: Chulalongkorn University; 2004.
- [72] Supawut P. Effect of calcination conditions on hydrophilicity of titanium dioxide films. Master's Degree Master of Engineering Chulalongkorn University, 2005.
- [73] Jokinen, M., et al. Influence of sol and surface properties on in vitro bioactivity of sol-gel-derived TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> films deposited by dip-coating method. J Biomed Mater Res 42 (Nov 1998): 295-302.
- [74] Kern, T., Yang, Y., Glover, R., and Ong, J.L. Effect of heat-treated titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell initial attachment. Implant Dent 14 (Mar 2005): 70-76.

- [75] Zhou, W., et al. Plasma-controlled nanocrystallinity and phase composition of  $\text{TiO}_2$ : a smart way to enhance biomimetic response. J Biomed Mater Res A 81 (May 2007): 453-464.
- [76] He, J., et al. The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. J Mater Sci Mater Med 19 (Nov 2008): 3465-3472.
- [77] Tsukimura, N., et al. The effect of superficial chemistry of titanium on osteoblastic function. J Biomed Mater Res A 84 (Jan 2008): 108-116.
- [78] Gao, T., Aro, H.T., Ylanen, H., and Vuorio, E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. Biomaterials 22 (Jun 2001): 1475-1483.
- [79] Kokubo, T., Kim, H.M., and Kawashita, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. Biomaterials 24 (Jun 2003): 2161-2175.
- [80] Areva, S., et al. Use of sol-gel-derived titania coating for direct soft tissue attachment. J Biomed Mater Res A 70 (Aug 2004): 169-178.
- [81] Peltola, T., et al. Effect of aging time of sol on structure and in vitro calcium phosphate formation of sol-gel-derived titania films. J Biomed Mater Res 51 (Aug 2000): 200-208.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



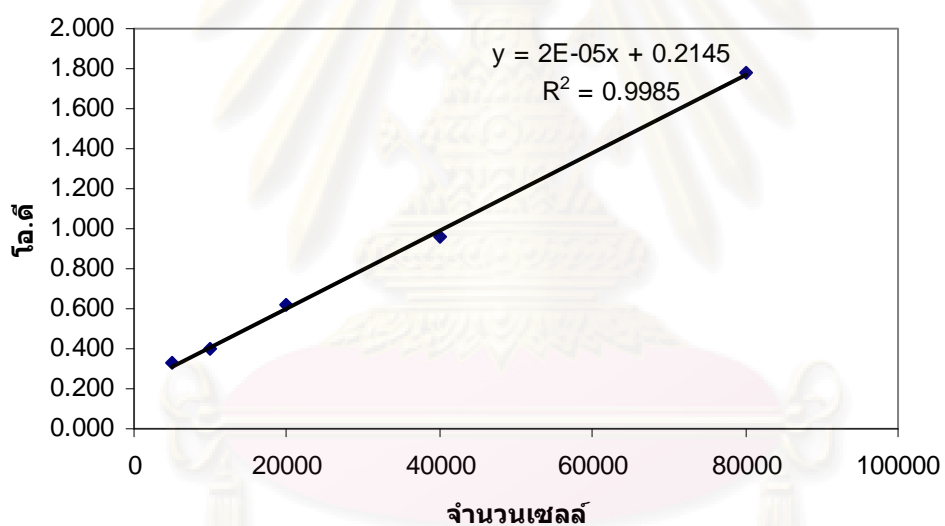
ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## โค้งมาตรฐาน

ค่าความเข้มแสง	5000 เซลล์	10000 เซลล์	20000 เซลล์	40000 เซลล์	80000 เซลล์
ครั้งที่ 1	0.328	0.486	0.509	0.907	1.736
ครั้งที่ 2	0.330	0.306	0.771	0.984	1.860
ครั้งที่ 3	0.324	0.406	0.576	0.977	1.755
ค่าเฉลี่ย	0.327	0.399	0.619	0.956	1.784
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.003	0.090	0.136	0.043	0.067



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

## ตารางผลสถิติ

## 1. การทดสอบความขรุขระเฉลี่ยของไทเทเนียมไดออกไซด์ฟิล์ม

## NPar Tests

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ra
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.76825
	Std. Deviation	.426493
Most Extreme Differences	Absolute	.286
	Positive	.286
	Negative	-.263
Kolmogorov-Smirnov Z		.572
Asymp. Sig. (2-tailed)		.899

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## T-Test

## Group Statistics

type	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ra g	2	.40200	.039598	.028000
t	2	1.13450	.086974	.061500

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ra	Equal variances assumed	7E+015	.000	-10.840	2	.008	-.732500	.067574	-1.023248	-.441752
	Equal variances not assumed			-10.840	1.397	.026	-.732500	.067574	-1.183582	-.281418

## 2. ค่ามุมสัมพันธ์คงตัวที่พื้นผิวทำกับหยดน้ำ

### NPar Tests

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		angle
N		18
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	23.0556
	Std. Deviation	8.41429
Most Extreme Differences	Absolute	.327
	Positive	.302
	Negative	-.327
Kolmogorov-Smirnov Z		1.389
Asymp. Sig. (2-tailed)		.042

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### T-Test

#### Group Statistics

type		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
angle	glass	9	31.1444	.08819	.02940
	tio2	9	14.9667	1.79583	.59861

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
angle	Equal variances assumed	16.029	.001	26.993	16	.000	16.17778	.59933	14.90725	17.44830
	Equal variances not assumed			26.993	8.039	.000	16.17778	.59933	14.79687	17.55868



### 3. การทดสอบความมีชีวิตจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที

#### NPar Tests

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		t30m	t1h	t4h	t8h
N		12	12	12	12
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	44503.29	51906.06	66512.05	84678.80
	Std. Deviation	3327.457	6592.454	13710.13	11640.16
Most Extreme Differences	Absolute	.288	.193	.245	.153
	Positive	.288	.193	.245	.153
	Negative	-.212	-.188	-.162	-.119
Kolmogorov-Smirnov Z		.998	.667	.848	.530
Asymp. Sig. (2-tailed)		.272	.765	.469	.941

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

#### T-Test

##### Group Statistics

	type	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
t30m	Glass	6	41841.004	0	0
	Tio2	6	47165.5845	2710.654	1106.619863
t1h	Glass	6	48851.5202	6598.67046	2693.895935
	Tio2	6	54960.6042	5447.75114	2224.035089
t4h	Glass	6	63944.4033	14736.5868	6016.18636
	Tio2	6	69079.7028	13436.4729	5485.417104
t8h	Glass	6	82643.2497	12958.335	5290.218097
	Tio2	6	86714.359	10964.5953	4476.277287

##### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
t30m	Equal variances assumed	5.002	.049	-4.812	10	.001	-5324.581	1106.6199	-7790.28	-2858.88
	Equal variances not assumed			-4.812	5.000	.005	-5324.581	1106.6199	-8169.24	-2479.92
t1h	Equal variances assumed	.988	.344	-1.749	10	.111	-6109.084	3493.3376	-13892.7	1674.557
	Equal variances not assumed			-1.749	9.654	.112	-6109.084	3493.3376	-13930.7	1712.552
t4h	Equal variances assumed	.084	.777	-.631	10	.542	-5135.300	8141.5170	-23275.7	13005.13
	Equal variances not assumed			-.631	9.916	.542	-5135.300	8141.5170	-23296.6	13026.01
t8h	Equal variances assumed	.095	.764	-.587	10	.570	-4071.109	6929.8965	-19511.9	11369.66
	Equal variances not assumed			-.587	9.733	.570	-4071.109	6929.8965	-19569.4	11427.20

## 4. การแปรสภาพของเซลล์โดยวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

## NPar Tests

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		t3d	t5d
N		6	6
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.97217	.95783
	Std. Deviation	.040489	.058345
Most Extreme Differences	Absolute	.337	.315
	Positive	.246	.235
	Negative	-.337	-.315
Kolmogorov-Smirnov Z		.825	.771
Asymp. Sig. (2-tailed)		.504	.592

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## T-Test

## Group Statistics

type		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
t3d	glass	3	1.00000	.000000	.000000
	tio2	3	.94433	.042123	.024320
t5d	glass	3	1.00000	.000000	.000000
	tio2	3	.91567	.056359	.032539

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower		Upper
t3d	Equal variances assumed	7.240	.055	2.289	4	.084	.055667	.024320	-.011855	.123189
	Equal variances not assumed			2.289	2.000	.149	.055667	.024320	-.048972	.160306
t5d	Equal variances assumed	13.229	.022	2.592	4	.061	.084333	.032539	-.006009	.174676
	Equal variances not assumed			2.592	2.000	.122	.084333	.032539	-.055670	.224337

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว วรณิสร เพชรสุภมิตร เกิดที่ กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 15 กรกฎาคม พ.ศ. 2524 สัญชาติ ไทย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง พ.ศ. 2548 จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลังจบการศึกษาเข้ารับราชการ ตำแหน่งทันตแพทย์ระดับ 4 โรงพยาบาลบัวใหญ่ จังหวัดนครราชสีมาเป็นเวลา 1 ปี จากนั้นได้ลาออกจากราชการ และทำงานในภาคเอกชนเป็นเวลา 1 ปี จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา ทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย