

การเตรียมโครงสร้างเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติจากแคลเซียมฟอสเฟตชนิด  
สองเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟต



นางสาวศศิรดา ตันจิตวิริยะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีเซรามิก ภาควิชาวัสดุศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2557  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF NATURAL BONE-  
LIKE SCAFFOLD FROM BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE OF HYDROXYAPATITE AND TRIC  
ALCIUM PHOSPHATE

Miss Sasirada Tanchitviriya



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Ceramic Technology  
Department of Materials Science  
Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2014  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเตรียมโครงสร้างเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตาม  
ธรรมชาติจากแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสของไฮดรอกซีอะ  
พาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟต

โดย

นางสาวศศิครดา ตันจิตวิริยะ

สาขาวิชา

เทคโนโลยีเซรามิก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดุจฤทัย พงษ์เก่า คະซีมา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. ศิริพร ลากเกียรติถาวร

ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา วัฒนกิจไพศาล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริฉันทน์ เขียมศิริเลิศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดุจฤทัย พงษ์เก่า คະซีมา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ศิริพร ลากเกียรติถาวร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา วัฒนกิจไพศาล)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรนภา สุจริตวรกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. กาญจนา กาญจนทวีวัฒน์)

ศศิรดา ต้นจิตวิริยะ : การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติจากแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟต (PREPARATION OF NATURAL BONE-LIKE SCAFFOLD FROM BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE OF HYDROXYAPATITE AND TRICALCIUM PHOSPHATE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. คุณุทัย พงษ์เก่า คະซิม่า, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ศิริพร ลาภเกียรติถาวร, ศ. ทพ. ดร. พสุธา ธีญญะกิจไพศาล, 76 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์/บีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติด้วยวิธีการเผาพริก โดยใช้สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารตั้งต้น อีกทั้งเลือกศึกษาผลของสารตัวเติมน้ำมันพาราฟินและพอลิอะคริลิกที่มีความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลต่างกันเพื่อศึกษาผลของสารตัวเติมต่อลักษณะของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเลือกส่วนผสมสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต/แคลเซียมคาร์บอเนตและสารตัวเติมที่มีความเหมาะสมเพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติต่อไป โดยการเตรียมชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนเป็นส่วนหนึ่งของโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นในแล้วขึ้นรูปโครงชั้นนอกเป็นแบบเนื้อแน่นด้วยผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ การสร้างโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ใช้น้ำมันพาราฟินและพอลิอิโพรพิลีนเททราฟลูออไรด์ เพื่อสร้างรูพรุนระดับมหภาค อีกทั้งพอลิอะคริลิกถูกใช้เพื่อเพิ่มการยึดเกาะระหว่างอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟต ชิ้นงานตัวอย่างพบว่า มีเฟสไฮดรอกซีอะพาไทต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต รูพรุนในชิ้นงานมีการกระจายตัวแบบ 2 ระดับ ได้แก่ รูพรุนจุลภาคและรูพรุนมหภาค และจากการวิเคราะห์ภาพโครงสร้างจุลภาคชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนของเนื้อแน่นและเนื้อพรุนเชื่อมติดกันสนิทไม่มีช่องว่างแสดงว่ามีการยึดติดกันเป็นอย่างดี สุดท้ายเลือกโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติที่ประกอบด้วยรูพรุนระดับจุลภาค รูพรุนระดับมหภาค รูพรุนต่อเนื่อง และมีเฟสผสมระหว่างไฮดรอกซีอะพาไทต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตมาทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยใช้เซลล์ ST2 เพาะเลี้ยงลงบนโครงเลี้ยงเซลล์และเก็บชิ้นงานไว้ในตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน พบว่าเซลล์เจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีและเป็นวัสดุไม่เป็นพิษกับเซลล์

ภาควิชา วัสดุศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีเซรามิก

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ นิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5572123223 : MAJOR CERAMIC TECHNOLOGY

KEYWORDS: SCAFFOLD, HYDROXYAPATITE, BETA-TRICALCIUM PHOSPHATE, BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE

SASIRADA TANCHITVIRIYA: PREPARATION OF NATURAL BONE-LIKE SCAFFOLD FROM BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE OF HYDROXYAPATITE AND TRICALCIUM PHOSPHATE. ADVISOR: ASST. PROF. DUJREUTAI PONGKAO KASHIMA, Ph.D., CO-ADVISOR: SIRIPORN LARPKIATTAWORN, Ph.D., PROF. PASUTHA THUNYAKITPISAL, Ph.D., 76 pp.

This work focused on preparation of natural bone-like scaffold from biphasic calcium phosphate of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate by sintering method using calcium phosphate compounds and calcium carbonate as the starting materials. The different molecular weight of Poly(-acrylic)acid (PAA) and different viscosity of paraffin oil were chosen in order to study on the effects of polymer additives on the formation of pore size, porosity and interconnectivity. The mixture of calcium phosphate/calcium carbonate and suitable polymer additives were selected to prepare natural bone-like scaffolds in the next step. The scaffold composed of two layer, the inner layer was porous structure and the outer layer was dense structure made from HA powder. To synthesis porous structure of scaffolds, paraffin oil and polyethoxylated castor oil (PECO) were chosen to create the macroporosities. Poly(-acrylic) acid (PAA) was also used to enhance a cohesion of calcium phosphate particles. The microstructure of two layer scaffold showed interface between porous shell and dense shell. Finally, the scaffolds with micro-pore, macro-pore, interconnected pore and biphasic of hydroxyapatite/beta-tricalciumphosphate phase were tested for their biocompatibility. In this research, ST2 cells were seeded onto the scaffolds and the samples were kept in a 37°C incubator for 5days. It was found that the cell growth on the scaffolds indicated that the scaffolds showed a good biocompatibility and non-toxic to the cells

Department: Materials Science  
Field of Study: Ceramic Technology  
Academic Year: 2014

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากการอนุเคราะห์ การสนับสนุนและความช่วยเหลือทั้งด้านวิชาการและการดำเนินงานวิจัย ต้องขอขอบคุณท่านทั้งหลาย บุคคลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่างๆ ดังนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดุจฤทัย พงษ์เก่า คະขีมา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ศิริพร ลาภเกียรติถาวร และ ศาสตราจารย์ ทพ. ดร. พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำ คำชี้แนะ แก้ไข ตลอดจนให้ความรู้ ความช่วยเหลือแนวทางการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่สละเวลามาให้ความรู้ คำชี้แนะรวมทั้งการตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยเซรามิกขั้นสูง ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย(วว.) ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำวิจัยและความช่วยเหลือด้านการวิเคราะห์ผลการทดลอง

สุดท้าย กราบขอบพระคุณครอบครัว ที่อบรมสั่งสอนและให้กำลังใจมาโดยตลอด

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ .....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.1 โคร่งเลี้ยงเซลล์ .....	5
2.1.1 สมบัติของโคร่งเลี้ยงเซลล์.....	6
2.1.1.1 ชนิดของวัสดุชีวภาพ .....	6
2.1.1.2 โครงสร้างสัณฐานวิทยา.....	7
2.1.2 กระบวนการขึ้นรูปโคร่งเลี้ยงเซลล์.....	9
2.1.3 การนำไปใช้งานของโคร่งเลี้ยงเซลล์.....	12
2.2 สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต.....	13
2.2.1 สมบัติของแคลเซียมฟอสเฟตเซรามิก .....	14
2.2.2 การใช้งานทางการแพทย์ของแคลเซียมฟอสเฟตเซรามิก.....	15
2.3 บีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต .....	15

2.3.1	โครงสร้างผลึกของบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต .....	16
2.3.2	วิธีการสังเคราะห์บีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต.....	18
2.4	ไฮดรอกซีอะพาไทต์ .....	18
2.4.1	โครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	19
2.4.2	วิธีการสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ .....	19
2.5	แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส (Biphasic calcium phosphate, BCP).....	20
2.5.1	กลไกการทำงานของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส .....	22
2.5.2	วิธีการสังเคราะห์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส .....	22
2.6	ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ.....	23
2.6.1	การทำไร้เชื้อ (Sterilization).....	24
2.7	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	25
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย .....	27
3.1	สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง.....	27
3.1.1	วัสดุติบและสารเคมีสำหรับการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ .....	28
3.1.2	สารเคมีสำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกหนู (ST2) .....	28
3.1.3	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง .....	28
3.2	วิธีศึกษาผลของสารตัวเติมน้ำมันพาราฟินและ PAA ต่อสมบัติโครงเลี้ยงเซลล์.....	30
3.2.1	การเตรียมส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟต.....	30
3.2.2	วิธีศึกษาผลของการเติมน้ำมันพาราฟินและ PAA.....	30
3.2.3	การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์.....	31
3.2.3.1	โครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุน.....	31
3.2.3.2	โครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่น .....	34
3.2.3.3	โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ .....	36



3.2.4. สารตัวเติมในโครงเลี้ยงเซลล์.....	37
3.2.4.1 PAA (กรดพอลิอะคริลิก).....	37
3.2.4.2 PECO (พอลิอีโพรซีเลทคาสเตอร์ออยล์).....	37
3.2.4.3 น้ำมันพาราฟิน.....	37
3.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ.....	40
3.4 วิธีศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ.....	40
3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลอง (Cell Culture Preparation).....	41
3.4.1.1 วิธีการเตรียมและวัดความเข้มข้นของเซลล์.....	42
3.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์.....	43
3.4.3 การทำวัสดุให้แห้ง (Dehydration).....	45
3.4.4. การทำ MTT assay.....	45
3.4.4.1 การเตรียม MTT.....	46
3.4.4.2 การเตรียมเซลล์.....	46
3.4.4.3 การทดสอบสาร.....	47
3.4.4.4 การเติม MTT.....	47
3.4.4.5 การวิเคราะห์ผล.....	47
3.5 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของสารตั้งต้น และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้น.....	48
3.5.1 เฟสองค์ประกอบ (Phase composition).....	48
3.5.2 เฟสองค์ประกอบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ.....	48
3.5.3 โครงสร้างจุลภาค.....	48
3.5.4 การกระจายขนาดรูพรุน (Pore size distribution).....	48
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	50
4.1 โครงเลี้ยงเซลล์เนื้อพรุน.....	50

4.1.1 ผลการวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบ.....	50
4.1.2 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค .....	53
4.1.3 ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดรูพรุน .....	54
4.2 โครงเลี้ยงเซลล์เนื้อแน่น .....	57
4.2.1 ผลการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบ.....	57
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค .....	57
4.3 โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ.....	58
4.3.1 ผลการวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบ.....	59
4.3.2 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาครอยต่อระหว่างส่วนเนื้อแน่นและส่วนเนื้อพรุน ของโครงเลี้ยงเซลล์.....	60
4.3.3 ผลการวิเคราะห์ MTT assay .....	60
4.3.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กับเซลล์กระดูกหนู.....	60
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	63
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	63
5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยเพิ่มเติม.....	64
รายการอ้างอิง .....	65
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	76

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1.1	อัตราการสลายตัวของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต .....	2
ภาพที่ 2.1	ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์.....	6
ภาพที่ 2.2	ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของกระดูกทางธรรมชาติของมนุษย์ .....	7
ภาพที่ 2.3	ลักษณะของ Haversian system.....	8
ภาพที่ 2.4	ลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	8
ภาพที่ 2.5	กระบวนการทำงานทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ .....	12
ภาพที่ 2.6	แบบจำลองลักษณะโครงสร้างผลึกของบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต.....	17
ภาพที่ 2.7	แบบจำลองลักษณะโครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ .....	19
ภาพที่ 2.8	เฟสไดอะแกรมของการสังเคราะห์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส .....	21
ภาพที่ 2.9	การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด Saos-2 ลงบนแคลเซียมฟอสเฟตที่ประกอบด้วย 1% PAA .....	26
ภาพที่ 3.1	ขั้นตอนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ .....	29
ภาพที่ 3.2	ขั้นตอนการศึกษาผลการเติมน้ำมันพาราฟินและ PAA ต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	33
ภาพที่ 3.3	ขั้นตอนการสังเคราะห์ผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ .....	35
ภาพที่ 3.4	ขั้นตอนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิก.....	36
ภาพที่ 3.5	การกระจายตัวของน้ำมันพาราฟินในน้ำ .....	38
ภาพที่ 3.6	การกระจายตัวของหยดของเหลวของน้ำมันพาราฟินใน PAA (ก) สูตร 1 (ข) สูตร 2 (ค) สูตร 3 (ง) สูตร 4.....	39
ภาพที่ 3.7	แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ .....	40
ภาพที่ 3.8	แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	42
ภาพที่ 3.9	ลักษณะของ Haemocytometer.....	42
ภาพที่ 3.10	Haemocytometer จากกล้องจุลทรรศน์ <sup>(43)</sup> .....	43
ภาพที่ 3.11	ขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ .....	44

ภาพที่ 3.12 ขั้นตอนการทำวัสดุให้แห้งในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ .....	45
ภาพที่ 3.13 การทดสอบสมบัติโครงเลี้ยงเซลล์.....	49
ภาพที่ 4.1 โครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุนหลังขัด .....	50
ภาพที่ 4.2 XRD pattern เปรียบเทียบเฟสองค์ประกอบของส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟตสูตรต่าง หลังเผาที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส (a) สูตร 4 (b) สูตร 3 (c) สูตร 2 (d) สูตร 1.....	52
ภาพที่ 4.3 โครงสร้างจุลภาคของส่วนผสมสูตรต่างๆ .....	53
ภาพที่ 4.4 การกระจายตัวขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่างๆ .....	55
ภาพที่ 4.5 การสร้างรูพรุนมหภาคในโครงเลี้ยงเซลล์ .....	56
ภาพที่ 4.6 แสดงเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่นที่สังเคราะห์จากบรูไซต์ .....	57
ภาพที่ 4.7 แสดงโครงสร้างจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่นที่สังเคราะห์จากบรูไซต์ .....	57
ภาพที่ 4.8 แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติด้านในเนื้อพรุน ด้านนอกเนื้อแน่น .....	58
ภาพที่ 4.9 แสดงเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุน .....	59
ภาพที่ 4.10 แสดงเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่น .....	59
ภาพที่ 4.11 แสดงช่วงรอยต่อของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุนและเนื้อแน่น .....	60
ภาพที่ 4.12 แสดงการทดสอบชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กับเซลล์สร้างกระดูก .....	61
ภาพที่ 4.13 โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างคล้าย bone like apatite.....	62

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างวิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ.....	11
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต.....	13
ตารางที่ 2.3 ข้อมูลโครงสร้างของพหุสัณฐานของไตรแคลเซียมฟอสเฟต .....	16
ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของส่วนผสม ที่ $Ca/P = 1.78$ .....	30
ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมของการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ของแคลเซียมฟอสเฟต.....	32
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร .....	41
ตารางที่ 4.1 ส่วนผสมของการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ของแคลเซียมฟอสเฟต.....	51



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์มีความสำคัญขึ้นมาก เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการรักษาผู้ป่วยแต่ละรายที่มีอาการบาดเจ็บซึ่งมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน การวิจัยวัสดุทางการแพทย์จึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ตรงกับความต้องการในการรักษาของผู้ป่วยมากขึ้น จึงเกิดแนวคิดเรื่องการสร้างเนื้อเยื่อและกระดูกขึ้นได้เองเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาสำหรับผู้ป่วยที่มีการสูญเสียหรือต้องการการซ่อมแซมกระดูกจากการบาดเจ็บเนื่องจากอุบัติเหตุหรือโรคร้าย ปัญหาเกี่ยวกับการบาดเจ็บทางกระดูกเหล่านี้ล้วนเป็นปัญหาที่พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ก่อให้เกิดความไม่สะดวกสบายและเกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย อีกทั้งยังนำไปสู่ปัญหาการดำเนินชีวิตประจำวันที่ยากลำบาก นักวิทยาศาสตร์จึงมีความพยายามวิจัยและคิดค้นวัสดุชีวภาพซึ่งเป็นวัสดุที่สามารถเข้ากับร่างกายได้ดีขึ้น เพื่อใช้ซ่อมแซมหรือทดแทนอวัยวะเดิมโดยการจำลองและเลียนแบบให้วัสดุทางการแพทย์นี้มีความใกล้เคียงกับกระดูกธรรมชาติหรือมีความใกล้เคียงกับอวัยวะในร่างกายผู้ป่วยมากที่สุด

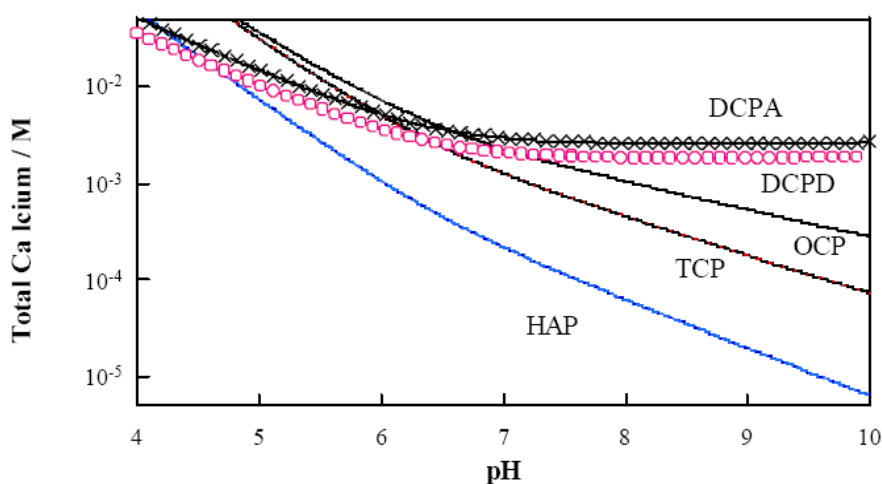
วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) คือเทคโนโลยีที่ได้รับการยอมรับในการสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะส่วนต่างๆของร่างกายมนุษย์ที่ไม่สามารถสร้างขึ้นได้เอง โดยกระบวนการทำงานมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ เซลล์ สารกระตุ้น และโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์จะทำหน้าที่เป็นเหมือนโครงร่างเพื่อให้เซลล์มายึดเกาะและพัฒนาจนกลายเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ วัสดุที่สามารถนำมาใช้สร้างโครงเลี้ยงเซลล์นั้นมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ พอลิเมอร์ เซรามิก โลหะ และวัสดุเชิงประกอบ เป็นต้น ซึ่งชนิดของวัสดุที่ใช้สร้างโครงเลี้ยงเซลล์นั้นมีความสำคัญต่อชนิดของเนื้อเยื่อที่ต้องการสร้างและตำแหน่งที่ต้องการซ่อมแซม สำหรับด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อทางด้านทันตกรรมและศัลยกรรมกระดูกนั้นนิยมใช้วัสดุเซรามิกในกลุ่มแคลเซียมฟอสเฟต เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต เป็นต้น เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีที่ใกล้เคียงกับกระดูกทางธรรมชาติของมนุษย์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้งานโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดสองเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์ และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นที่นิยมมากกว่าการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเฟสเดียวของไฮดรอกซีอะพาไทต์ หรือบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต<sup>(1-3)</sup> เนื่องจากไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นเฟสที่สามารถสร้าง

พันธะระหว่างกระดูกได้ดี แต่มีอัตราการสลายตัวทางชีวภาพต่ำมากส่งผลให้เมื่อเกิดการสร้างกระดูกที่สมบูรณ์แล้ว ไฮดรอกซีอะพาไทต์กลับยังคงอยู่และกลายเป็นส่วนเกินของตำแหน่งนั้นไป ในขณะที่ปิตาไทรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นเฟสที่มีอัตราการสลายตัวทางชีวภาพสูงจึงส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์สลายตัวภายในร่างกายอย่างรวดเร็วก่อนจะเกิดการทดแทนอวัยวะเดิมได้อย่างสมบูรณ์นอกจากนี้ อัตราส่วนระหว่างปริมาณไฮดรอกซีอะพาไทต์และปิตาไทรแคลเซียมฟอสเฟต (HA/ $\beta$ -TCP) ยังเป็นสิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาในการใช้งานอีกด้วย เนื่องจากส่งผลต่อทั้งสมบัติทางชีวภาพและสมบัติทางเคมีกายภาพ อัตราการสลายตัวของแคลเซียมฟอสเฟตแสดงดังภาพที่ 1.1

วิธีการสังเคราะห์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสสามารถเตรียมด้วย 2 วิธีหลักคือ

- (1) การให้ความร้อนแก่ Ca-deficient hydroxyapatite ที่อุณหภูมิสูงกว่า 700 องศาเซลเซียส<sup>(4)</sup> จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตมีส่วนช่วยในกระบวนการสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์<sup>(5-6)</sup>
- (2) การผสมระหว่างไฮดรอกซีอะพาไทต์และไทรแคลเซียมฟอสเฟตแล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิสูง แต่การผ่านอุณหภูมิสูงจะทำให้หมู่ไฮดรอกซิลและคาร์บอเนตของไฮดรอกซีอะพาไทต์หลุดออกจากโครงสร้าง ทำให้ความว่องไวทางชีวภาพลดลง<sup>(6)</sup>



ภาพที่ 1.1 อัตราการสลายตัวของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต

อีกสมบัติหนึ่งที่สำคัญสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์คือ รูพรุน โดยสามารถแบ่งรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ 3 ประเภท ดังนี้

- (1) รูพรุนระดับจุลภาค มีความสำคัญต่อการขนส่งโปรตีนและแลกเปลี่ยนไอออน
- (2) รูพรุนระดับมหภาค มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์
- (3) รูพรุนต่อเนื่อง มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ใหม่

วิธีการสร้างรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์มีหลายวิธี เช่น การสร้างฟองแก๊ส (gas foaming) การเผาผนึก (sintering) การอบแห้งเยือกแข็ง (freeze-drying) เป็นต้น เนื่องจากสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตเป็นวัสดุเซรามิกมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง จึงนิยมขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ด้วยวิธีการเผาผนึก<sup>(7-10)</sup> โดยการสร้างรูพรุนขนาดต่างๆในโครงเลี้ยงเซลล์สามารถกำหนดได้จากปริมาณหรือรูปร่างของสารก่อรูพรุนซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด เช่น น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) และพอลิอีโพรพิลีนเททราฟลูออไรด์ (PECO) เป็นสารที่สามารถกำจัดออกได้ง่ายที่อุณหภูมิไม่สูงมาก อีกทั้งยังไม่เป็นพิษต่อร่างกายจึงนิยมนำมาใช้เป็นสารก่อรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากสามารถสร้างรูพรุนต่อเนื่องได้เป็นอย่างดี<sup>(11-13)</sup>

สมบัติที่สำคัญอีกประการของโครงเลี้ยงเซลล์คือต้องมีสมบัติและลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ เนื่องจากยังมีความใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติมากเท่าใดก็ยิ่งส่งผลดีกับความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์และกระดูก

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนต่อเนื่องของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ และศึกษาอัตราส่วนของน้ำมันพาราฟินและพอลิอีโพรพิลีนเททราฟลูออไรด์ที่มีผลต่อการสร้างรูพรุน อีกทั้งศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก



## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของสารพอลิเมอร์ตัวเติมที่มีผลต่อรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติและมีสมบัติความเข้ากันทางชีวภาพระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสกับเซลล์สร้างกระดูกจากหนู

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ
2. ศึกษาผลของสารตัวเติมคือน้ำมันพาราฟินและพอลิอีโพรพิลีนเทอร์โมพลาสติกต่อการสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์
3. ศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสที่เตรียมได้กับเซลล์สร้างกระดูก ST2

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์และไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่มีรูพรุนต่อเนื่องและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างกระดูกจากหนูรวมทั้งมีลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การรักษาผู้ป่วยที่ต้องการซ่อมแซมหรือทดแทนกระดูกที่ได้รับความเสียหายจากอุบัติเหตุหรือโรคภัยนั้น สามารถทำได้โดยการสร้างเซลล์กระดูกขึ้นใหม่แทนที่ตำแหน่งเดิมที่ได้รับความเสียหายโดยการใช้โครงเลี้ยงเซลล์หรือวัสดุทางการแพทย์ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ข้างเคียงให้เข้ามาอาศัยอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ แล้วเกิดการกระตุ้นสร้างเป็นเซลล์กระดูกขึ้นใหม่ โดยส่วนมากโครงเลี้ยงเซลล์จะมีสมบัติย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) พร้อมกับการสร้างกระดูกขึ้นใหม่ในตำแหน่งเดิมของโครงสร้าง ดังนั้นการพัฒนาวัสดุให้มีสมบัติความเข้ากันได้กับร่างกายรวมถึงการออกแบบโครงสร้างให้มีความเหมาะสมต่อการใช้งานในตำแหน่งที่แตกต่างกัน จึงมีความสำคัญต่อการนำมาประยุกต์ใช้รักษาในปัจจุบัน แนวคิดดังกล่าวจึงนำไปสู่งานวิจัยมากมายและส่งผลให้ประสบความสำเร็จในการผลิตวัสดุทางการแพทย์เชิงพาณิชย์ แต่วัสดุหรืออุปกรณ์เหล่านี้มักถูกนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีค่าใช้จ่ายทางการแพทย์ที่สูง ปัจจุบันนี้แม้จะมีการส่งเสริมงานวิจัยเพื่อพัฒนาวัสดุทางการแพทย์มากขึ้นแต่วัสดุทางการแพทย์ที่ผลิตในประเทศไทยยังคงมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับความต้องการในการใช้งาน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีงานวิจัยทางด้านการผลิตวัสดุทางการแพทย์เพิ่มขึ้นเพื่อให้สามารถตอบสนองความต้องการของผู้ป่วยที่หลากหลาย

#### 2.1 โครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ คือวัสดุทดแทนกระดูก (bone substitute material) ซึ่งใช้เป็นโครงร่างต้นแบบให้เซลล์เข้ามาอาศัยอยู่และพัฒนาจนกลายเป็นกระดูก โดยทั่วไปโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อถูกปลูกถ่ายในร่างกายจะทำหน้าที่เป็นสื่อส่งสัญญาณทางกายภาพและเหนี่ยวนำเซลล์ (osteoconduction) จากบริเวณข้างเคียงให้เคลื่อนที่เข้ามาอาศัยอยู่และเจริญเติบโตภายในโครงสร้าง จากนั้นเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการจนเกิดการซ่อมแซมหรือสร้างกระดูกขึ้นใหม่ ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์มีได้หลายรูปแบบ เช่น แบบผง แบบรูพรุน



ภาพที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์<sup>(1)</sup>

### 2.1.1 สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญต่อการนำไปใช้งานในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากการใช้งานที่หลากหลาย ทำให้ต้องคำนึงถึงสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อตำแหน่งการใช้งาน ดังนั้นการเลือกใช้งานของโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีสมบัติที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไปซึ่งจะขึ้นอยู่กับ (1) ชนิดของวัสดุชีวภาพ และ (2) โครงสร้างพื้นฐานวิทยา

#### 2.1.1.1 ชนิดของวัสดุชีวภาพ

โครงเลี้ยงเซลล์สามารถแบ่งตามชนิดของวัสดุชีวภาพได้ 4 ชนิด<sup>(14-15)</sup> คือ

1) เซรามิก คือวัสดุที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) มากที่สุด แต่มีข้อเสียคือแข็งและเปราะแตกง่าย เช่น แก้ว และสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต เป็นต้น วัสดุชนิดนี้สามารถทำปฏิกิริยากับของเหลวภายในร่างกาย และสร้างอะพาไทต์บนพื้นผิวซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์กระดูกขึ้นใหม่ได้ โดยทั่วไปนิยมสร้างรูพรุนด้วยวิธีการเผาผนึก เนื่องจากสามารถทนอุณหภูมิสูงได้

2) พอลิเมอร์ คือวัสดุที่มีสมบัติขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้าง มีข้อเสียคือมีเพียงบางชนิดที่แสดงสมบัติว่องไวทางชีวภาพ (bioactive) เช่น คอลลาเจน ไฮยาลูรอน ไขมัน และกรดพอลิแลคติก (PLA) เป็นต้น สำหรับวิธีการสร้างรูพรุนภายในพอลิเมอร์มีหลายวิธี เช่น การเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่โพลีเมอร์ (cross-linking) การอบแห้งเยือกแข็ง เป็นต้น

3) โลหะ คือวัสดุที่มีสมบัติเชิงกลดีเยี่ยมจึงนิยมใช้เป็นวัสดุปลูกฝัง (implant material) เพื่อใช้งานด้านศัลยกรรมกระดูก แต่มีข้อเสียคือการยึดติดกับเซลล์ การกัดกร่อน และความเป็นพิษต่อร่างกาย เช่น เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) ไททาเนียม (TiO<sub>2</sub>) และโลหะผสมไททาเนียม เป็นต้น สำหรับวิธีการสร้างรูพรุนภายในโลหะมีหลายวิธี เช่น การกัดด้วยกรด (acid-etching) การตัดแต่งด้วยเครื่องมือ (machining) และการพ่นทราย (sand-blasting) เป็นต้น

4) วัสดุเชิงประกอบ คือวัสดุที่เกิดจากการผสมผสานวัสดุตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปเพื่อนำข้อดีของแต่ละชนิดมาใช้ เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์/โคโคซาน ไททานเนียม/โพรบอน และไททานเนียม/แคลเซียมฟอสเฟต เป็นต้น

### 2.1.1.2 โครงสร้างสัณฐานวิทยา

กระดูกทางธรรมชาติของมนุษย์ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ สารอนินทรีย์ (แคลเซียมฟอสเฟต) และสารอินทรีย์ ( โปรตีน คอลลาเจน และอื่นๆ) มีลักษณะเป็นช่องว่างภายในกระดูกและมีรูพรุนประมาณ 50-90 % ดังภาพที่ 2.2 ดังนั้นการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์จึงควรเลียนแบบกระดูกทางธรรมชาติของมนุษย์ โดยมีการสร้างรูพรุนภายในดังภาพที่ 2.4 รูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์จะทำหน้าสร้างกระดูกขึ้นใหม่ (bone regeneration) โดยเกิดการแทรกตัวของเนื้อเยื่อซึ่งสามารถช่วยเพิ่มการยึดติดระหว่างเนื้อเยื่อกับโครงเลี้ยงเซลล์



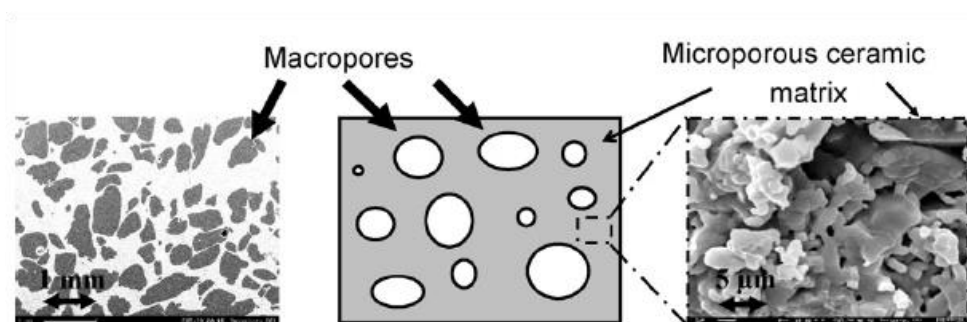
ภาพที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของกระดูกทางธรรมชาติของมนุษย์<sup>(16)</sup>

กระดูกแข็ง (Bone) เป็นเนื้อเยื่อประสานชนิดหนึ่ง มีความแข็งและคงรูปร่างอยู่ได้แม้ร่างกายจะเสียชีวิตไปแล้ว กระดูกแข็งในผู้ใหญ่มีทั้งหมด 206 ชิ้น สามารถยืดหยุ่นได้บ้างแต่ไม่ดีเท่ากระดูกอ่อน หน้าที่ของกระดูกแข็งคือ ช่วยเป็นโครงร่างให้กล้ามเนื้อ เอ็น และผังผืดต่างๆ มาเกาะ ป้องกันข้อหักมั่วในร่างกาย เช่น สมอง ปอด หัวใจ เกือบและปล่อยแคลเซียมให้ร่างกาย และสร้างเม็ดเลือดจากไขกระดูก (Bone Marrow) เมื่อมองด้วยตาเปล่าสามารถแบ่งกระดูกออกได้ 2 ชนิด คือ กระดูกแข็งพรุน และกระดูกแข็งทึบ

1. กระดูกแข็งพรุน (Cancellous Bone หรือ Spongy Bone ) กระดูกชนิดนี้ลักษณะพรุนคล้ายฟองน้ำ ประกอบด้วยกระดูกแข็งชิ้นเล็กๆ เรียกว่า Trabeculae เรียงตัวกันเป็นร่างแห มีช่องว่างเล็กๆ บรรจุไขกระดูก
2. กระดูกแข็งทึบ (Compact Bone) กระดูกชนิดนี้มีลักษณะแข็งสีขาวคล้ายงาช้าง มีการเรียงตัวของ Lamellae เป็นระเบียบ เรียกว่า Haversian System ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของกระดูกแข็ง ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของสารอาหารไปเลี้ยงเซลล์ของกระดูกแข็ง โดย Lamellae เรียงตัวกันเป็นวงกลมซ้อนกันหลายชั้น ตรงกลางเป็นท่อยาว เรียกว่า Haversian Canal ซึ่งเป็นทางผ่านของหลอดเลือด หลอดน้ำเหลืองและเส้นประสาทที่มาเลี้ยงเซลล์ของกระดูกแข็ง Haversian Canal แต่ละอันเชื่อมติดต่อกันผ่านทางท่อที่เรียกว่า Volkmann's Canal



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของ Haversian system<sup>(17)</sup>



ภาพที่ 2.4 ลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์<sup>(18)</sup>

ลักษณะของรูพรุนภายในและขนาดของรูพรุนที่ต่างกันของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ เช่น ความว่องไวทางชีวภาพ อัตราการสลายตัวทางชีวภาพ อัตราการสร้างกระดูกใหม่ การยึดเกาะกันระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์กับเซลล์ และสมบัติเชิงกล เป็นต้น โดยที่สมบัติของรูพรุนจะไม่ขึ้นกับชนิดของวัสดุชีวภาพที่ใช้สร้างโครงเลี้ยงเซลล์ รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สำคัญมี 3 ประเภท ดังนี้

1. รูพรุนระดับมหภาค (macroporosity) คือรูพรุนที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอน<sup>(18)</sup> โดยทั่วไปเกิดจากการเผาไล่หรือกำจัดสารก่อรูพรุนที่เติมลงไปในการขึ้นรูปเนื้อสาร มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (cellular growth) และการงอกของกระดูก (bone ingrowth)

2. รูพรุนระดับจุลภาค (microporosity) คือรูพรุนที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน<sup>(19)</sup> โดยทั่วไปเกิดจากการเผาผนึกไม่สมบูรณ์ ลักษณะเป็นช่องว่างระหว่างเกรนของเนื้อสาร เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากจึงมีความสำคัญต่อการขนส่งโปรตีน (protein delivery) แลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) และการสร้างอะพาไทต์ขึ้นโดยกระบวนการละลายและตกผลึกกลับขึ้นใหม่ เป็นต้น

3. รูพรุนต่อเนื่อง (interconnected pore) คือรูพรุนที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 ไมครอน<sup>(20)</sup> ลักษณะเป็นรูพรุนเดี่ยวที่เชื่อมต่อกันระหว่างสองรูขึ้นไป มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ใหม่ (cell migration) เข้ามาในโครงสร้าง แลกเปลี่ยนสารอาหาร (exchange of nutrients) ได้แก่ออกซิเจน และกลูโคส รวมไปถึงการแทรกตัวของเนื้อเยื่อกระดูกใหม่

### 2.1.2 กระบวนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์มีหลายวิธีด้วยกัน แต่ละวิธีอาจแตกต่างกันโดยอาศัยความแตกต่างของสารสร้างรูพรุน ตัวทำละลาย ความร้อน หรือความดันที่ใช้ เช่น

- 1) Sintering คือการเผาไล่สารก่อรูพรุน (porogen) ออกจากชิ้นงานเพื่อให้ได้โครงสร้างรูพรุน โดยสารที่เลือกใช้มักกำจัดออกได้ที่อุณหภูมิไม่สูงและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย สารก่อรูพรุนที่ใช้มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) และพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) เป็นต้น รูพรุนที่เกิดขึ้นอาจมีรูปร่างเป็นทรงกลม (sphere shape) หรือรูปร่างไม่เป็นระเบียบ (irregular shape) ขึ้นอยู่กับสารก่อรูพรุนที่เลือกใช้

- 2) Salt-leaching คือการผสมผลึกเกลือลงในสารละลายพอลิเมอร์และเทส่วนผสมลงในแม่แบบ เมื่อพอลิเมอร์แข็งตัวจะนำไปละลายอนุภาคเกลือออกจากโครงสร้างจนเกิดรูพรุน การกำจัดเกลือสามารถทำได้โดยการใช้ตัวทำละลายได้แก่ น้ำ และแอลกอฮอล์ เป็นต้น วิธีนี้สามารถกำหนดขนาดรูพรุนที่ต้องการจากขนาดและปริมาณของอนุภาคเกลืออีกด้วย
- 3) Three-dimensional printing (3D printing) คือการใช้เครื่องพิมพ์ที่สามารถสร้างโครงสร้างรูพรุนสามมิติตามชิ้นงานต้นแบบซึ่งออกแบบโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ หลักการคือฉีดน้ำยาประสานลงบนชั้นผงวัสดุเพื่อให้ผงวัสดุแต่ละชั้นเกาะตัวเป็นรูปทรงที่ออกแบบทีละชั้น ข้อดีคือได้ชิ้นงานต้นแบบที่มีความเที่ยงตรงสูงและสามารถขึ้นรูปชิ้นงานได้อย่างรวดเร็ว
- นอกจากนี้ยังมีวิธีการขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์อีกหลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 2.1



ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างวิธีการขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ<sup>(21)</sup>

Material	Fabrication	Application
Hydroxyapatite	Sintering	BMP-2 delivery and ectopic bone
Hydroxyapatite/ Tricalciumphosphate	Sintering	Femoral defect in dogs
Bioglass	Sintering	Ectopic bone formation in dogs
Calcium metaphosphate	Sintering	Rat bone marrow stromal cell ex vivo and ectopic bone formation in mice
Titanium/ Polyvinyl alcohol	Sintering	Femoral defects in dogs
Titanium/ Calcium phosphate	Sintering	Femoral condyles in rabbits
Silk fibroin	Gas foaming	Human bone marrow
Poly(lactide)	Salt-leaching	Teeth implants
Polymeric foams	Emulsion polymerization	Rat osteoblasts in vitro
Collagen/ Hydroxyapatite	Freeze-drying	Rabbit periosteal cells in vitro
Collogen/Hyaluronate	Cross-linking	Cranial defects in rats

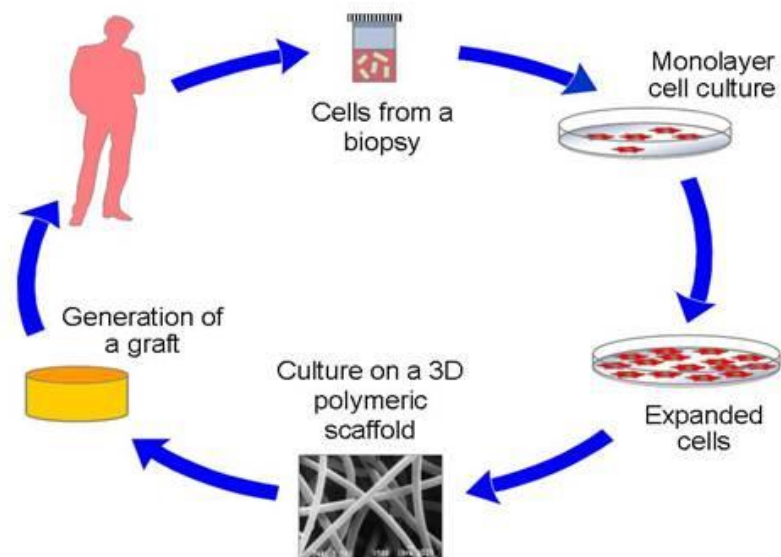


2

1

## 3การนำไปใช้งานของโครงเลี้ยงเซลล์

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ การใช้องค์ความรู้ศาสตร์หลายแขนงซึ่งถูกพัฒนาจนสามารถใช้สร้างเนื้อเยื่อแทนที่อวัยวะที่ชำรุดเสียหายได้ โดยสกัดเซลล์จากเนื้อเยื่อต้นกำเนิดจากอวัยวะที่ต้องการซ่อมแซม (stem cell) จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เซลล์เหล่านี้มีความสามารถแบ่งและขยายจำนวนได้อย่างรวดเร็ว อาจมีการใช้ปัจจัยเสริมสร้างการเจริญเติบโต (Growth factor) จากนั้นจึงปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ลงในตำแหน่งที่ต้องการเพื่อให้ทดแทนเนื้อเยื่อที่สูญเสียไป เซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์จะถูกกระตุ้นจากสภาพแวดล้อม จนเซลล์เกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation) และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเนื้อเยื่อของอวัยวะที่ต้องการ ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 กระบวนการทำงานทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ<sup>(22)</sup>

## 2.2 สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต

สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต คือสารประกอบในรูปของแคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) อยู่ร่วมกับ ออร์โธฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) เมตาฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^-$ ) หรือไพโรฟอสเฟต ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) บางส่วนอยู่ร่วมกับ ไฮโดรเจน ( $\text{H}^+$ ) และไฮดรอกไซด์ไอออน ( $\text{OH}^-$ ) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 สารภายในกลุ่มแคลเซียม ฟอสเฟตมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันทำให้มีสมบัติของสารแตกต่างกัน โดยสมบัติของสารจะ ขึ้นกับค่า Ca/P นอกจากนี้ยังพบว่าสารเหล่านี้สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ภายใต้เงื่อนไขที่เหมาะสม

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต<sup>(23)</sup>

Ca/P	Abbreviation	Name	Formula
0.5	MCPM	Monocalcium phosphate monohydrate	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
1	DCP or DCPA	Dicalcium phosphate or Dicalcium phosphate anhydrous (Monetite)	$\text{CaHPO}_4$
1	DCPD	Dicalcium phosphate dehydrate (Brushite)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1	CPP	Calcium potassium phosphate	$\text{CaKPO}_4$
1	CPSP	Calcium potassium sodium phosphate	$\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$
1.33	OCP	Octacalcium phosphate	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1.5	$\alpha$ -TCP	Alpha tricalcium phosphate	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Ca/P	Abbreviation	Name	Formula
1.5	$\beta$ -TCP	Beta tricalcium phosphate	$\beta$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
1.5-1.67	CDHA	Calcium deficient hydroxyapatite	Ca <sub>10-x</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6-x</sub> (OH) <sub>2-x</sub>
1.67	HA	Hydroxyapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>
1.67	OA of OAp	Oxyapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> O
1.67	FA or FAp	Fluorapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> F <sub>2</sub>
2	TTCP	Tetracalcium phosphate	Ca <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O

### 2.2.1 สมบัติของแคลเซียมฟอสเฟตเซรามิก

สมบัติทั่วไปของแคลเซียมฟอสเฟตเซรามิกประกอบด้วย

- 1) องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างผลึกใกล้เคียงกับกระดูกทางธรรมชาติของมนุษย์
- 2) มีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ
- 3) มีสมบัติความว่องไวทางชีวภาพ
- 4) มีสมบัติย่อยสลายได้ทางชีวภาพ
- 5) มีสมบัติเหนี่ยวนำเซลล์กระดูก (osteochonduction)
- 6) สามารถถูกดูดซึมภายในร่างกายได้ (bioresorption)

จากสมบัติดังกล่าวแคลเซียมฟอสเฟตเซรามิกจึงมีความเหมาะสมแก่การนำมาไปใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก และได้รับความสนใจเลือกใช้เป็นวัสดุชีวภาพเพื่อใช้สร้างโครงเลี้ยงเซลล์

## 2.2.2 การใช้งานทางการแพทย์ของแคลเซียมฟอสเฟตเซรามิก

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแคลเซียมฟอสเฟตเซรามิกมีความเหมาะสมสำหรับการใช้งานทางการแพทย์ด้านทันตกรรมและศัลยกรรมกระดูกในส่วนต่างๆ เนื่องมาจากสมบัติทางชีววิทยา (Biological properties) ที่เหมาะสม สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตเป็นสารอนินทรีย์ที่มีปริมาณสองในสามของเนื้อกระดูกทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงให้กับกระดูกและฟันของมนุษย์ การใช้งานที่พบเห็นทั่วไป เช่น ทันตกรรมรากฟันเทียม การซ่อมแซมกระดูก การแทนที่ข้อต่อส่วนต่างๆ เป็นต้น โดยรูปแบบการใช้งานมีหลายประเภทด้วยกัน ได้แก่ ตัวเสริมแรง (reinforcement) ในวัสดุเชิงประกอบ<sup>(24)</sup> โครงเลี้ยงเซลล์<sup>(25)</sup> ตัวเคลือบบนวัสดุปลูกฝัง (coating)<sup>(26)</sup> และสารตัวเติม (filler)<sup>(27)</sup> เป็นต้น

## 2.3 บีตาไทรแคลเซียมฟอสเฟต

บีตาไทรแคลเซียมฟอสเฟต มีสูตรทางเคมีคือ  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  สามารถแทนด้วยย่อเป็น  $\beta\text{-TCP}$  และค่าอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัสทางทฤษฎี (Ca/P) เท่ากับ 1.50 บีตาไทรแคลเซียมฟอสเฟตนิยมนำมาใช้สร้างวัสดุทางการแพทย์เนื่องจากเป็นส่วนประกอบอนินทรีย์ของกระดูกและฟัน และสามารถสลายตัวทางชีวภาพได้ดี นอกจากนี้ร่างกายยังสามารถดูดซึมได้ ส่งผลให้ไม่เกิดสารตกค้างภายในร่างกายอีกด้วย

ไทรแคลเซียมฟอสเฟตประกอบด้วย 3 พหุสัณฐาน (polymorph)<sup>(28)</sup> คือ

- 1)  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  เสถียรที่อุณหภูมิมากกว่า 1125 องศาเซลเซียส สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงเฟสเป็น  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ที่อุณหภูมิ 1125-1200 องศาเซลเซียส
- 2)  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  เสถียรที่อุณหภูมิ 1120-1430 องศาเซลเซียส
- 3)  $\alpha'\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  เสถียรที่อุณหภูมิมากกว่า 1430 องศาเซลเซียส ไม่นิยมนำมาใช้งานเนื่องจากเสถียรที่อุณหภูมิสูง

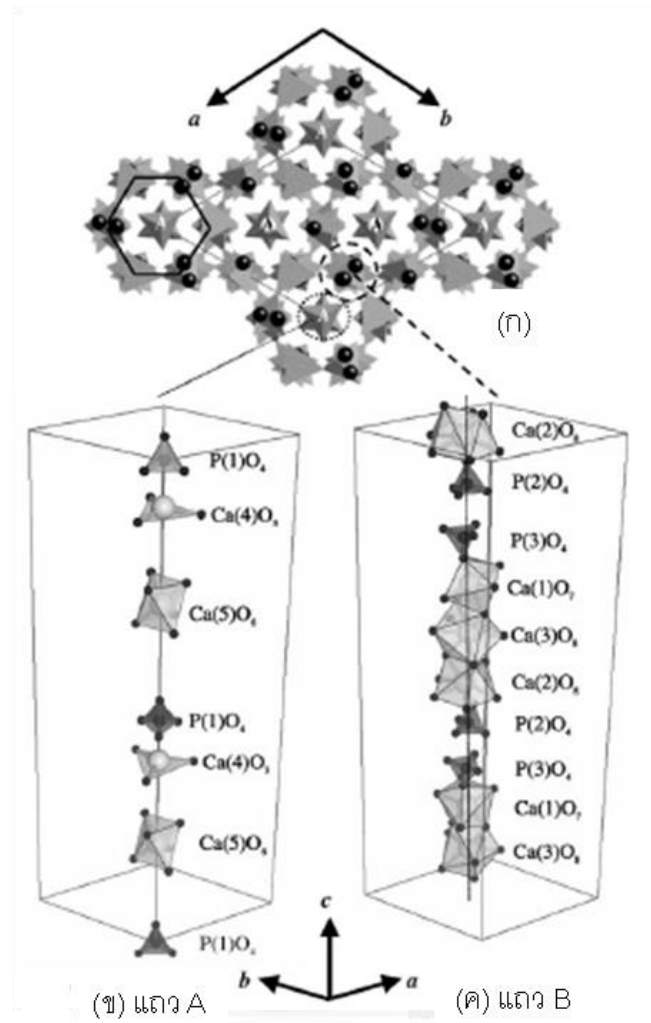
จากการเปรียบเทียบความหนาแน่นทางทฤษฎี(Dth) พบว่าโครงสร้างของ  $\alpha'\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  มีความหนาแน่นต่ำสุด รองลงมาคือ  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ในขณะที่  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  มีความหนาแน่นมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2.3 พหุสัณฐานทั้งสามรูปแบบจึงมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิแตกต่างกัน อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบการสลายตัวทางชีวภาพ  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  จะสลายตัวเร็วกว่า  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  อย่างไรก็ตาม บีตาไทรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นเฟสที่ได้รับการยอมรับและนำมาประยุกต์ใช้งานต่างๆ เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิไม่สูงมากและเสถียรที่อุณหภูมิห้องซึ่งเป็นอุณหภูมิการใช้งาน

ตารางที่ 2.3 ข้อมูลโครงสร้างของพหุสัณฐานของไตรแคลเซียมฟอสเฟต<sup>(29)</sup>

Property	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> polymorph		
	$\beta$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$\alpha$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$\alpha'$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
Symmetry	Rhombohedral	Monoclinic	Hexagonal
Space group	R3C	P2 <sub>1</sub> /a	P6 <sub>3</sub> /mmc
a (nm)	1.04352(2)	1.2849(2)	0.53507(8)
b (nm)	1.04352(2)	2.7354(2)	0.53507(8)
c (nm)	3.74029(5)	1.5222(3)	0.7684(1)
V	3.5272(2)	4.31(6)	0.19052(8)
V <sub>0</sub>	0.1680(2)	0.180(6)	0.19052(8)
Dth	3.066	2.866	2.702

### 2.3.1 โครงสร้างผลึกของบิตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต

โครงสร้างผลึกของบิตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตสามารถอธิบายได้จากแบบจำลองระนาบ (0 0 1) ดังภาพที่ 2.6 (ก) ประกอบด้วยแถว A และ B มีการจัดเรียงตัวตามแนวแกน C ดังภาพที่ 2.6 (ข และ ค) ตามลำดับ สำหรับแถว A ประกอบด้วย Ca จำนวน 4 อะตอม และ P จำนวน 2 อะตอม แต่ละอะตอมจะมีตำแหน่งพารามิเตอร์ (x, y, z) แตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของแถว B ประกอบด้วย Ca จำนวน 6 อะตอม และ P จำนวน 4 อะตอม ซึ่งแถว B จะมีโครงสร้างที่หนาแน่นกว่าแถว A และอะตอมของออกซิเจนบางส่วนมีส่วนเชื่อมระหว่างกัน นอกจากนี้แต่ละแถว A จะถูกล้อมรอบด้วยแถว B จำนวน 6 แถว ส่วนแถว B จะถูกล้อมรอบด้วยแถว A จำนวน 2 แถว และแถว B จำนวน 4 แถว ทั้งแถว A และ B มีการจัดเรียงตัวกันแบบเฮกซะโกนอล



ภาพที่ 2.6 แบบจำลองลักษณะโครงสร้างผลึกของบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต<sup>(30)</sup>

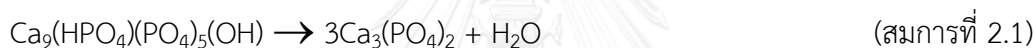
### 2.3.2 วิธีการสังเคราะห์บีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต

การสังเคราะห์บีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตแบ่งเป็น 2 วิธีหลัก คือ

**1. วิธีเปียก (wet method)** เป็นการไทเทรตกรด-เบสด้วยการเติมกรดฟอสฟอริก ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ลงในสารละลายแคลเซียมออกไซด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) และควบคุมระบบให้มีสภาวะกรด-ด่าง (pH) ตั้งแต่กรดจนถึงกลาง เป็นวิธีที่นิยมเนื่องจากไม่ยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งได้อนุภาคที่ละเอียดและสม่ำเสมอ

**2. วิธีปฏิกิริยาสถานะของแข็ง (solid state-reaction)** คือการผ่านกระบวนการความร้อนของ calcium deficient hydroxyapatite (CDHA, cal-def HA) โดยใช้สารตั้งต้นจำพวกแคลเซียมและสารประกอบฟอสฟอรัส ได้แก่ ไพรออสเฟต ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) แคลเซียมออกไซด์ ( $\text{CaO}$ ) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) เป็นต้น จากนั้นให้ความร้อนจนเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาดังสมการที่ 2.1- 2.3<sup>(31)</sup>

ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยา

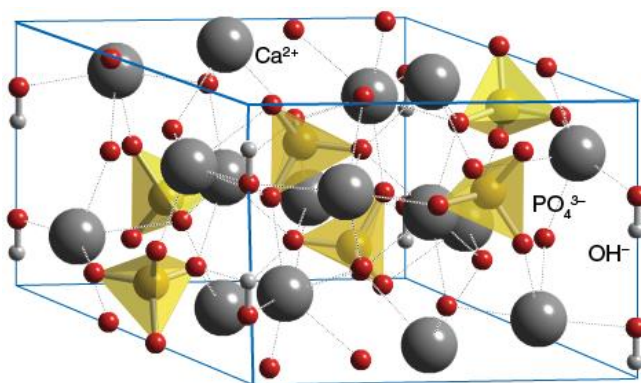


### 2.4 ไฮดรอกซีอะพาไทต์

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ คือแร่ที่อยู่ในกลุ่มอะพาไทต์ สูตรทางเคมีคือ  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  สามารถแทนด้วยตัวย่อ HA หรือ HAp มีค่า Ca/P เท่ากับ 1.67 มีความเสถียรที่อากาศแห้งและขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 1200 องศาเซลเซียส นิยมนำไฮดรอกซีอะพาไทต์มาใช้งานทางการแพทย์เนื่องจากเป็นส่วนประกอบอินทรีย์หลักของกระดูกและฟัน มีความว่องไวทางชีวภาพที่ดีโดยสามารถสร้างพันธะทางเคมีระหว่างวัสดุกับเซลล์กระดูกหรือเนื้อเยื่อได้ดี

### 2.4.1 โครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์

โครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์มีลักษณะตามแบบจำลองดังภาพที่ 2.7 มีการจัดเรียงตัวตามแนวแกน c ผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนซึ่งมีการจัดเรียงตัวแบบ hexagonal rhombic prism ประกอบด้วย 44 อะตอม มีขนาดเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยคือ แกน  $a = 0.9432$  นาโนเมตร แกน  $c = 0.6101$  นาโนเมตร และ  $\gamma = 120^\circ$  จากโครงสร้างพบว่าแนว hydroxyl ion ( $\text{OH}^-$ ) มีการเรียงตัวตั้งฉากกับระนาบหรือขนานกับแนวแกน c โดยแต่ละคู่ของ hydroxyl ion จะอยู่ตำแหน่งมุมของแต่ละเซลล์และมีระยะห่างระหว่างกันเท่ากับ  $1/2$  ของเซลล์<sup>(32)</sup>



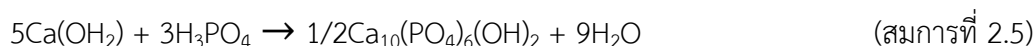
ภาพที่ 2.7 แบบจำลองลักษณะโครงสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์<sup>(33)</sup>

### 2.4.2 วิธีการสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

การสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถแบ่งเป็น 2 วิธีหลัก คือ

**1. Wet method** เป็นการไทเทรตกรด-เบส หรือการตกตะกอนร่วมจากสารละลายที่ประกอบด้วย แคลเซียมไนเตรทและไดแอมโมเนียมฟอสเฟต หรือการตกตะกอนโดยตรงระหว่างสารละลายกรดอโธฟอสฟอริกกับสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ภายใต้ค่า pH ที่แตกต่างกัน การควบคุมค่า pH ของปฏิกิริยา และความเข้มข้นของสารตั้งต้นสามารถกำหนดปริมาณสัมพันธ์ (Stoichiometry) ของไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาดังสมการที่ 2.4<sup>(34)</sup> และสมการที่ 2.5<sup>(35)</sup>

ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยา





**2. Solid state-reaction** หรือกระบวนการแห้ง (dry process) เป็นการใช้สารตั้งต้นจำพวก แคลเซียมและสารประกอบฟอสฟอรัส เช่น ไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) แคลเซียมออกไซด์ ( $\text{CaO}$ ) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) เป็นต้น โดยมีตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาดังสมการที่ 2.6 และสมการที่ 2.7<sup>(36)</sup>

ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยา

เมื่อ  $x < 1$  mole



เมื่อ  $x > 1$  mole



นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นอีก เช่น การแผ่คลื่นรังสีไมโครเวฟ (microwave irradiation) การเจริญเติบโตของการละลาย (melt growth method) เป็นต้น

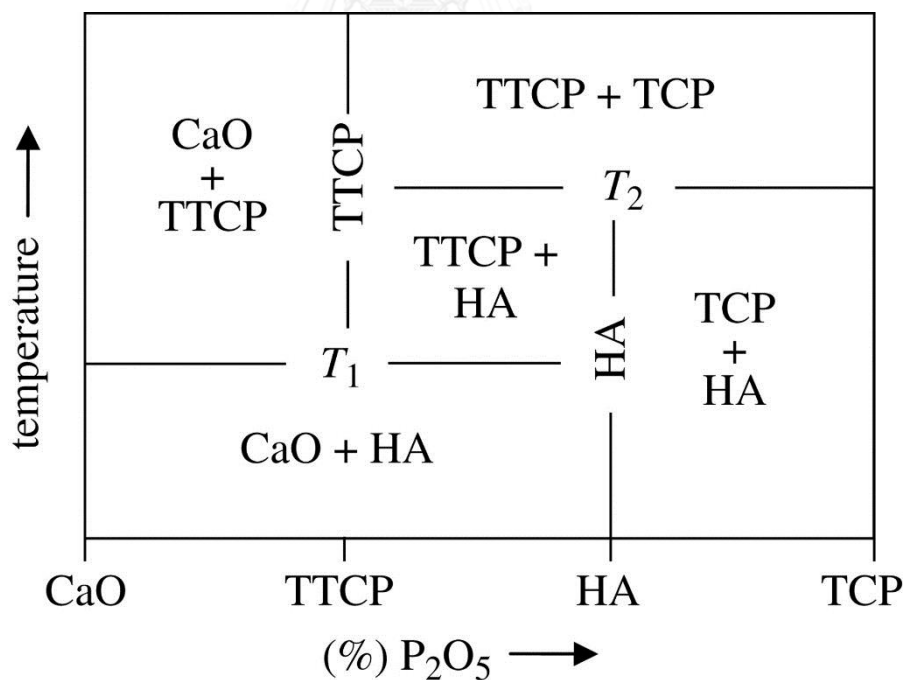
## 2.5 แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส (Biphasic calcium phosphate, BCP)

ปัจจุบันนี้แม้จะมีงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับการสร้างวัสดุทางการแพทย์จากสารแคลเซียมฟอสเฟตชนิดเฟสเดียว แต่ยังคงพบข้อจำกัดทางการใช้งานต่างๆ อาทิเช่น ปีตาโตรแคลเซียมฟอสเฟต มักพบปัญหาด้านการซ่อมแซมกระดูกเนื่องจากมีอัตราการสลายตัวสูงกว่าการสร้างพันธะระหว่างกระดูก (bone bonding) ถึงสองเท่าเมื่อเทียบกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ ส่งผลให้เกิดการซ่อมแซมที่ไม่สมบูรณ์ได้ นอกจากนี้ยังมีสมบัติเชิงกลที่ต่ำจึงไม่สามารถใช้งานในตำแหน่งที่ต้องรองรับแรง (load-bearing) ได้ดี ในขณะที่การใช้งานเฟสเดียวของไฮดรอกซีอะพาไทต์กลับมีอัตราการสลายตัวทางชีวภาพที่ต่ำมากและใช้ระยะเวลาสลายตัวที่นาน บางครั้งแม้จะเกิดการเติมเต็มกระดูกที่สมบูรณ์แล้วแต่ไฮดรอกซีอะพาไทต์กลับยังคงอยู่และกลายเป็นส่วนเกินของตำแหน่งนั้นไป จึงมีแนวคิดใหม่ซึ่งเกิดจากนำข้อเด่นและข้อด้อยของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตแต่ละชนิดผสมกันจนเกิดเป็นแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส (biphasic calcium phosphate, BCP) เป็นรูปแบบหนึ่งของเซรามิกในกลุ่มของแคลเซียมฟอสเฟตที่ได้จากการผสมกันระหว่างแคลเซียมฟอสเฟต 2 เฟส คือ เฟสที่มีคุณสมบัติไม่เกิดการดูดซับ (non-resorbable) เฟสที่มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีระวิทยาได้ยาก และเกิดการทำพันธะกับกระดูกได้โดยตรงซึ่งก็คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HAp) ในส่วนของอีกเฟสจำเป็นต้องมีคุณสมบัติที่สามารถดูดซับโดยกระดูกได้ดี ทำให้เกิดการสร้างเยื่อกระดูก

ใหม่ขึ้นได้ เฟสนี้ได้แก่ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (TCP) ในการนำไปประยุกต์ใช้งานนั้นนอกเหนือจากจะพิจารณาจากสมบัติการสลายตัวแล้ว ยังต้องพิจารณาสมบัติอื่นๆด้วย เช่น การเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteoconductivity) ซึ่งสามารถควบคุมได้จากอัตราส่วนของ HAp : TCP

โดยทั่วไปมักประกอบด้วยบิตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตและไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งมีค่า  $1.5 < \text{Ca/P} < 1.67$  สำหรับบิตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตคือเฟสที่สลายตัวได้ดีทางชีวภาพจึงนำมาผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งเป็นเฟสที่เสถียรภาพสูง ส่งผลให้ช่วยชะลอการสลายตัวทางชีวภาพ อีกทั้งไฮดรอกซีอะพาไทต์ยังช่วยปรับความแข็งแรงให้กับบิตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต

งานวิจัยที่ผ่านมากล่าวว่ทั้งสมบัติทางชีวภาพ (เช่น ความว่องไวทางชีวภาพ อัตราการสลายตัวทางชีวภาพ) และสมบัติเชิงกลของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างปริมาณบิตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตและไฮดรอกซีอะพาไทต์ แต่สมบัติการเหนี่ยวนำกระดูกของแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสเมื่อเทียบกับบิตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตกับไฮดรอกซีอะพาไทต์พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมเพื่อใช้สังเคราะห์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสซึ่งประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างไตรแคลเซียมฟอสเฟตกับไฮดรอกซีอะพาไทต์แตกต่างกัน ดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 เฟสไดอะแกรมของการสังเคราะห์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส<sup>(37)</sup>



## 2.6 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

เมื่อเลือกวัสดุชนิดหนึ่งมาใช้ภายในร่างกายจำเป็นต้องคำนึงถึงสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุว่ามีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ไม่เป็นพิษต่อร่างกายขณะใช้งาน จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าวิธีที่นิยมนำมาทดสอบสมบัติทางชีวภาพเพื่อพิจารณาถึงความปลอดภัยในการนำมาใช้งานจริงสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. การทดสอบภายนอกร่างกาย (in vitro test) คือการทดสอบในหลอดทดลอง ภายในห้องปฏิบัติการ เป็นการทดสอบเกี่ยวกับเซลล์และดำเนินการภายนอกร่างกาย จะมีการเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ (cell lines) ซึ่งได้มาจากการแยกเซลล์จากอวัยวะของสิ่งมีชีวิตและนำมาเลี้ยงต่อในห้องทดลอง เป็นวิธีที่ให้ผลเร็วกว่าการทดสอบในร่างกาย วิธีการนี้สามารถใช้ทดสอบกับวัสดุเพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเซลล์อันนำไปสู่การศึกษาขั้นสูงขึ้นไปในสิ่งมีชีวิตต่อไป
2. การทดสอบภายในร่างกาย (in vivo test) คือการทดสอบในสัตว์ทดลองหรือการทดลองทางคลินิกในคน เป็นการทดสอบขึ้นต่อจากการทดสอบภายนอกร่างกายแล้ว โดยนำวัสดุฝังเข้าไปในร่างกายซึ่งลักษณะเซลล์จะแตกต่างจากการทดสอบภายนอกร่างกาย อย่างไรก็ตามด้วยเหตุผลทั้งทางด้านต้นทุน ศีลธรรม และจรรยาบรรณ จึงทำการทดลองภายนอกร่างกายก่อนเสมอเพื่อลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองและยังเป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างมากอีกด้วย

### 2.6.1 การทำไร้เชื้อ (Sterilization)

เป็นขั้นตอนหนึ่งก่อนการนำวัสดุมาทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ ในปัจจุบันนี้มีวิธีที่นิยมหลายวิธีซึ่งมักเลือกใช้ตามชนิดของวัสดุ ได้แก่

1. การใช้ไอน้ำและลมร้อน (Steam and dry heat) การใช้ความร้อนสูงเพื่อทำลายเชื้อโรคขณะที่ไอน้ำมีประสิทธิภาพแทรกซึมเข้าไปในวัสดุได้ดี วิธีการฆ่าเชื้อนี้เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดสำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย และไม่มีสารตกค้าง แต่สำหรับวัสดุที่มีโครงสร้างเป็นน้ำอาจเกิดการหดตัวหรือเสียรูปร่างได้
2. การทำไร้เชื้อแบบพลาสมา (Plasma treatment) วิธีนี้สามารถฆ่าเชื้อโรคได้หลายชนิดเช่นแบคทีเรีย สปอร์ ไวรัส และยีสต์ เป็นต้น โดยการฉายลำพลาสมาลงบนวัสดุที่อยู่ในถังอาร์กอน
3. การทำไร้เชื้อแบบเอทิลีนออกไซด์และสารเคมีอื่นๆ (Ethylene oxide gas and other chemical treatments) โดยการใช้ก๊าซเอทิลีนออกไซด์ ซึ่งเป็นก๊าซพิษที่มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อแบคทีเรียสูงผ่านใส่ชิ้นงาน วิธีนี้อาจก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างจึงไม่ควรนำไปทดสอบกับเซลล์ทันที และสำหรับชิ้นงานที่มีโครงสร้างรูพรุนจะเกิดการหดตัวเล็กน้อย
4. การแผ่รังสีแกมมา (Gamma radiation) การใช้รังสีแกมมาฉายลำแสงลงบนวัสดุซึ่งเป็นลำแสงที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เกือบทุกชนิด เป็นวิธีที่ไม่มีสารเคมีตกค้าง และใช้ระยะเวลาสั้น แต่ไม่เหมาะกับชิ้นงานที่มีความหนาเนื่องจากลำแสงมีอำนาจทะลุทะลวงต่ำได้เพียงระดับไมครอนเท่านั้น อีกทั้งรังสีจะส่งผลต่อวัสดุที่มีโครงสร้างแบบพอลิเมอร์ร่างแหอาจเกิดการสลายตัวของสายโซ่พอลิเมอร์ได้
5. การฉายลำแสงอิเล็กตรอน (Electron beam radiation) การใช้ลำแสงอิเล็กตรอนที่ได้จากเครื่องเร่งอนุภาคอิเล็กตรอนฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เป็นวิธีที่นิยมในทางอุตสาหกรรมหลากหลายชนิดเนื่องจากอิเล็กตรอนมีพลังงานสูงสามารถทะลุทะลวงได้ถึงระดับเซนติเมตรซึ่งขึ้นอยู่กับพลังงานที่ใช้ และใช้ระยะเวลาสั้น ข้อควรระวังคือลำแสงจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสายโซ่ของวัสดุที่มีโครงสร้างแบบพอลิเมอร์ร่างแห และยังมีต้นทุนสูงอีกด้วย

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**S.H. Kwon และคณะ**<sup>(4)</sup> ศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่ได้จากการตกตะกอนร่วมระหว่าง  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  กับ  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  โดยมีการปรับค่า Ca/P เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 0.67 ถึง 1.55 และควบคุมค่า pH ของสารละลาย จากผลการทดลองพบว่าสารละลายที่ปรับ pH เท่ากับ 7.4 วิเคราะห์ค่า Ca/P หลังตกตะกอนได้ประมาณ 1.5 ในทุกช่วงของค่า Ca/P เริ่มต้น ในขณะที่สารละลายที่ปรับ pH เท่ากับ 8.0 วิเคราะห์ค่า Ca/P หลังตกตะกอนได้แตกต่างกันโดยจะขึ้นอยู่กับค่า Ca/P เริ่มต้น ต่อมานำสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่ได้จากการตกตะกอนซึ่งมีค่า Ca/P แตกต่างกันผ่านกระบวนการทางความร้อนที่อุณหภูมิสูง พบว่าสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่มีค่า Ca/P ประมาณ 1.5 เมื่อเผาแล้วจะเกิดไตรแคลเซียมฟอสเฟตอย่างเดียวนั้น ในขณะที่สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่มีค่า Ca/P มากกว่า 1.5 เมื่อเผาแล้วจะปรากฏเฟสผสมของบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตและไฮดรอกซีอะพาไทต์อย่างชัดเจนที่อุณหภูมิ 1150 องศาเซลเซียส

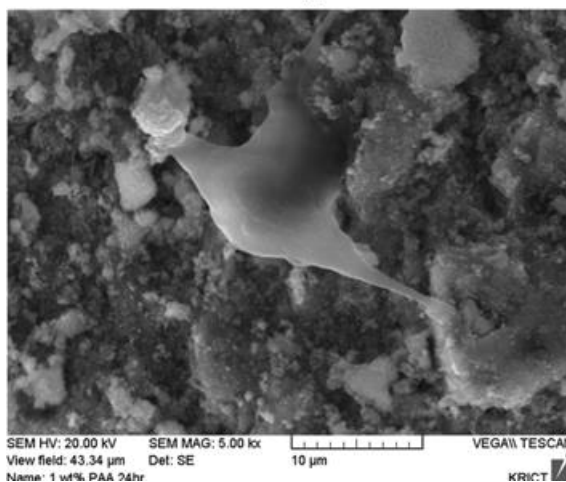
**C.K. Hsu**<sup>[11]</sup> ทำการศึกษาผสมสาร  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{CaCO}_3$  โดยปรับอัตราส่วนเริ่มต้นของแคลเซียม/ฟอสฟอรัสอยู่ในช่วงระหว่าง 1.5 ถึง 2.0 พบว่าจะปรากฏเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์เมื่อเผาที่อุณหภูมิสูง

**M. Bohner และคณะ**<sup>(13)</sup> สังเคราะห์ไตรแคลเซียมฟอสเฟตแบบรูพรุนโดยใช้น้ำมันพาราฟินสร้างรูพรุนระดับมหภาค และใช้พอลิอีโทธิลีนเททราแคสเตอร์ออยล์ (Polyethoxylated castor oil, PECO) เป็นอิมัลซิไฟเออร์ เมื่อปรับปริมาณของ PECO ลดลงส่งผลให้รูพรุนระดับมหภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น และรูพรุนที่ได้เป็นทรงกลม นอกจากนี้ปริมาณของ PECO ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนระดับจุลภาค รูพรุนระดับจุลภาคที่ปรากฏเป็นทรงยาวและมีความต่อเนื่องอย่างสมบูรณ์

**C. Stahli และคณะ**<sup>(12)</sup> ศึกษาการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนชนิดบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต โดยใช้ไตรแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารตั้งต้น และใช้น้ำมันพาราฟินสร้างรูพรุนระดับมหภาค จากการทดลองพบว่าสามารถควบคุมเฟสที่เกิดขึ้นได้โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตโดยปรับ Ca/P ให้อยู่ในช่วง 1.45 ถึง 1.50 ขนาดของรูพรุนระดับมหภาคไม่ขึ้นกับ Ca/P และอุณหภูมิการเผา จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ารูพรุนระดับมหภาคที่เกิดขึ้นเกิดจากน้ำมันพาราฟินเท่านั้นซึ่งไม่ขึ้นกับการปรับเปลี่ยนปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตของสารตั้งต้น

**F. Zhang และคณะ**<sup>[16]</sup> เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์บีตาไตรแคลเซียมให้มีลักษณะคล้ายกับกระดูกตามธรรมชาติของมนุษย์คือด้านนอกมีลักษณะเป็นเนื้อแน่นและด้านในมีลักษณะเป็นรูพรุน ด้วยกระบวนการฉีดขึ้นรูปวัสดุผง พบว่าสัดส่วนของกระดูกเนื้อแน่นและกระดูกพรุนส่งผลต่อความแข็งแรงของกระดูก และลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกจริงตามธรรมชาติทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุน ทำให้สามารถทนต่อแรงกดได้ดี มีสมบัติเชิงกลสูงขึ้น ทำให้สามารถใช้งานได้หลากหลายมากขึ้น

**S.S. Kim และคณะ**<sup>(40)</sup> ศึกษาการเตรียมแอลฟาไตรแคลเซียมฟอสเฟตซีเมนต์โดยใช้กรดพอลิอะคริลิก (PAA) ซึ่งเป็นกรดพอลิอะมิโนที่สามารถละลายตัวได้ทางชีวภาพชนิดหนึ่งเพื่อเพิ่มความแข็งแรงในการยึดติด (cohesive strength) พบว่าการมีส่วนร่วม (incorporation) ของ PAA ในโครงสร้างของแอลฟาแคลเซียมฟอสเฟตไม่ส่งผลต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ แสดงดังภาพที่ 2.9 จากภาพแสดงให้เห็นว่าการใช้ PAA เพื่อเพิ่มความแข็งแรงยังคงทำให้เซลล์สามารถแผ่ตัวได้ดีบนวัสดุซึ่งชี้ให้เห็นถึงสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี



ภาพที่ 2.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด Saos-2 ลงบนแคลเซียมฟอสเฟตที่ประกอบด้วย 1% PAA<sup>(40)</sup>

**N. Kivark และ A. Cuneyt**<sup>(17)</sup> ทำการสังเคราะห์และศึกษาพฤติกรรมของ BCP ที่เฝ้าที่อุณหภูมิสูง จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการตกตะกอน BCP ที่เตรียมได้จากกระบวนการตกตะกอนทางเคมี (chemical precipitation) สามารถกำหนดปริมาณของ HAp ได้ตั้งแต่ 20-90% (โดยน้ำหนัก) โดยที่ 10% HAp จะมีความสมดุลกับเฟส TCP โดยที่องค์ประกอบ HAp  $\geq 60\%$  จะไปเพิ่มความเสถียรของระดับ BCP ให้มากขึ้น จากนั้นนำไปเฝ้าที่อุณหภูมิ 1100-1300 °C โดยที่ความหนาแน่นที่ได้สูงสุดมีค่าเกือบ 99% ในช่วงอุณหภูมิ 1100-1200 องศาเซลเซียส

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะเตรียมโครงข่ายเซลล์เคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วยส่วนเนื้อพรุนด้านในและเนื้อแน่นด้านนอก ในส่วนของเนื้อพรุนด้านในนั้นถือเป็นส่วนสำคัญที่จะเป็นที่ให้เซลล์กระดูกเข้าไปอาศัยอยู่และเกิดกระบวนการสร้างกระดูกต่อไป ในส่วนนี้ผู้วิจัยเลือกใช้น้ำมันพาราฟินเป็นสารก่อรูพรุน และ PECO เป็นอิมัลซิไฟเออร์ทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อสร้างรูพรุนระดับมหภาค และใช้ PAA ช่วยให้ได้ละอุนภาคยึดเกาะกันดีขึ้นทำให้สามารถขึ้นรูปโครงข่ายเซลล์ได้ โดยศึกษาผลของสารพอลิเมอร์ตัวเติมที่มีผลต่อส่วนเนื้อพรุนในโครงข่ายเซลล์ โดยเลือกน้ำมันพาราฟินที่มีความหนืดต่างกัน และ PAA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน จากนั้นนำชิ้นงานที่มีอัตราส่วนของสารตัวเติมที่ดีที่สุดไปผ่านกระบวนการเผาผนึกเพื่อได้สารประกอบอินทรีย์ออกขึ้นรูปเป็นโครงข่ายเซลล์แบบรูพรุน แล้วจึงนำชิ้นงานแบบเนื้อพรุนไปอัดขึ้นรูปกับผงไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นชั้นนอก ให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ โดยคาดหวังว่าจะได้โครงข่ายเซลล์ที่ประกอบด้วยปีตาไทรแคลเซียมฟอสเฟตและไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุนระดับมหภาค และรูพรุนที่ได้มีความต่อเนื่องมีส่วนชั้นในโครงสร้างเนื้อพรุนส่วนชั้นนอกโครงสร้างเนื้อแน่น มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ อีกทั้งศึกษาผลสารตัวเติมน้ำมันพาราฟิน และ PAA ต่อโครงข่ายเซลล์ ต่อมาจึงศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงข่ายเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก

#### 3.1 สารเคมีและวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แบ่งออกเป็นสองส่วนคือสารเคมีสำหรับการเตรียมโครงข่ายเซลล์และสารเคมีสำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยสังเคราะห์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสได้จากการผสมกันระหว่างแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนต ส่วนการสร้างรูพรุนของโครงข่ายเซลล์ได้จากการใช้สารในกลุ่มพอลิเมอร์ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้



### 3.1.1 วัสดุติบและสารเคมีสำหรับการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์

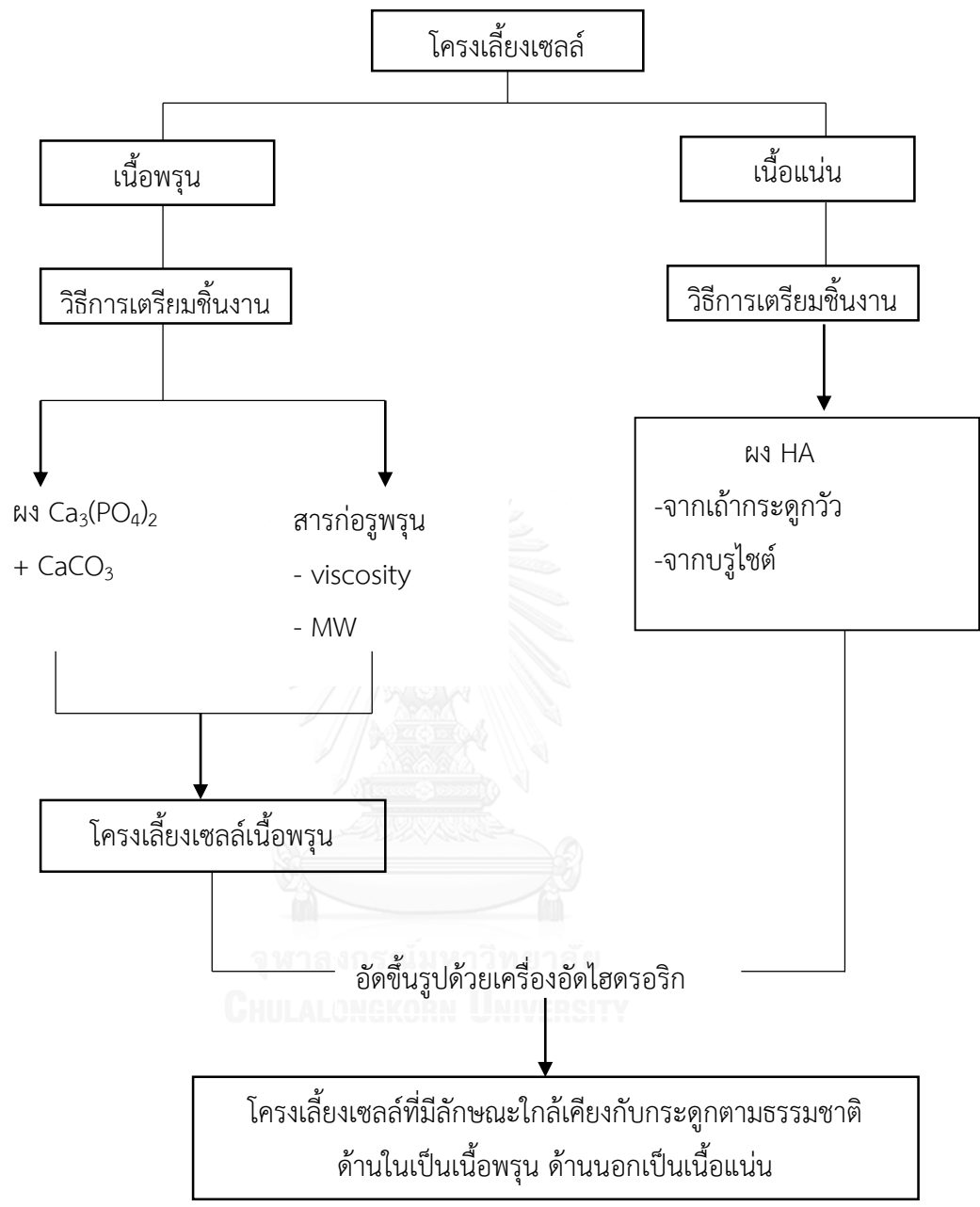
- 1) แคลเซียมฟอสเฟต ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ของบริษัท Merck รหัส 1.02143
- 2) แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) ของบริษัท Ajax Finechem รหัส AF503307
- 3) น้ำมันพาราฟินของบริษัท fluka (for IR-spectroscopy) ความหนืด 100-145 mPa.s,
- 4) น้ำมันพาราฟินของบริษัท Aldrich (grade puriss) ความหนืด 110-230 mPa.s
- 5) พอลิอิโพรพิลีนไกลีคอล (PECO) ของบริษัท Sigma (Cremophore®) รหัส BCBC5480
- 6) กรดพอลิอะคริลิก (PAA) ของบริษัท Aldrich รหัส 323667 น้ำหนักโมเลกุล 1800
- 7) กรดพอลิอะคริลิก (PAA) ของบริษัท Sigma-Aldrich น้ำหนักโมเลกุล 5000

### 3.1.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกหนู (ST2)

- 1) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ของบริษัท GIBCO®
- 2) Fetal Bovine Serum (FBS) ของบริษัท GIBCO® รหัส 10270
- 3) L-glutamine ของบริษัท GIBCO® (GlutaMAX™) รหัส 35050
- 4) Antibiotic ของบริษัท GIBCO® รหัส 15240
- 5) Phosphate Buffered Saline (PBS)
- 6) Trypsin ที่ 0.25 % Vol ของบริษัท GIBCO® รหัส 25200
- 7) Glutaraldehyde ที่ 2.5 % Vol
- 8) Stromal cell 2 (ST2)

### 3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1) ปีกเกอร์ กระบอทดวง ชั้นตักสาร
- 2) หลอดทดลอง หลอดหยด
- 3) เครื่องชั่งตวงถนียม 4 ตำแหน่ง
- 4) กระจกกรองเบอร์ 42
- 5) กระจกนาฬิกา แห่งแก้ว
- 6) ตู้ดูดควัน
- 7) จานเพาะเชื้อ
- 8) เครื่องขีดและกระดาษทรายเบอร์ 600 และ 1200



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ

### 3.2 วิธีศึกษาผลของสารตัวเติมน้ำมันพาราฟินและ PAA ต่อสมบัติโครงเลี้ยงเซลล์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของนางสาวพัลลภา ตระกูลวรรณชัย<sup>(57)</sup> ได้มีการทดสอบอัตราส่วนของสารพอลิเมอร์ตัวเติมจนได้อัตราส่วนที่ดีที่สุด แต่ยังไม่ได้มีการทดสอบเปรียบเทียบผลของความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลของสารพอลิเมอร์ตัวเติมว่ามีผลต่อรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์หรือไม่

งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาผลของสารตัวเติมน้ำมันพาราฟินและ PAA ที่มีความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลต่างกันตามลำดับต่อลักษณะโครงสร้างรูพรุนและเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์

#### 3.2.1 การเตรียมส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟต

นำแคลเซียมฟอสเฟต ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) โดยคำนวณสัดส่วนของส่วนผสมให้อัตราส่วนโมลระหว่าง Ca/P อยู่ในช่วง 1.78 ดังตาราง 3.1<sup>(57)</sup> จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดบรรจุลงในขวดพลาสติก PE ชนิดความหนาแน่นสูง ขนาด 60 มิลลิลิตร และนำขวดพลาสติกวางลงในรางของเครื่องผสมที่ควบคุมความเร็วให้หมุนด้วยความเร็ว 70 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การผสมส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟตสำหรับงานวิจัยครั้งนี้เป็นการผสมแบบแห้ง (dry blending) โดยปราศจากการเติมลูกบดเนื่องจากป้องกันการปนเปื้อนที่จะเกิดขึ้น

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของส่วนผสม ที่ Ca/P = 1.78<sup>(57)</sup>

แคลเซียมฟอสเฟต ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (กรัม)	แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ )		แคลเซียม (Ca) %โดยโมล	Ca/P mole ratio
	กรัม	%โดยโมล		
10	0.8067	0.0081	0.25	1.78

#### 3.2.2 วิธีศึกษาผลของการเติมน้ำมันพาราฟินและ PAA

ในการศึกษานี้เลือกน้ำมันพาราฟินที่มีความหนืดแตกต่างกัน 2 ชนิด และ PAA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 2 ชนิดมาใช้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาผลของสารตัวเติมต่อโครงเลี้ยงเซลล์

### 3.2.3. การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์

#### 3.2.3.1 โครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุณ

สารเคมีสำหรับการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อสร้างโครงสร้างรูพรุณในงานวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วย ส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟต (ตารางที่ 3.1) น้ำมันพาราฟิน PECO และPAA เพื่อศึกษาผลของสารตัวเติมที่มีต่อโครงเลี้ยงเซลล์ จึงทำการแบ่งส่วนผสมทั้งหมดเป็น 4 ชุด ประกอบด้วย ชุดที่ 1 ใช้ 1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 1800 และน้ำมันพาราฟินความหนืด 100-145 mPa.s ชุดที่ 2 ใช้ 1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 5000 และน้ำมันพาราฟินความหนืด 100-145 mPa.s ชุดที่ 3 ใช้ 1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 1800 และน้ำมันพาราฟินความหนืด 110-230 mPa.s ชุดที่ 4 ใช้ 1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 5000 และน้ำมันพาราฟินความหนืด 110-230 mPa.s ทุกสูตรกำหนดให้ส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟตเท่ากันคือ 8 กรัม และปริมาตร PECO 4 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.2

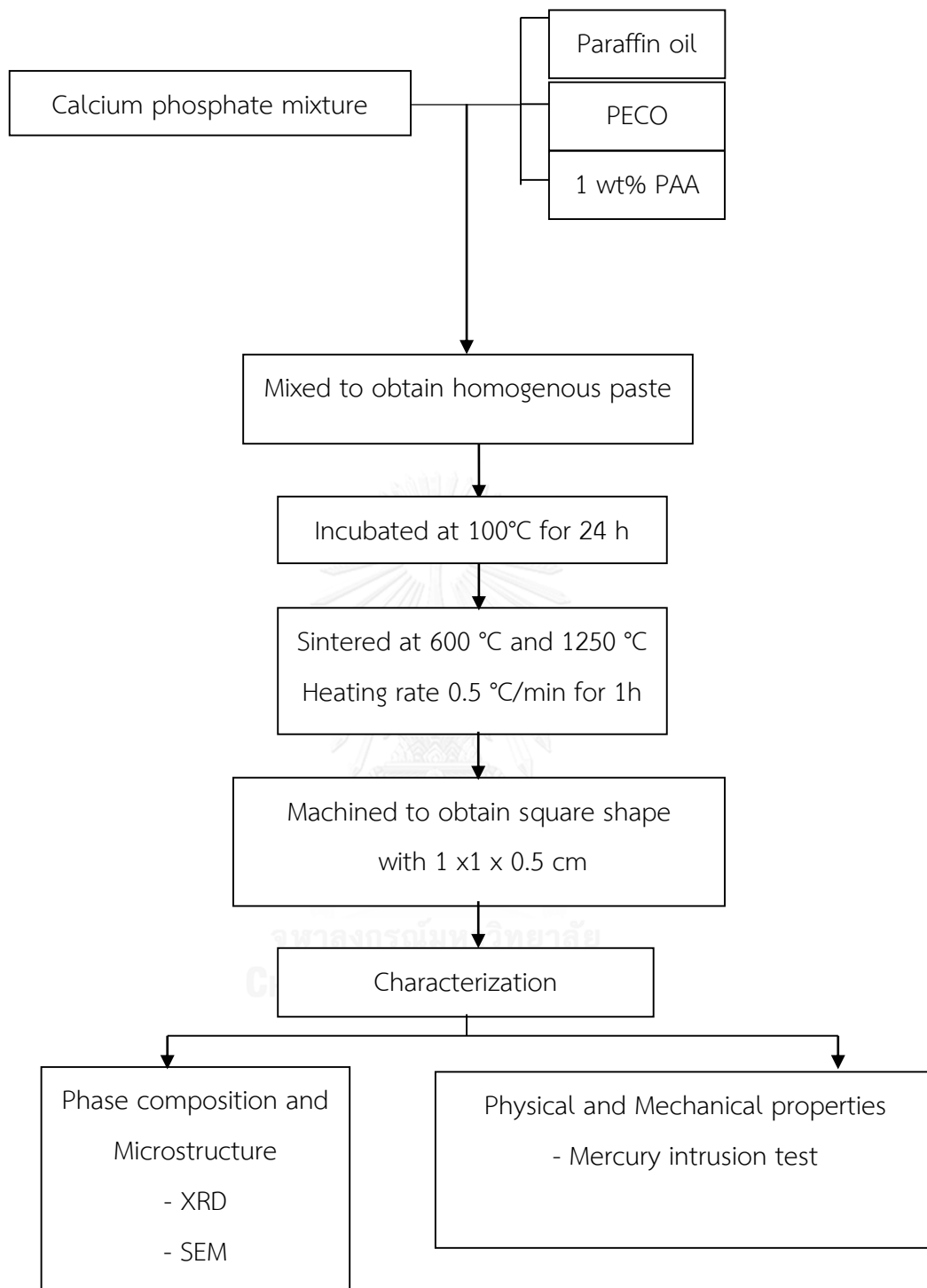
นำน้ำมันพาราฟิน PECO และPAA ใส่ในบีกเกอร์และปั่นด้วยแท่งแม่เหล็กนาน 60 ถึง 70 วินาที จนผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟตลงในบีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วกวนต่อจนส่วนผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันมีสีเนียนสีขาว แต่ละสูตรที่มีการปรับเปลี่ยนส่วนผสมจะมีความหนืดแตกต่างกันไป ต่อมาปั่นขึ้นงานให้มีลักษณะเป็นทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร วางบนจานรองขึ้นงาน ควรทำด้วยกรีสวางขึ้นงานทุกครั้งเพื่อป้องกันการติดของขึ้นงาน และนำขึ้นงานที่วางบนจานรองอบในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงเพื่อกำจัดน้ำและความชื้นจนกระทั่งขึ้นงานแห้งและแข็งตัว

นำขึ้นงานบรรจุลงในถ้วยอะลูมินาแบบมีฝาปิดและเผาในเตาไฟฟ้าภายใต้บรรยากาศออกซิเดชันโดยมีเงื่อนไขการเผา 2 ขั้นตอนคืออุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อนที่ 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และเย็นไฟคงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อนที่ 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และเย็นไฟคงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเช่นกัน สำหรับขั้นตอนแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดสารกลุ่มพอลิเมอร์ออกจากขึ้นงานเพื่อสร้างรูพรุณในโครงสร้าง ส่วนขั้นตอนที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเฟสตามที่ต้องการ จากนั้นนำขึ้นงานออกจากเตาและขัดด้วยกระดาษทรายเบอร์ 600 และ 1200 ตามลำดับเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค เฟสองค์ประกอบ และการกระจายของขนาดรูพรุณ

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมของการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ของแคลเซียมฟอสเฟต

★ สูตร 1	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 100-145 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนัก โมเลกุล 1800 6 มิลลิลิตร
สูตร 2	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 100-145 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนัก โมเลกุล 5000 6 มิลลิลิตร
สูตร 3	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 110-230 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนัก โมเลกุล 1800 6 มิลลิลิตร
สูตร 4	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 110-230 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนัก โมเลกุล 5000 6 มิลลิลิตร

★ สูตรดั้งเดิมจากงานวิจัยของนางสาวพัลลภา ตรีภูววรรณชัย<sup>(57)</sup>



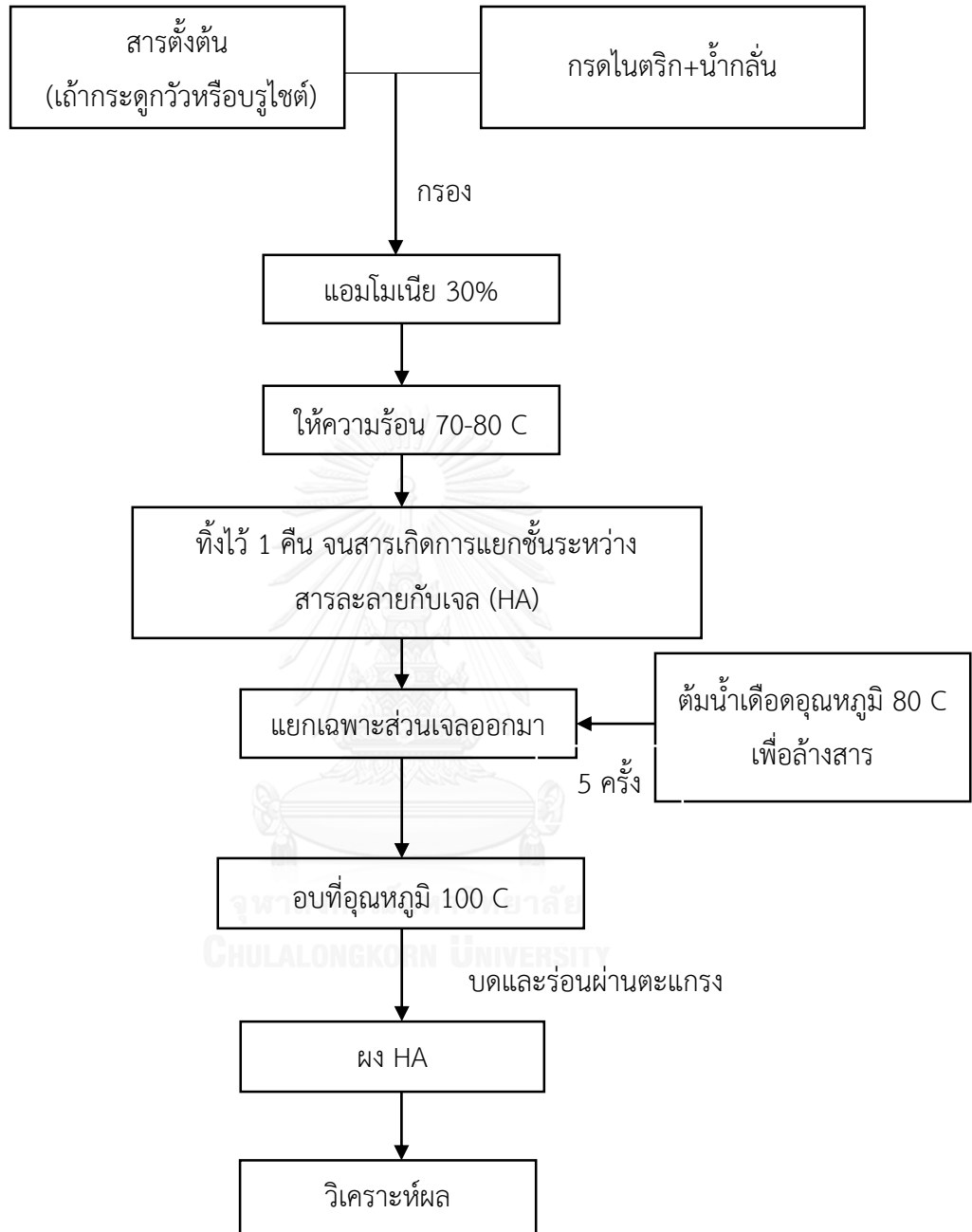
ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการศึกษาผลการเติมน้ำมันพาราฟินและ PAA ต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

### 3.2.3.2 โคร่งเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่น

เตรียมโคร่งเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่นจากผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์จากวิธีการตกตะกอน โดยทดลองเตรียมจากเก้ากระดุกัวและบรูไซต์(Brushite) เนื่องจากส่วนเนื้อแน่นของโคร่งเลี้ยงเซลล์เป็นส่วนนอกสุดที่สัมผัสกับสารละลายในร่างกาย จึงเลือกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีความเสถียรสูงกว่าแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสในการขึ้นรูป

ข้อดีของกระบวนการตกตะกอนคือปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ตั้งแต่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 °C ถึงอุณหภูมิน้ำเดือดประมาณ 95°C ถึง 100 °C ทำให้ได้ผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ระดับนาโนเมตรรูปเข็ม รูปแท่งหรือรูปค้อนข้างกลม



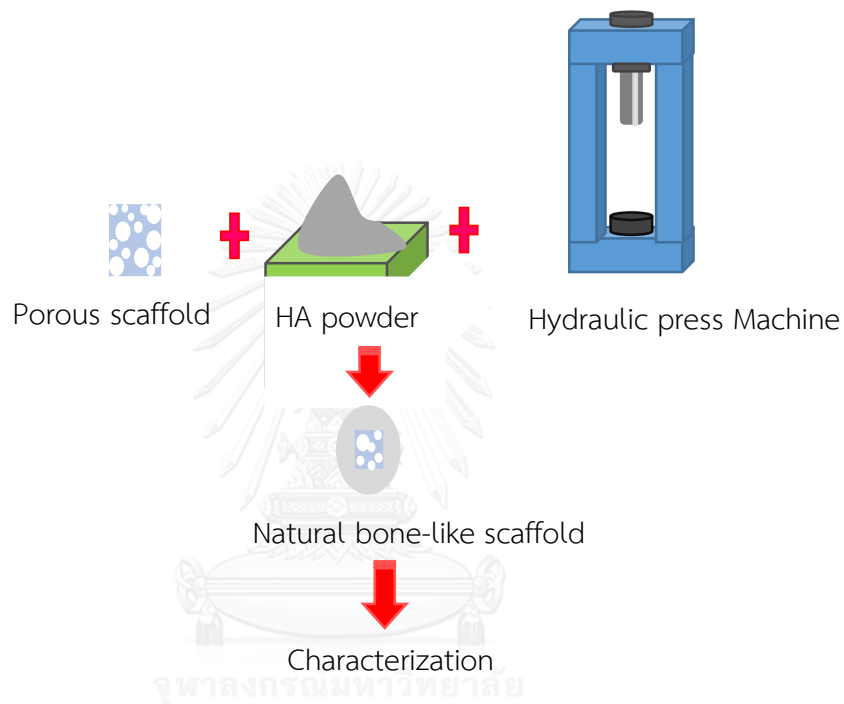


ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ผงไฮดรอกซีอะพาไทต์



### 3.2.3.3 โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ

ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ โดยให้ส่วนเนื้อพรุนอยู่ด้านในและส่วนเนื้อแน่นอยู่ด้านนอกโดยใช้เครื่องอัดไฮดรอลิก ชั้นแรกวางโครงเลี้ยงเซลล์เนื้อพรุนที่ผ่านการขัดให้มีขนาด  $1 \times 1 \times 0.5$  เซนติเมตร ลงตรงกลางโมลที่ใช้อัดขึ้นรูป จากนั้นเทผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ได้จากการตกตะกอนลงรอบๆ ชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์เนื้อพรุน อัดขึ้นรูปโดยใช้แรง 5 MPa



ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิก

### 3.2.4. สารตัวเติมในโครงเลี้ยงเซลล์

#### 3.2.4.1 PAA (กรดพอลิอะคริลิก)

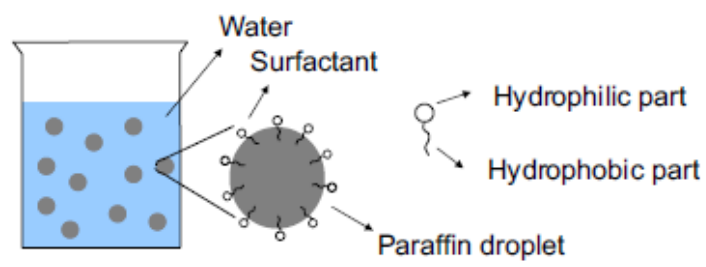
งานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ PAA เป็น structural unit ซึ่งทำหน้าที่เป็นพอลิเมอร์เมตริกซ์เนื่องจากประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก ( $\text{COO}^-$ ) จำนวนมาก PAA สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) กับแคลเซียมไอออนได้เป็น  $\text{PAA}/\text{Ca}^{2+}$  สามารถสร้างพันธะระหว่างสายหรือภายในสาย (inter or intra-chained bonding) กับแคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ซึ่งได้จากแคลเซียมฟอสเฟตด้วยปฏิกิริยาระหว่างประจุทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) กลายเป็นสายโซ่พอลิเมอร์ที่ยาวขึ้น การสร้างพันธะ  $\text{Ca-O}$  จะช่วยให้แคลเซียมฟอสเฟตกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอใน PAA matrix

#### 3.2.4.2 PECO (พอลิอีโพรซีเลทคาสเตอร์ออยล์)

งานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้น้ำมันพาราฟินและ PECO เพื่อสร้างรูพรุนระดับมหภาค โดยน้ำมันพาราฟินจะทำหน้าที่เป็นสารก่อรูพรุน (porogen) ส่วน PECO จะทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพ (stabilizer) ของน้ำมันพาราฟิน และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า PAA ช่วยให้เกิดการกระจายตัวของรูพรุนแบบแคบ (narrow size distribution) เนื่องจากต้นทุนที่ไม่สูงมากจึงนิยมใช้สังเคราะห์รูพรุนระดับไมโครหรือนาโนเมตรในอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งสามารถนำไปใช้ในงานต่างๆ อาทิเช่น ตัวดูดซับ ตัวเร่งปฏิกิริยา และโครงเลี้ยงเซลล์<sup>(60)</sup> เป็นต้น

#### 3.2.4.3 น้ำมันพาราฟิน

การเกิดรูพรุนระดับมหภาคในโครงเลี้ยงเซลล์เกิดจากหลักการน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion, o/w) โดยน้ำมันพาราฟินจะทำหน้าที่เป็นเฟสกระจาย (dispersed phase) ซึ่งเป็นอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำกระจายตัวอยู่ในน้ำซึ่งเป็นเฟสต่อเนื่อง (continuous phase) โดยปกติ น้ำมันพาราฟินและน้ำจะไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันแต่จะแยกชั้นกันอยู่อย่างชัดเจน จึงเลือกใช้ PECO ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เพื่อทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพระหว่างน้ำมันพาราฟินและน้ำให้สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่แยกชั้น เนื่องจาก PECO เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) และมีส่วนประกอบหลักเป็นไตรกลีเซอริน ส่วนประกอบรองเป็นกรดไขมันประเภท ricinoleic acid โครงสร้างของ PECO ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญได้แก่ ส่วนหัวที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) คือไตรกลีเซอริน และส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) คือกรดไขมัน ส่วนที่ชอบน้ำจะทำหน้าที่จับกับน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะจับกับน้ำมันพาราฟินที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ดังภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 การกระจายตัวของน้ำมันพาราฟินในน้ำ



สำหรับการสร้างรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์สามารถอธิบายได้จากหยดของเหลวของน้ำมันพาราฟิน (paraffin droplet) กระจายตัวอยู่ในน้ำ (PAA sol<sup>n</sup>) และมี PECO รักษาเสถียรภาพให้อยู่ในลักษณะเป็นทรงกลมกระจายทั่วชิ้นงาน นอกจากนี้ยังมีบางส่วนของแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นของแข็งเกาะอยู่บริเวณรอยต่อ (interface) ระหว่างน้ำมันกับน้ำ และมี PAA ทำหน้าที่ช่วยยึดโครงสร้างเหล่านี้ ดังนั้นน้ำมันพาราฟินที่กระจายตัวภายในชิ้นงานจึงเป็นต้นแบบรูพรุน เมื่อผ่านกระบวนการความร้อนทั้งน้ำมันพาราฟินและ PECO จะถูกกำจัดออกจากชิ้นงานจนหมดและกลายเป็นรูพรุนระดับมหภาคขึ้น



(ก)



(ข)



(ค)



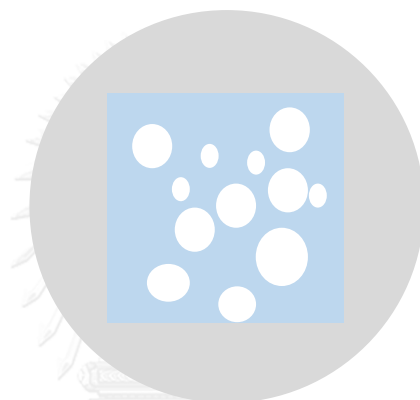
(ง)

ภาพที่ 3.6 การกระจายตัวของหยดของเหลวของน้ำมันพาราฟินใน PAA

(ก) สูตร 1 (ข) สูตร 2 (ค) สูตร 3 (ง) สูตร 4

### 3.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดุกตามธรรมชาติ

เลือกสูตรจากตารางที่ 3.2 มาใช้เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดุกตามธรรมชาติ คือด้านนอกมีลักษณะเป็นเนื้อแน่นและด้านในมีลักษณะเป็นรูพรุน ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนนั้นเตรียมด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ดังภาพ 3.1 จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนไปขึ้นรูปโครงด้านนอกโดยใช้ผง HA ด้วยเครื่องอัดไฮโดรคลอริก ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะเป็น 2 ชั้นด้านนอกเป็นเนื้อแน่นด้วยผง HA และด้านในเป็นเนื้อพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดสองเฟส จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์นี้ไปวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค เฟสองค์ประกอบ และสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 3.7 แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดุกตามธรรมชาติ  
ชั้นนอกเป็นเนื้อแน่น ชั้นในเป็นเนื้อพรุน

### 3.4 วิธีศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดุกตามธรรมชาติที่สังเคราะห์ได้จากขั้นตอนข้างต้นมาทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพเพื่อวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพเบื้องต้นของวัสดุ วิธีการทดลองเริ่มจากการเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณความเข้มข้นเหมาะสม จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ และพิจารณาการยึดเกาะของเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด โดยมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

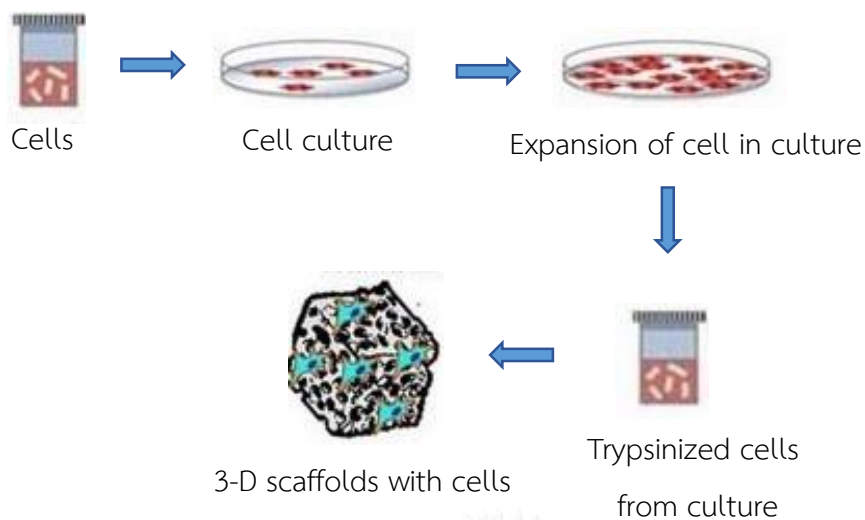
### 3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลอง (Cell Culture Preparation)

เริ่มจากนำเซลล์สร้างกระดูกชนิด ST2 ซึ่งเก็บในอาหารแช่แข็ง (Freezing medium) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาละลายและกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium) อาหารเลี้ยงเซลล์มีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.3 จากนั้นเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตรโดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และเก็บในตู้บอุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นในอากาศเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน จนเซลล์เพิ่มจำนวนหนาแน่นบนจานเพาะเชื้อ เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนจนเต็มจานเพาะเชื้อแล้วจะทำการทริปซิน (Trypsinization) ซึ่งเป็นกระบวนการใช้ทริปซินเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากจานเพาะเชื้อ

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารเคมี	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	900
10% Fetal Bovine Serum (FBS)	100
L-glutamine	10
Antibiotic	10

ทริปซิน คือเอนไซม์สำหรับย่อยโปรตีนที่เซลล์ใช้ยึดเกาะระหว่างกัน ขั้นตอนการทริปซินเริ่มจากล้างเซลล์ด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที ตูดอกและปิเปตต์ทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 วินาที ตูดอกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ต่อมาใช้ปิเปตต์ค่อยๆชะเซลล์ให้หลุดออกจากจานเพาะเชื้อ จากนั้นตูดและเก็บเซลล์ไว้ภายในหลอดทดลอง นับเซลล์ด้วย Haemocytometer เพื่อเตรียมเพาะเซลล์ (seeding) ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ต่อไปดังภาพที่ 3.8 <sup>(41)</sup>



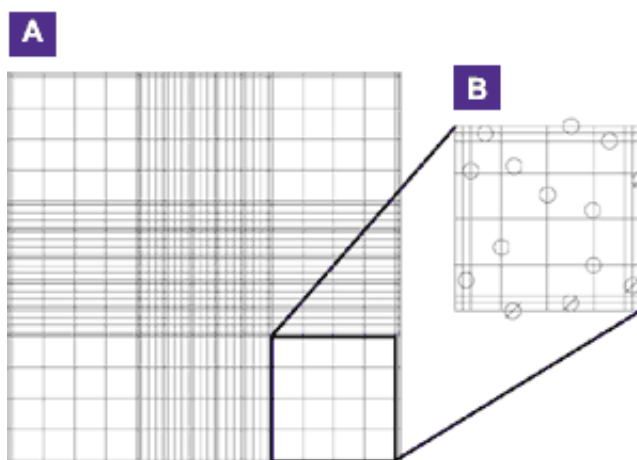
ภาพที่ 3.8 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์<sup>(41)</sup>

#### 3.4.1.1 วิธีการเตรียมและวัดความเข้มข้นของเซลล์

หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์จนมีจำนวนเต็มจานเพาะเชื้อ ต่อมาวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยอุปกรณ์ที่เรียกว่า Haemocytometer ซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 3.9 เริ่มจากดูดเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่บริเวณตำแหน่งลูกศรชี้ จากนั้นปิดด้วยสไลด์แก้วและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนเซลล์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์จะปรากฏเป็นตาราง 9 ช่อง แต่จะนับเซลล์ที่อยู่เฉพาะบริเวณพื้นที่  $Z_1$   $Z_2$   $Z_3$  และ  $Z_4$  ดังภาพที่ 3.10 ซึ่งแสดงภาพ Haemocytometer จากกล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 3.9 ลักษณะของ Haemocytometer<sup>(42)</sup>

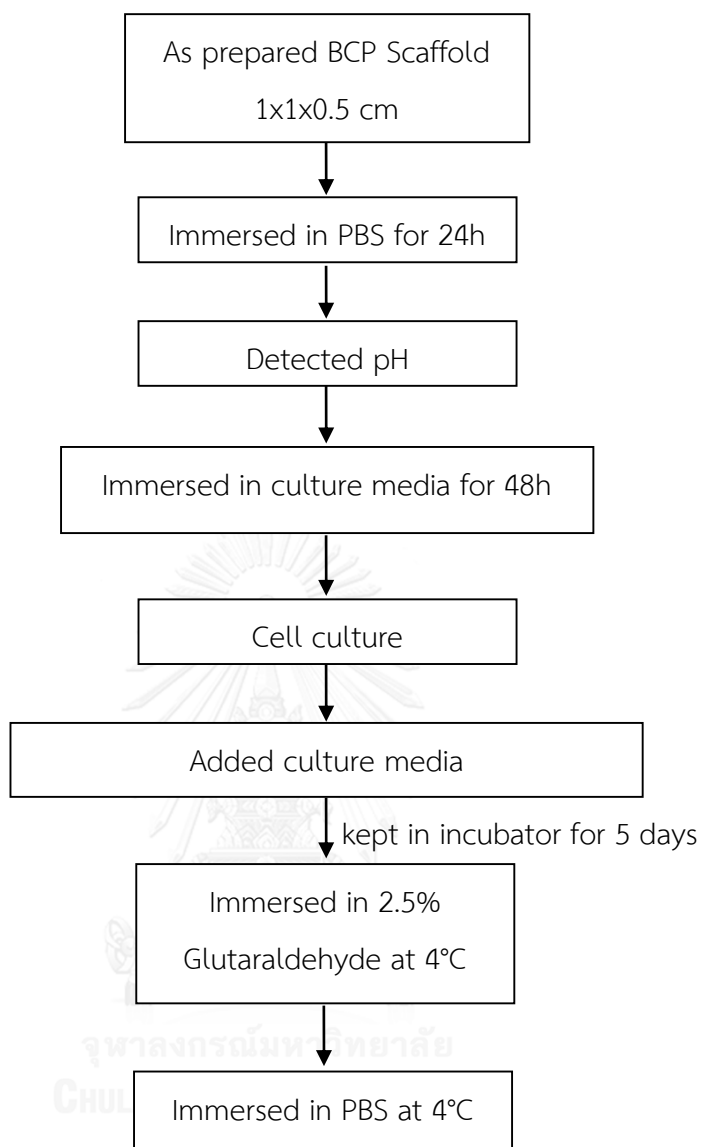


ภาพที่ 3.10 Haemacytometer จากกล้องจุลทรรศน์<sup>(43)</sup>

### 3.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์

เริ่มจากนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปขนาด  $1 \times 1 \times 0.5$  เซนติเมตร แช่ใน PBS นาน 24 ชั่วโมง (pH ของ PBS ประมาณ 7.4) เพื่อล้างสารตกค้างภายในวัสดุ และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ PBS หลังแช่ ค่า pH ที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 7-8 หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำโครงเลี้ยงเซลล์เข้าหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และนำโครงเลี้ยงเซลล์แช่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำโครงเลี้ยงเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ และเปิดเซลล์ที่ความเข้มข้น  $6 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงบนชิ้นงาน เลี้ยงเซลล์ในตู้บต่ออีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำโครงเลี้ยงเซลล์มาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์ต่อในตู้บจนครบ 5 วัน นำโครงเลี้ยงเซลล์แช่ลงในกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์จนท่วมชิ้นงานประมาณ 2 มิลลิลิตรเพื่อรักษาสภาพเซลล์ไว้ (Prefix) และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นงานแช่ใน PBS ให้ท่วมชิ้นงานประมาณ 2 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมศึกษาโครงสร้างจุลภาค

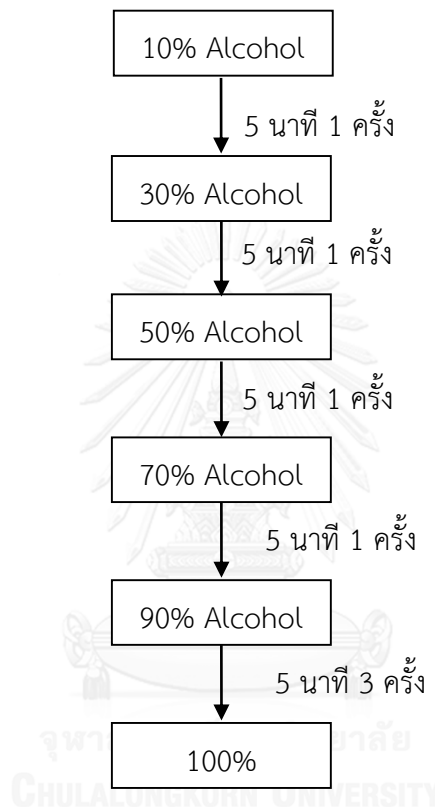




ภาพที่ 3.11 ขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

### 3.4.3 การทำวัสดุให้แห้ง (Dehydration)

เป็นการคงสภาพเซลล์บนชิ้นงาน (fix cell) เพื่อเตรียมศึกษาโครงสร้างจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หลักการคือแช่วัสดุลงในแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลำดับขั้นตอนแสดงดังภาพที่ 3.12 จากนั้นนำชิ้นงานเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) นาน 48 ชั่วโมง เมื่อชิ้นงานแห้งแล้วนำไปเคลือบทองเพื่อศึกษาโครงสร้างจุลภาค



ภาพที่ 3.12 ขั้นตอนการทำวัสดุให้แห้งในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

### 3.4.4. การทำ MTT assay

การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation) ถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อชิ้นงานทดสอบ ซึ่งส่วนใหญ่จะดูความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (Cell Cytotoxicity) ปัจจุบันมีหลากหลายวิธีที่ใช้วัด Cell Proliferation เช่น การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น รวมถึงการดูจาก metabolic activity ของเซลล์ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และเป็นที่ยอมรับมากที่สุด

MTT assay เป็นการวัด Metabolic activity ภายในเซลล์นั้น สามารถบ่งบอกว่าเซลล์นี้ยังมีพลังงานที่จะใช้ในการเพิ่มจำนวนอยู่หรือไม่ เซลล์ที่แสดงให้เห็นว่ามี metabolic activity มาก นั่นก็

หมายถึงว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยการวัด metabolism มีอยู่หลาย assay เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น MTT MTS หรือ XTT (colorimetric assay) ซึ่งหลักการและวิธีของการวัดดังกล่าวนี้คือ การวัดสภาวะ reduction environment (mitochondrial reductase) ของ mitochondria ในเซลล์ โดยเมื่อ MTT หรือ XTT ถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี formazan โดยสีจะถูกวัด absorption ที่ 570 nm ปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วย

#### 3.4.4.1 การเตรียม MTT

1. ชั่งผง MTT 2.5 g
2. ตวง DPBS 40 ml ลงใน Beaker
3. ละลาย MTT ลงใน DPBS ที่ตวงมา
4. ปรับปริมาตรในกระบอกตวง
5. กรองด้วยวิธี Negative pressure filtration

#### 3.4.4.2 การเตรียมเซลล์

1. ทำการทริบซินเซลล์ที่ต้องการศึกษาจากนั้นนำไปบ่มใน incubator (37°C) เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยง จนได้เป็น cell pellet เติม DMEM ลงไป 5 mL จากนั้นทำการ Resuspension ด้วย Pipette gun
2. แบ่งเซลล์จำนวนหนึ่งไปนับจำนวนเซลล์ใน Hemocytometer
3. เจือจางเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์ตามต้องการ (จำนวนเซลล์นี้ต้องเป็นจำนวนที่แน่นอน)
4. ใส่เซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยง.
5. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยที่เลือกแฉกๆหนึ่งเป็น blank
6. ใส่ถาดเลี้ยงเซลล์ในกล่องพลาสติกเก็บความชื้น และบ่มที่ 37°C นาน 1-3 วัน ให้เซลล์อยู่ในช่วงเหมาะสมกับการทดสอบสาร

#### 3.4.4.3 การทดสอบสาร

1. เตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบ
  2. นำอาหารออกจากหลุม โดยการดูดด้วย micro pipette แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่
  3. นำสารทดสอบใส่ให้เซลล์
  4. ใส่สารทดสอบใน petri dish แล้วดูดสารจาก petri dish ลงในหลุม
  5. นำ plate ไปใส่กล่องพลาสติกเก็บความชื้นแล้วนำไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  จนถึงเวลาที่กำหนด
  6. เมื่อครบกำหนดใส่อาหารใหม่ 200  $\mu\text{L}$  เปลี่ยนอาหารทุกวันให้ cell แบ่งตัวได้ 2-3 ครั้ง
- เปลี่ยนอาหารด้วยอาหารใหม่ 200  $\mu\text{L}$  แล้วเติม MTT 50  $\mu\text{L}$  ลงทุกหลุม

#### 3.4.4.4 การเติม MTT

1. นำ well plate ไปบ่มอย่างน้อย 4-8 ชั่วโมงในกล่องเก็บความชื้นที่  $37^{\circ}\text{C}$
2. นำอาหารและ MTT ออกจากหลุม
3. เติม DMSO 200  $\mu\text{L}$  เพื่อละลาย MTT-formazan complex
4. เติม glycine buffer 25  $\mu\text{L}$  ทุกหลุมที่มี DMSO
5. จะเห็นว่าเริ่มมีสีเกิดขึ้น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ทันทีเพราะ MTT-formazan complex ไม่เสถียร

#### 3.4.4.5 การวิเคราะห์ผล

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นสารเคมีที่นำมาใช้ทดสอบระหว่างชิ้นงานทดสอบและ control

### 3.5 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของสารตั้งต้น และโครงสร้างเซลล์ที่เตรียมขึ้น

#### 3.5.1 เฟสองค์ประกอบ (Phase composition)

ศึกษาเฟสองค์ประกอบของแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนต ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) รุ่น D8-Advance ผลิตโดยบริษัท Bruker โดยใช้ Cu-K $\alpha$  radiation ที่ scanning speed 2.4 องศาต่อนาที ในช่วงมุม  $2\theta$  ตั้งแต่ 5 ถึง 80 องศา

#### 3.5.2 เฟสองค์ประกอบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

ศึกษาองค์ประกอบทางเฟสเชิงคุณภาพ (Qualitative) ของแคลเซียมฟอสเฟตที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหลังเผาที่อุณหภูมิต่างๆ ส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟต และโครงสร้างเซลล์ที่มีการเติมสารกลุ่มพอลิเมอร์ ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer รุ่น D8-Advance ผลิตโดยบริษัท Bruker โดยใช้ Cu - K $\alpha$  radiation ที่ 40 kV 40 mA ใช้ scanning speed 2.4 องศาต่อนาที ในช่วงมุม  $2\theta$  ตั้งแต่ 5 ถึง 80 องศา

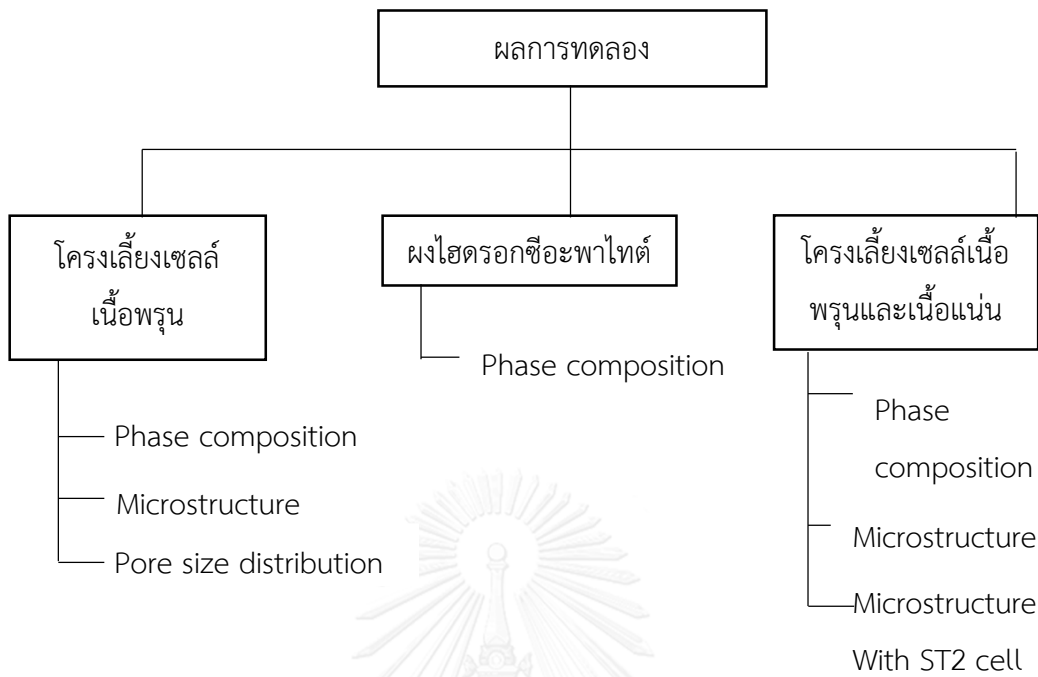
ศึกษาองค์ประกอบทางเฟสเชิงปริมาณ (Quantitative) โดยใช้ Cu - K $\alpha$  radiation ที่ scanning speed 0.01 องศาต่อนาที ในช่วงมุม  $2\theta$  ตั้งแต่ 10 ถึง 70 องศา และคำนวณเชิงปริมาณโดยใช้ Rietveld Refinement Analysis ด้วยโปรแกรม TOPAS software (version 2.1)

#### 3.5.3 โครงสร้างจุลภาค

ชิ้นงานหลังเผาที่ได้ถูกตัดขวาง (cross section) เพื่อดูลักษณะตลอดจนรูปร่างของอนุภาค และรูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) รุ่น JSM - 6480LV ผลิตโดยบริษัท JEOL

#### 3.5.4 การกระจายขนาดรูพรุน (Pore size distribution)

วิเคราะห์ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงสร้างเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตด้วยเครื่อง Mercury Porosimetry ยี่ห้อ Pore Master บริษัท Quantachrome instrument ใช้แรงดัน 5000 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นการวัดรูพรุนโดยใช้ปรอท และใช้แรงดันดันปรอทให้แทนที่รูพรุนในชิ้นงาน



ภาพที่ 3.13 การทดสอบสมบัติโครงเลี้ยงเซลล์

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ได้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดสองเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ โดยมีการเลือกศึกษาผลของสารตัวเติมที่มีผลต่อรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์คือ ผลของความหนืดของน้ำมันพาราฟินและน้ำหนักโมเลกุลของ PAA ต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ และศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อตรวจวิเคราะห์ในเบื้องต้นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้เป็นวัสดุชีวภาพที่สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

#### 4.1 โครงเลี้ยงเซลล์เนื้อพรุน



ภาพที่ 4.1 โครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุนหลังขัด

##### 4.1.1 ผลการวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบ

จากงานวิจัยของ S.H. Kwon และคณะ<sup>(4)</sup> กล่าวว่า อุณหภูมิการเผามีอิทธิพลต่อการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์เมื่อแคลเซียมฟอสเฟตมีค่า Ca/P ก่อนเผามากกว่า 1.5 และจากงานวิจัยของนางสาวพัลลภา ตระกูลวรรณชัย<sup>(57)</sup> ทดลองเลือกอุณหภูมิการเผาที่มีผลต่อเฟสองค์ประกอบแคลเซียมฟอสเฟต พบว่าสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงเฟสเป็นไตรแคลเซียมฟอสเฟตบริสุทธิ์ได้ในช่วงอุณหภูมิ 1000 ถึง 1250 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส เพื่อสร้างโครงเลี้ยงเซลล์เนื่องจากการเผาที่อุณหภูมิสูงจะทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากกว่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่า

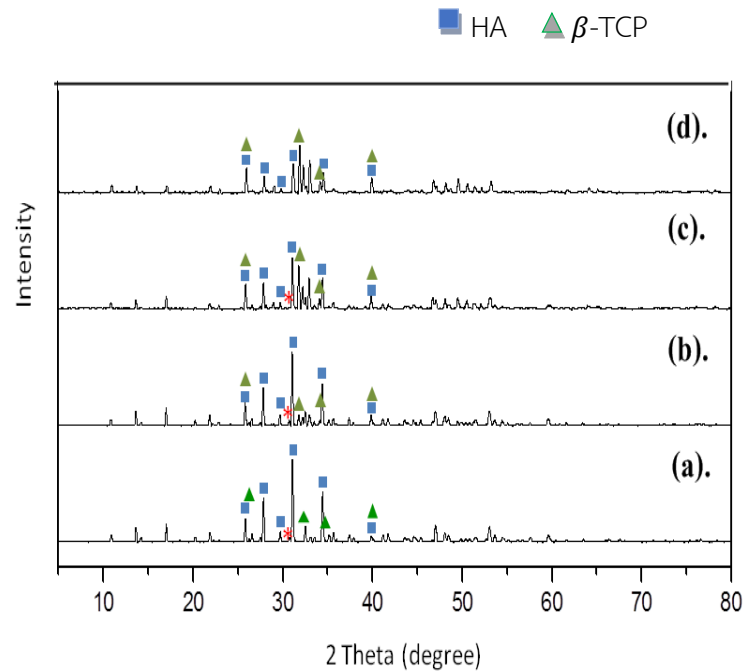
(44)

ตารางที่ 4.1 ส่วนผสมของการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ของแคลเซียมฟอสเฟต

★ สูตร 1	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 100-145 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 1800 6 มิลลิลิตร
สูตร 2	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 100-145 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 5000 6 มิลลิลิตร
สูตร 3	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 110-230 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 1800 6 มิลลิลิตร
สูตร 4	ส่วนผสม แคลเซียมฟอสเฟต 8 กรัม	น้ำมันพาราฟิน ความหนืด 110-230 mPa.s 5 กรัม	PECO 4 มิลลิลิตร	1%PAA น้ำหนักโมเลกุล 5000 6 มิลลิลิตร

★ สูตรดั้งเดิมจากงานวิจัยของนางสาวพัลลภา ตรีภูววรรณชัย<sup>(57)</sup>





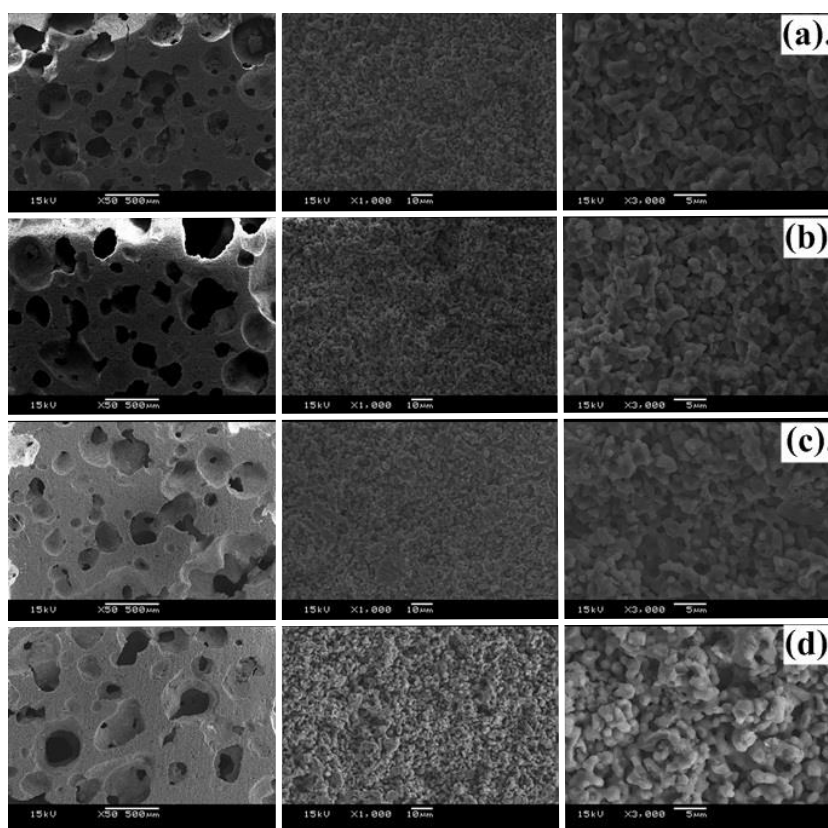
ภาพที่ 4.2 XRD pattern เปรียบเทียบเฟสองค์ประกอบของส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟตสูตรต่างหลังเผาที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส (a) สูตร 4 (b) สูตร 3 (c) สูตร 2 (d) สูตร 1

จากการทดลองเปรียบเทียบเฟสองค์ประกอบของส่วนผสมสูตรต่างๆ พบว่าทุกสูตรขึ้นงานหลังเผาที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียสมีเฟสองค์ประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต จากงานวิจัยที่ผ่านมาบอกว่าแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสที่ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างไฮดรอกซีอะพาไทต์กับบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตเท่ากับ 60/40 มีความเหมาะสมต่อการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์เนื่องจากมีความสามารถเหนียวนำและสร้างกระดูกใหม่ได้ดี รวมถึงยังมีอัตราสลายตัวทางชีวภาพและสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม<sup>(45-46)</sup>

ผลวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบเชิงปริมาณของส่วนผสมแคลเซียมฟอสเฟตสูตร 1 ซึ่งประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์เท่ากับ 61.47 เปอร์เซ็นต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตเท่ากับ 38.53 เปอร์เซ็นต์มีค่าใกล้เคียงกับ 60/40 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มีการใช้งานอย่างมากในฐานแคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส<sup>(45-46)</sup> สูตรที่ 2 ประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ 65.32 เปอร์เซ็นต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต 34.68 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 3 ประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ 70.78 เปอร์เซ็นต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต 29.22 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์จากการที่พีคมีลักษณะแหลมสูงที่  $2\theta$  ประมาณ 32 องศา แสดงว่ามีความเป็นผลึกสูง สูตรที่ 4 ประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ 77.94 เปอร์เซ็นต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต 22.06 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์จากการที่พีคมีลักษณะแหลมสูงที่  $2\theta$  ประมาณ 32 องศา แสดงว่ามีความเป็นผลึกสูง นอกจากนี้ยังปรากฏเฟสของแอลฟาไตร

แคลเซียมฟอสเฟตบ้างเล็กน้อย เนื่องจากเผาในช่วงอุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส ซึ่งเฟสแอลฟาไตรแคลเซียมฟอสเฟตเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 1120-1430 องศาเซลเซียส

#### 4.1.2 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค



ภาพที่ 4.3 โครงสร้างจุลภาคของส่วนผสมสูตรต่างๆ

(a) สูตร 1 (b) สูตร 2 (c) สูตร 3 (d) สูตร 4

จากการวิเคราะห์ผลด้วย SEM โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 สูตรและเผาที่อุณหภูมิ 1250 องศาเซลเซียส พบว่าทุกชิ้นงานมีความพรุนตัวและรูพรุนที่ได้มีขนาดประมาณ 1-2 ไมโครเมตร ซึ่งจัดได้ว่าเป็นรูพรุนระดับจุลภาค รูพรุนระดับจุลภาค (ขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตร) ที่เกิดขึ้นนั้นมีประโยชน์ต่อการใช้งานในโครงเลี้ยงเซลล์อย่างมากโดยจะช่วยให้เกิดการไหลเวียนของเลือดในร่างกายมนุษย์และยังช่วยดูดซับโปรตีนซึ่งเป็นตัวกระตุ้นความไวทางชีวภาพของวัสดุอีกด้วย<sup>(19, 4, 7)</sup>

จากการวิเคราะห์ผล SEM โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 สูตร พบว่ารูพรุนระดับจุลภาคและมหภาค ไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวเติม

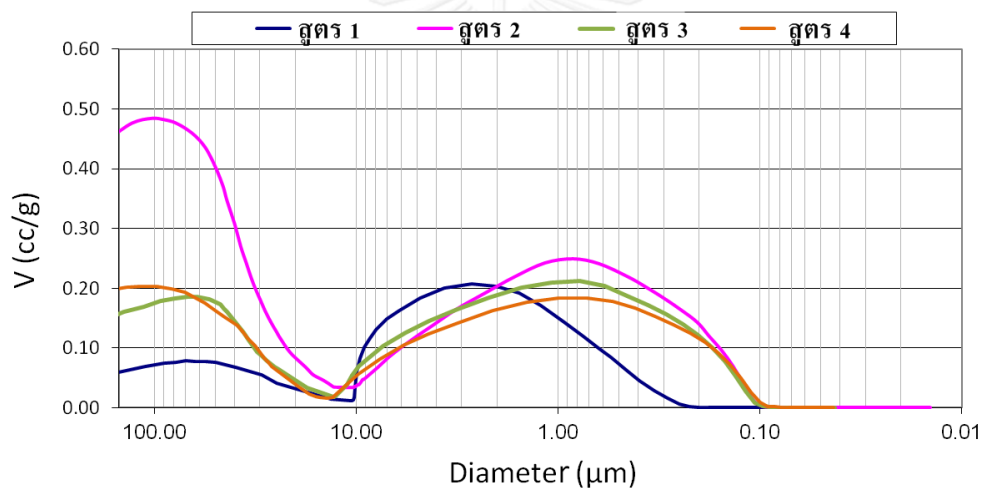
งานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้น้ำมันพาราฟินและ PECO เพื่อสร้างรูพรุนระดับมหภาค โดยน้ำมันพาราฟินจะทำหน้าที่เป็นสารก่อรูพรุน (porogen) ส่วน PECO จะทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพ (stabilizer) ของน้ำมันพาราฟิน จากผลวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ หลังขัดพื้นผิวพบว่าชิ้นงานมีรูพรุนขนาดเล็กและมีรูปร่างที่ไม่แน่นอนกระจายอยู่ในชิ้นงานเล็กน้อย อีกทั้งยังพบรอยแตก (crack) ในลักษณะรอยร้าวในบางตำแหน่งซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนการขัดชิ้นงานเนื่องจากชิ้นงานมีความเปราะ ในชิ้นงาน พบว่ารูพรุนระดับมหภาคเริ่มปรากฏขึ้น รูพรุนที่ได้มีหลายขนาดตั้งแต่ 100 ถึง 500 ไมโครเมตร แต่ละรูพรุนมีรูปร่างค่อนข้างกลมกระจายอยู่ในชิ้นงานอย่างไม่สม่ำเสมอ รูพรุนขนาดใหญ่บางส่วนมีลักษณะคล้ายรูพรุนขนาดเล็กเชื่อมติดกัน อย่างไรก็ตามทั้งสองสูตรหลังยังคงพบรอยแตกในบางตำแหน่งของชิ้นงาน เมื่อพิจารณาเนื้อแคลเซียมฟอสเฟตด้วยกำลังขยายที่สูงขึ้นถึง 1000 เท่าดังภาพ 4.3 พบว่าในเนื้อชิ้นงาน (matrix) ทุกสูตรประกอบด้วยอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตขนาดเล็กมีรูปร่างยาวรี (elongated shape) และค่อนข้างมนเชื่อมต่อกันเป็นโครงร่างและยังปรากฏรูพรุนระดับจุลภาค (เล็กกว่า 10 ไมโครเมตร) กระจายตัวอยู่ระหว่างช่องว่างของอนุภาคอย่างสม่ำเสมอขนาดประมาณ 1 ถึง 3 ไมโครเมตร จากภาพผลวิเคราะห์รูพรุนระดับจุลภาคไม่พบความแตกต่างของลักษณะรูพรุนในแต่ละสูตร ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงความหนืดน้ำมันพาราฟินและน้ำหนักโมเลกุลของ PAA มีต่อขนาดรูพรุนระดับจุลภาคใกล้เคียงกัน

#### 4.1.3 ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดรูพรุน

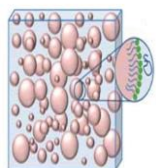
จากภาพ SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่างๆจะเห็นได้ว่าโครงสร้าง มีลักษณะใกล้เคียงกัน จึงเลือกศึกษาการกระจายตัวของขนาดรูพรุน ผลวิเคราะห์การกระจายขนาดรูพรุนด้วยเครื่อง Mercury Porosimetry แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าทุกสูตรมีลักษณะการกระจายตัวของรูพรุนสองช่วง (bimodal distribution) ประกอบด้วยรูพรุนในช่วง 0.1-10 ไมโครเมตร มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยประมาณ 1 ไมโครเมตรซึ่งจัดได้ว่าเป็นรูพรุนระดับจุลภาค และรูพรุนในช่วง 10 -200 ไมโครเมตร โดยประมาณ มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยขนาด 100 ไมโครเมตรซึ่งจัดได้ว่าเป็นรูพรุนระดับมหภาค

สำหรับรูพรุนระดับมหภาคเมื่อพิจารณาจากกราฟจะเห็นได้ว่ากราฟในช่วงนี้สูตรที่ 2 ซึ่งใช้ PAA น้ำหนักโมเลกุล 5000 และน้ำมันพาราฟินความหนืด 100-145 mPa.s แสดงการกระจายตัวของรูพรุนระดับมหภาคแตกต่างจากสูตรอื่น อาจเนื่องมาจาก สายโซ่ PAA ซึ่งทำหน้าที่เป็นพอลิเมอร์เมตริกซ์ เนื่องจากประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก ( $\text{COO}^-$ ) จำนวนมาก PAA สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) กับแคลเซียมไอออนได้เป็น  $\text{PAA/ Ca}^{2+}$  โดยโครงสร้างของสันหลัง (back bone) ของ PAA ที่เป็นหมู่คาร์บอกซิลิกและจะสร้างพันธะระหว่างสายหรือภายในสาย (inter or intra-chained boning) กับแคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ซึ่งได้จากแคลเซียมฟอสเฟตด้วยปฏิกิริยาระหว่าง

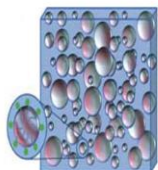
ประจุทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) กลายเป็นสายโซ่พอลิเมอร์ที่ยาวขึ้น การสร้างพันธะ Ca-O จะช่วยให้แคลเซียมฟอสเฟตกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอใน PAA matrix สำหรับการสร้างรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์สามารถอธิบายได้จากหยดของเหลวของน้ำมันพาราฟิน (paraffin droplet) กระจายตัวอยู่ในน้ำ (PAA sol<sup>n</sup>) และมี PECO รักษาเสถียรภาพให้อยู่ในลักษณะเป็นทรงกลมกระจายทั่วชิ้นงาน นอกจากนี้ยังมีบางส่วนของแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นของแข็งเกาะอยู่บริเวณรอยต่อ (interface) ระหว่างน้ำมันกับน้ำและมี PAA ทำงานร่วมกันเพื่อยึดโครงสร้างเหล่านี้ ดังนั้นน้ำมันพาราฟินที่กระจายทั่วภายในชิ้นงานจึงเป็นต้นแบบรูพรุน เมื่อผ่านกระบวนการความร้อนทั้งน้ำมันพาราฟินและ PECO จะถูกกำจัดออกจากชิ้นงานจนหมดและกลายเป็นรูพรุนระดับมหภาคขึ้น ดังภาพที่ 4.5 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ผ่านการเผาที่อุณหภูมิสูง น้ำมันพาราฟินที่ความหนืดต่ำจึงระเหยออกเร็ว อีกทั้ง PAA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากมีสายโซ่ยาว เมื่อถูกเผาไล่ออกจากชิ้นงานจึงเกิดปริมาณรูพรุนมหภาคในชิ้นงานมากกว่าสูตรอื่นๆ



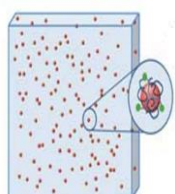
ภาพที่ 4.4 การกระจายตัวขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่างๆ



การกระจายตัวของหยดของเหลวของน้ำมันพาราฟิน

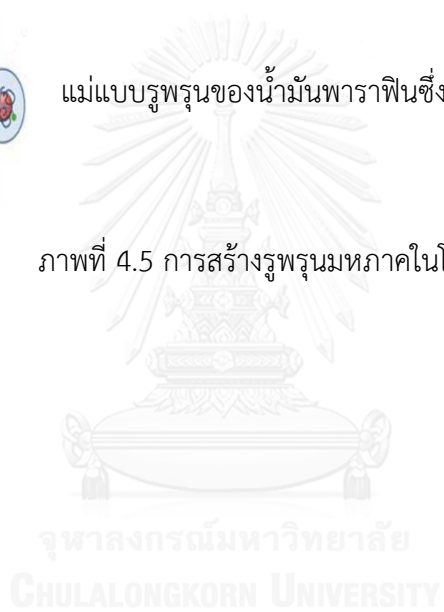


การแข็งตัวของน้ำมันในน้ำ



แม่แบบรูพรุนของน้ำมันพาราฟินซึ่งประกอบด้วย PAA

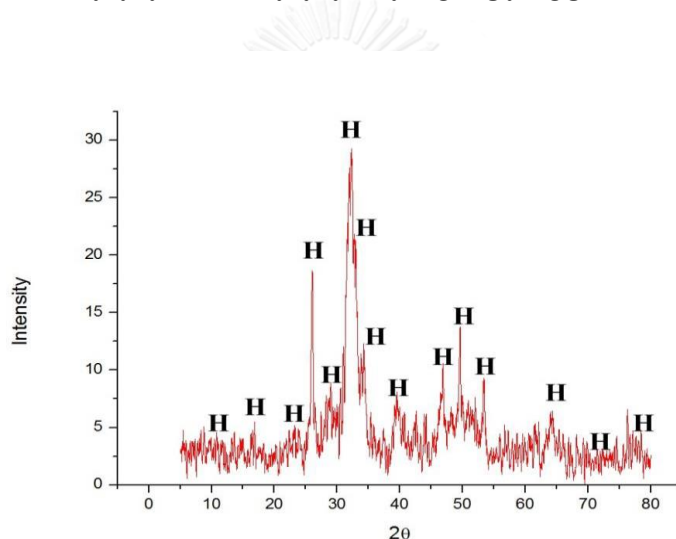
ภาพที่ 4.5 การสร้างรูพรุนมหภาคในโครงเลี้ยงเซลล์



## 4.2 โคร่งเลี้ยงเซลล์เนื้อแน่น

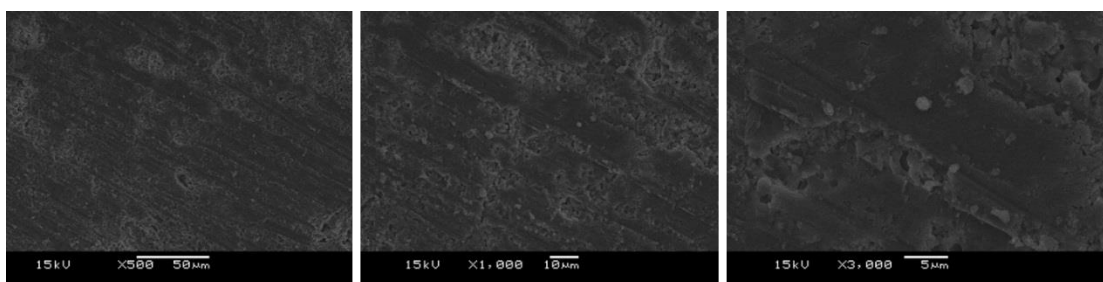
ส่วนของเนื้อแน่นขึ้นรูปจากผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ตกตะกอนจากเก้ากระดุกัวและบรูไซต์ แต่ในขั้นตอนทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพพบว่า โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปส่วนเนื้อแน่นจากไฮดรอกซีอะพาไทต์จากเก้ากระดุกัวเกิดการหลุดออกจากส่วนของเนื้อแน่นในขั้นตอนการแช่สารละลาย PBS ในขณะที่ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์จากบรูไซต์เกิดการหลุดออกน้อยมากหรือไม่หลุดออกเลย ดังนั้นในการขึ้นรูปโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติจึงเลือกใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์จากบรูไซต์

### 4.2.1 ผลการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบ



ภาพที่ 4.6 แสดงเฟสองค์ประกอบของโคร่งเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่นที่สังเคราะห์จากบรูไซต์ โดยที่ H = HA

### 4.2.2 ผลการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค

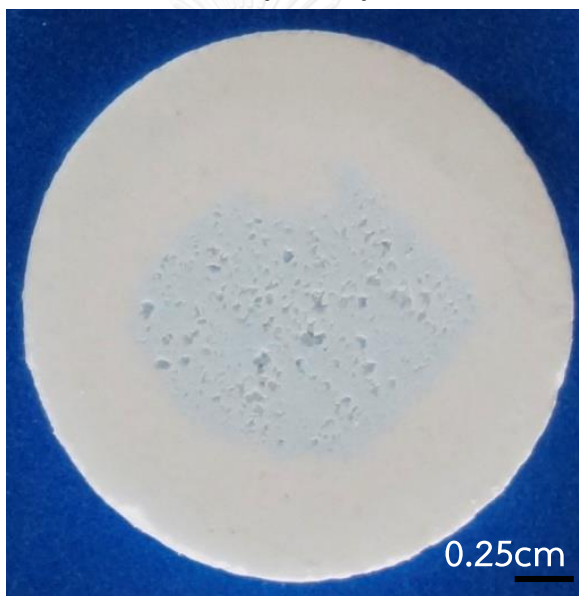


ภาพที่ 4.7 แสดงโครงสร้างจุลภาคของโคร่งเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่นที่สังเคราะห์จากบรูไซต์

จากการวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบพบว่ามีเฟสของไฮดรอกซีอะพาไทต์เกิดขึ้นตามต้องการ และจากการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคที่กำลังขยายต่างๆ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่นเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุน ไม่ปรากฏรูพรุนระดับมหภาค

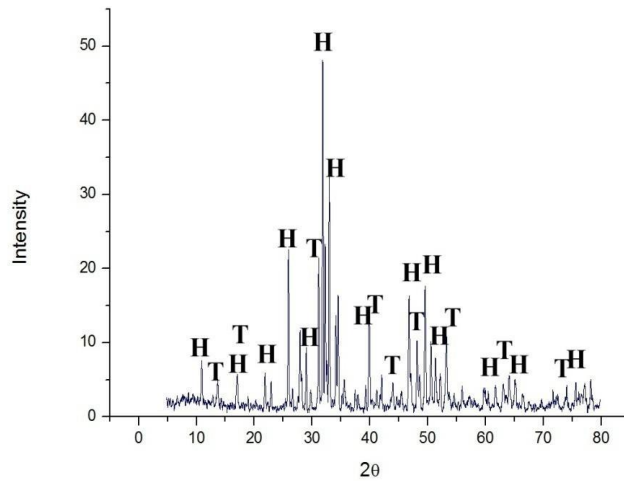
#### 4.3 โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปให้ส่วนเนื้อพรุนอยู่ด้านใน และส่วนเนื้อแน่นอยู่ด้านนอก ดังภาพ 4.8 จากการทดสอบการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุนที่มีส่วนผสมต่างกันดังตารางที่ 4.1 พบว่า สารตัวเติมพอลิเมอร์ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์อย่างเด่นชัด ดังนั้นจึงกลับไปเลือกใช้สูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรดั้งเดิมที่มีการศึกษาอย่างยาวนานเพื่อใช้เป็นสูตรที่ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุน

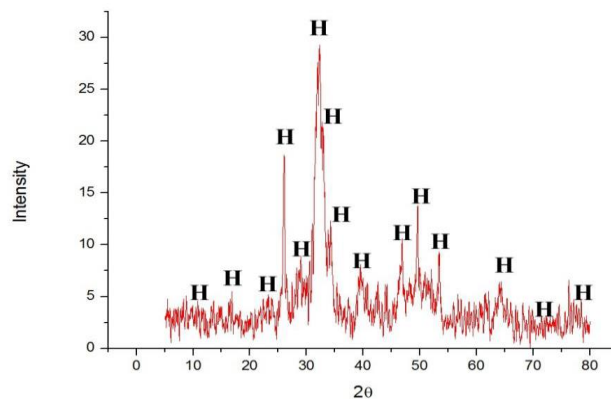


ภาพที่ 4.8 แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติด้านในเนื้อพรุน ด้านนอกเนื้อแน่น

### 4.3.1 ผลการวิเคราะห์เฟสองค์ประกอบ



ภาพที่ 4.9 แสดงเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุน  
โดยที่ H = HA และ T =  $\beta$ -TCP

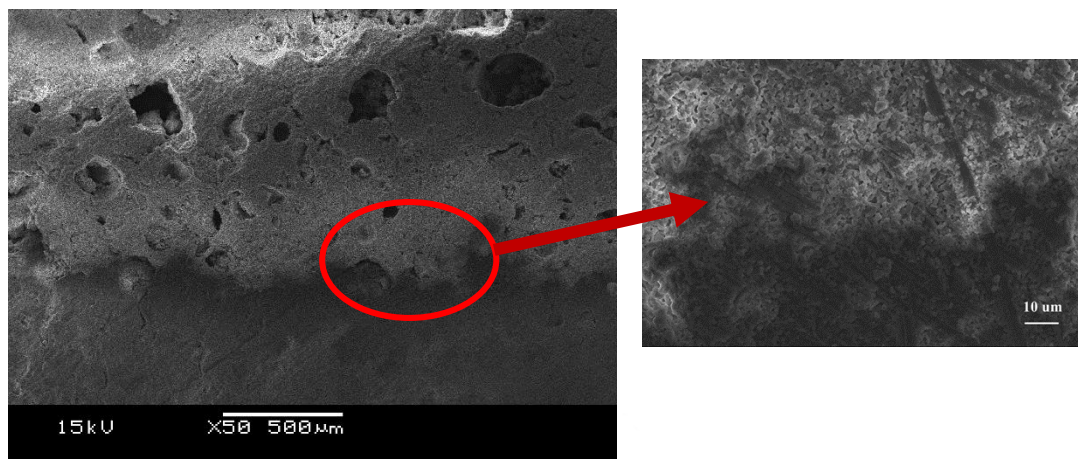


ภาพที่ 4.10 แสดงเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่น  
โดยที่ H = HA

ภาพที่ 4.9 แสดงเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์แบบเนื้อพรุนที่เลือกส่วนผสมดังสูตรที่ 1 แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้มีเฟสองค์ประกอบเป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตส่วนในภาพที่ 4.10 แสดงเฟสองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์แบบเนื้อแน่นที่เตรียมจากผงของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์จากบรูไซต์แสดงให้เห็นว่ามีเฟสไฮดรอกซีอะพาไทต์เกิดขึ้นตามต้องการ



#### 4.3.2 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาครอยต่อระหว่างส่วนเนื้อแน่นและส่วนเนื้อพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์



ภาพที่ 4.11 แสดงช่วงรอยต่อของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุนและเนื้อแน่น

จากภาพที่ 4.11 ศึกษาช่วงรอยต่อของโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างส่วนของเนื้อพรุนและเนื้อแน่น แสดงให้เห็นว่าไม่มีช่องว่างระหว่างช่วงรอยต่อ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาตินี้รอยต่อระหว่างส่วนเนื้อพรุนและเนื้อแน่นเชื่อมติดกัน

#### 4.3.3 ผลการวิเคราะห์ MTT assay

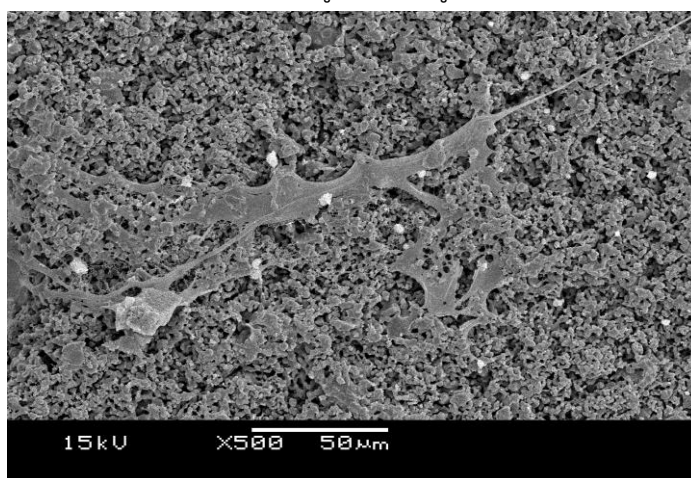
จากผลการทดสอบพบว่าเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน กล่าวคือในวันแรกทำการ seed cell ลงในชิ้นงานจำนวน 20,000 cell เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน จำนวนเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 75646.15 cell แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีชีวิตรอดและมีจำนวนเพิ่มขึ้น จากนั้นจึงนำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง SEM เพื่อดูลักษณะของเซลล์บนชิ้นงาน

#### 4.3.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กับเซลล์กระดูกหนู

จากการทดสอบ MTT assay ทำให้ทราบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นแต่ไม่อาจทราบถึงลักษณะการแผ่ตัวบนชิ้นงานของเซลล์จึงทำการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดเพื่อดูลักษณะของเซลล์บนชิ้นงาน

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพสำหรับการทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบภายนอกร่างกาย (in vitro testing) โดยจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายนอกสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นสมบัติเบื้องต้นของวัสดุชีวภาพเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ โดยเลือกสูตรที่ 1 ทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบพรุนเป็นชั้นใน แล้วขึ้นรูปชั้นนอกของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเนื้อแน่น ให้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียง

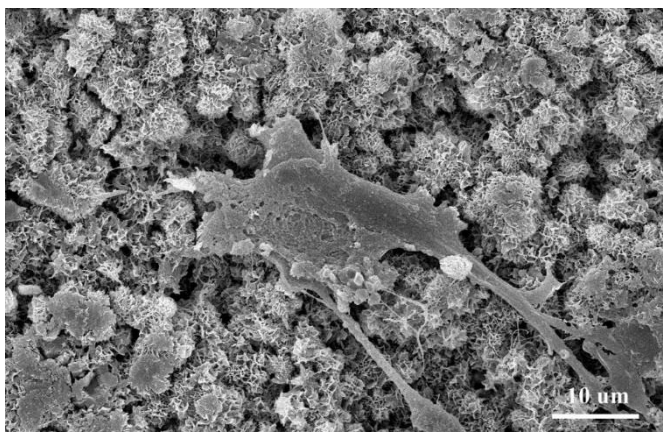
กับกระดูกตามธรรมชาติ ก่อนทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ ขึ้นงานได้วัดค่า pH หลังแช่ PBS นาน 24 ชั่วโมง และพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มี pH ใกล้เคียง 7 แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดการละลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ และมีค่า pH ช่วงกลางซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ จึงสามารถนำไปทดสอบต่อได้ ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์และโครงสร้างรูพรุนที่ใช้ทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ในงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้เซลล์สร้างกระดูกชนิด ST2 เพื่อศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟสกับเซลล์สร้างกระดูก สำหรับเซลล์ ST2 นั้นเป็น cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากไขกระดูกในชั้นสโตรมาล (Bone Marrow Stromal Cells) ของหนู มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์เองได้ (Poliferation) และรูปร่างเป็นรูปกระสวย (spindle shaped cell)



ภาพที่ 4.12 แสดงการทดสอบขึ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์กับเซลล์สร้างกระดูก

ผลวิเคราะห์ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ แสดงดังภาพที่ 4.12 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต เมื่อพิจารณาขึ้นงานที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าโครงสร้างประกอบด้วยรูพรุนระดับจุลภาคที่มีความต่อเนื่องกระจายอยู่ทั่วขึ้นงาน เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ ST2 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะและแผ่แบนวัสดุได้ดี แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติที่เตรียมขึ้นนั้นมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์และไม่เป็นพิษ

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติกับเซลล์สร้างกระดูกยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง BCP เป็นโครงสร้างลักษณะ bone like apatite ดังภาพ 4.13 ซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนในการแช่โครงเลี้ยงเซลล์กับสารละลาย PBS<sup>(58)</sup>



ภาพที่ 4.13 โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างคล้าย bone like apatite



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติและศึกษาผลของสารตัวเติมที่มีผลต่อโครงสร้างจุลภาคอีกทั้งสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบพูนกับเซลล์สร้างกระดูกสามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สารแคลเซียมฟอสเฟตที่ใช้เป็นสารตั้งต้นเมื่อเผาอุณหภูมิ 1000-1250 องศาเซลเซียสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเฟสเป็นบีตาและแอลฟาไตรแคลเซียมฟอสเฟต สูตรที่ 1 มีความเหมาะสมต่อการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์เนื่องจากประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์/บีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงร้อยละ 60/40 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์แคลเซียมฟอสเฟตชนิดสองเฟส
2. การเติม PAA ส่งผลต่อเฟสและโครงสร้างจุลภาคของโครงเลี้ยงเซลล์ โดย PAA จะทำหน้าที่เป็นพอลิเมอร์เมทริกซ์ซึ่งประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก (COO<sup>-</sup>) จำนวนมากเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) ร่วมกับแคลเซียมไอออนได้เป็น PAA/ Ca<sup>2+</sup> ช่วยเพิ่มการยึดเกาะกันระหว่างอนุภาค. การเกิดรูพรุนระดับมหภาคในโครงเลี้ยงเซลล์เกิดจากหลักการน้ำมันในน้ำโดยน้ำมันพาราฟินจะทำหน้าที่เป็นเฟสกระจายซึ่งเป็นอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำกระจายตัวอยู่ในน้ำซึ่งเป็นเฟสต่อเนื่อง และใช้ PECO ทำหน้าที่ Stabilizer ซึ่งประกอบด้วยส่วนหัวที่ชอบน้ำคือไตรกลีเซอรินและส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำคือกรดไขมัน ไตรกลีเซอรินจะทำหน้าที่จับกับน้ำขณะที่กรดไขมันประเภท ricinoleic acid จับกับน้ำมันพาราฟินและกลายเป็นแม่แบบรูพรุน แต่การเปลี่ยนแปลงความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้นจึงเลือกสูตรโครงเลี้ยงเซลล์โดยคำนึงถึงอัตราส่วนร้อยละของไฮดรอกซีอะพาไทต์และบีตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตด้วย
3. โครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะการกระจายตัวขนาดรูพรุนสองช่วงประกอบด้วยรูพรุนในช่วง 0.1-10 ไมโครเมตรและรูพรุนในช่วง 10 -200 ไมโครเมตร การเปลี่ยนแปลงปริมาณ น้ำมันพาราฟินและ PECO ไม่ส่งผลต่อขนาดรูพรุนระดับจุลภาคแต่ส่งผลต่อขนาดรูพรุนระดับมหภาค แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างชัดเจนของโครงสร้างทั้งสองเมื่อศึกษาด้วย SEM
4. โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกระดูกตามธรรมชาติ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยรูพรุนระดับมหภาคภายในชิ้นงานไม่ส่งผลต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ

โครงเลี้ยงเซลล์แต่อาจขึ้นอยู่กับลักษณะรูปร่างและรูปทรงระดับจุลภาคที่มีความเหมาะสมสำหรับการแผ่ตัวของเซลล์

## 5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยเพิ่มเติม

1. ควรศึกษาความหนาของโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่น หาความหนาที่เหมาะสมที่ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติความแข็งแรงและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ
2. ควรศึกษารายต่อระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อแน่นและโครงเลี้ยงเซลล์ส่วนเนื้อพรุนในเรื่องความแข็งแรงในการยึดติดระหว่างกัน โดยการทดสอบแรงดึง
3. ควรเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างกระดูกเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์
4. ควรใช้เซลล์ชนิดอื่นด้วยเพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพเพื่อยืนยันผลการทดลองซ้ำ



รายการอ้างอิง



ภาคผนวก



- (1) Wang, P., et al. Synthesis of nanoporous calcium phosphate spheres using poly(acrylic acid) as a structuring unit. Materials Letters 63 (2009): 1207-1209.
- (2) Ramay, H. R., and Zhang, M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. Biomaterials 25 (2004): 5171-5180.
- (3) Manjubala, I., and Sivakumar, M. In-situ synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation. Materials Chemistry and Physics 71 (2001): 272-278.
- (4) Kwon, S.-H., Jun, Y.-K., Hong, S.-H., and Kim, H.-E. Synthesis and dissolution behavior of  $\beta$ -TCP and HA/ $\beta$ -TCP composite powders. Journal of the European Ceramic Society 23 (2003): 1039-1045.
- (5) Jaw, K. Preparation of a biphasic calcium phosphate from CaO and CaCO<sub>3</sub>. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 83 (2006): 145-149.
- (6) Chung-King, H. The preparation of biphasic porous calcium phosphate by the mixture of Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O and CaCO<sub>3</sub>. Materials Chemistry and Physics 80 (2003): 409-420.
- (7) Descamps, M., et al. Manufacture of macroporous  $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics. Journal of the European Ceramic Society 28 (2008): 149-157.
- (8) Bellucci, D., Cannillo, V., and Sola, A. Shell Scaffolds: A new approach towards high strength bioceramic scaffolds for bone regeneration. Materials Letters 64 (2010): 203-206.
- (9) Yang, Y., Yao, Q., Pu, X., Hou, Z., and Zhang, Q. Biphasic calcium phosphate macroporous scaffolds derived from oyster shells for bone tissue engineering. Chemical Engineering Journal 173 (2011): 837-845.
- (10) Son, J. S., et al. Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres. Journal of Controlled Release 153 (2011): 133-140.



- (11) Stahli, C., and Bohner, M., Bashoor-Zadeh, M., Doebelin, N., Baroud, G. Aqueous impregnation of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds. Acta Biomaterialia 6 (2010): 2760-2772.
- (12) Ribeiro, G. B. M., Trommer, R. M., dos Santos, L. A., and Bergmann, C. P. Novel method to produce  $\beta$ -TCP scaffolds. Materials Letters 65 (2011): 275-277.
- (13) Bohner, M., et al. Synthesis and characterization of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate blocks. Biomaterials 26 (2005): 6099-6105.
- (14) Cell supports. Scaffolds[Online]. 2009. Available from: <http://www.cellsupports.com/index.html> [2015, february 12]
- (15) Maria, V.-R. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. Comptes Rendus Chimie 13 (2010): 174-185.
- (16) Zhang, F., Chang, J., Lu, J., Lin, K., and Ning, C. Bioinspired structure of bioceramics for bone regeneration in load-bearing sites. Acta Biomaterialia 3 (2007) : 896-904
- (17) N. Kivark , A. Cuney Biphasic calcium phosphate in site, Biomaterials
- (18) Pecqueux, F., Tancret, F., Payraudeau, N., and Bouler, J. M. Influence of microporosity and macroporosity on the mechanical properties of biphasic calcium phosphate bioceramics: Modelling and experiment. Journal of the European Ceramic Society 30 (2010): 819-829.
- (19) Zhang, F., Lin, K., Chang, J., Lu, J., and Ning, C. Spark plasma sintering of macroporous calcium phosphate scaffolds from nanocrystalline powders. Journal of the European Ceramic Society 28 (2008): 539-545.
- (20) Ozgur Engin, N., and Tas, A. C. Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics. Journal of the European Ceramic Society 19 (1999): 2569-2572.
- (21) Karageorgiou, V., and Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials 26 (2005): 5474-5491.

- (22) Liu, C., Xia, Z., and Czernuszka, J. T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. Chemical Engineering Research and Design 85 (2007): 1051-1064.
- (23) Driessens, F. C. M., et al. The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. Biomaterials 23 (2002): 4011-4017.
- (24) Zhang, Y., and Zhang, M. Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates. Journal of Non-Crystalline Solids 282 (2001): 159-164.
- (25) Wu, S.-C., Hsu, H.-C., Hsu, S.-K., Wang, W.-H., and Ho, W.-F. Preparation and characterization of four different compositions of calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. Materials Characterization 62 (2011): 526-534.
- (26) Li, F., Feng, Q. L., Cui, F. Z., Li, H. D., and Schubert, H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. Surface and Coatings Technology 154 (2002): 88-93.
- (27) Schiller, C., and Epple, M. Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. Biomaterials 24 (2003): 2037-2043.
- (28) Synthes. Norian CRS Rotary Mix[Online]. 2012. Available from: [http://www.synthes.com/sites/NA/Products/Biomaterials/BoneVoidFillersCMF/Pages/Norian\\_CRS.aspx](http://www.synthes.com/sites/NA/Products/Biomaterials/BoneVoidFillersCMF/Pages/Norian_CRS.aspx) [2012, February 28]
- (29) Carrodeguas, R. G., and De Aza, S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. Acta Biomaterialia 7 (2011): 3536-3546.
- (30) Yashima, M., Sakai, A., Kamiyama, T., and Hoshikawa, A. Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction. Journal of Solid State Chemistry 175 (2003): 272-277.
- (31) Choi, D., and Kumta, P. N. Mechano-chemical synthesis and characterization of nanostructured  $\beta$ -TCP powder. Materials Science and Engineering 27 (2007): 377-381.
- (32) Elliott, J. C. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. 1994.

- (33) Hexagonal. Crystal Structure of Calcium Hydroxyapatite Powders Synthesized in SBF[Online]. 1999. Available from: <http://www.cuneyttas.com/IMAGEL84.jpg> [2012, March 1]
- (34) Morrissey, R., Rodriguez-Lorenzo, L. M., and Gross, K. A. Influence of ferrous iron incorporation on the structure of hydroxyapatite. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 16 (2005): 387-392.
- (35) Kim, W., and Saito, F. Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from  $H_3PO_4$  solution with  $Ca(OH)_2$ . Ultrasonics Sonochemistry 8 (2001): 85-88.
- (36) Wu, S.-C., Hsu, H.-C., Wu, Y.-N., and Ho, W.-F. Hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders by ball milling and heat treatment. Materials Characterization 62 (2011): 1180-1187.
- (37) Park, J. B. Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications. Springer: 2008
- (38) Zhang, F., Chang, J., Lu, J., and Ning, C. Surface modification of beta-tricalcium phosphate scaffolds with topological nanoapatite coatings. Materials Science and Engineering: C 28 (2008): 1330-1339.
- (39) Sergey V, D. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. Acta Biomaterialia 8 (2012): 963-977.
- (40) Lee, H., Kwon, S., Seo, E., Kim, Y.-H., and Kim, S. Preparation and characterization of alpha-tricalcium phosphate cements incorporated with polyamino acids. Macromolecular Research 19 (2011): 90-96.
- (41) Tissue engineering. How tissue engineering is done?[Online]. 2012. Available from: <http://www.smita-iitd.com/research-highlights/tissue-engineering> [2012, March 1]
- (42) Haemocytometer.  
from: [http://www.microbehunter.com/wp/wpcontent/uploads/2010/06/counting\\_chamber1.jpg](http://www.microbehunter.com/wp/wpcontent/uploads/2010/06/counting_chamber1.jpg) [2015, June 3]
- (43) Cellometer. Cell Counting Made Easy[Online]. 2011. Available from: <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/magnifier/counting.aspx> [2012, January 7]

- (44) Salman, S., et al. Sintering effect on mechanical properties of composites of natural hydroxyapatites and titanium. Ceramics International 35 (2009): 2965-2971.
- (45) Jung Sang Cho, C.-P. C., and Sang-Hoon, R. Bioactivity and Osteoconductivity of Biphasic Calcium Phosphates. Bioceramics Development and Applications 1 (2011): 3.
- (46) Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J. M., and Daculsi, G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate ratios. Biomaterials 18 (1997): 1037-1041.
- (47) Zhu, X. D., Zhang, H. J., Fan, H. S., Li, W., and Zhang, X. D. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. Acta Biomaterialia 6 (2010): 1536-1541.
- (48) Lepine, L., and Gilbert, R. Thermal degradation of polyacrylic acid in dilute aqueous solution. Polymer Degradation and Stability 75 (2002): 337-345.
- (49) Dubinsky, S., Grader, G. S., Shter, G. E., and Silverstein, M. S. Thermal degradation of poly(acrylic acid) containing copper nitrate. Polymer Degradation and Stability 86 (2004): 171-178.
- (50) Yang, H. Y., et al. Sintering behaviour of calcium phosphate filaments for use as hard tissue scaffolds. Journal of the European Ceramic Society 28 (2008): 159-167.
- (51) Ryu, H.-S., et al. An improvement in sintering property of  $\beta$ -tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. Biomaterials 23 (2002): 909-914.
- (52) Mobasherpour, I., and Heshajin, M. S., Kazemzadeh, A., Zakeri, M. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. Journal of Alloys and Compounds 430 (2007): 330-333.
- (53) Huang, L., Doetsch, C., and Pollerberg, C. Low temperature paraffin phase change emulsions. International Journal of Refrigeration 33 (2010): 1583-1589.
- (54) Andrew I. C., et al Formation and enhanced biocidal activity of water-dispersable organic nanoparticles. Nature nanotechnology 3 (2008): 188.
- (55) Yuan, J Cui, Zhang, W. J., Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. Biomaterials, 28 (2007): 1005-1013.

- (56) Wang Y., et al Design and fabrication of standardize hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue engineering research J Biomed Mater Res.A 68 (2004) 123-132.
- (57) Panrapa Trakoolwannachai. Preparation of biphasic calcium phosphate scaffold of hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalciumphosphate. Master's Thesis, Department of material science, Faculty of science, Chulalongkorn University, 2011.
- (58) Christos O., et al. Dynamic model of scaffold precipitation. Journal of crystal growth 302 (2008) : 201-210.



ตารางที่ 1 แสดงค่า  $2\theta$ , intensity และ hkl ของ  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ซึ่งเป็นข้อมูลมาตรฐานจาก 2003 JCPDS International Centre for Diffraction Data (PCPDFWIN) หมายเลข JCPDS

Pattern : 00-009-0348		Radiation = 1.540600		Quality : High		
$\alpha$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		<b>2<math>\theta</math></b>	<b>i</b>	<b>h</b>	<b>k</b>	<b>l</b>
Calcium Phosphate		7.181	4	1	1	0
		12.098	25	1	1	1
		12.970	4	0	2	1
		14.069	10	1	3	0
		14.462	4	2	2	0
		15.185	10	2	0	1
		17.104	12	0	4	0
		19.494	4	0	0	2
		20.495	4	3	1	1
		20.737	2	2	4	0
		21.290	2	0	2	2
		22.206	20	1	5	0
		22.724	40	2	0	2
		22.902	40	2	4	1
		23.329	8	4	0	0
		23.836	4	3	3	1
		24.099	40	1	3	2
		24.299	18	1	5	1
		25.354	4	4	0	1
		25.803	6	0	6	0
		26.587	8	3	1	2
		26.750	4	4	3	0
		28.309	4	2	6	0
		28.587	4	2	4	2
		29.063	4	4	4	0
		29.258	4	5	0	0
		29.655	20	5	1	0
		30.304	20	1	1	3
		30.602	35	4	0	2
		30.753	100	1	7	0
		31.249	30	5	1	1
		31.751	2	0	7	1
		32.102	12	5	3	0
		32.328	4	1	7	1
		32.729	1	1	3	3
		32.902	1	2	2	3
		33.601	4	5	3	1
		34.183	50	0	4	3
		34.605	30	0	8	0
<b>Lattice</b> : Orthorhombic		<b>Mol. weight</b> = 310.18				
<b>S.G.</b> : (0)		<b>Volume [CDJ]</b> = 2871.21				
<b>a</b> = 15.22000	<b>Z</b> = 16	<b>Dx</b> = 2.870				
<b>b</b> = 20.71000		<b>Dm</b> = 2.814				
<b>c</b> = 9.10900						
<b>a/b</b> = 0.73491						
<b>c/b</b> = 0.43984						
<b>Melting point</b> : 1720 C		<b>General comments</b> : Stated to be monoclinic pseudoorthorhombic by Mackay, <i>Acta Crystallogr.</i> , <b>6</b> 743 (1953).				
<b>Sample preparation</b> : Sample obtained by heating $\beta$ -phase at 1400 C.		<b>General comments</b> : Validated by calculated pattern 29-359.				
<b>Additional diffraction line(s)</b> : Plus additional reflections.		<b>Data collection flag</b> : Ambient.				
de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands., ICDD Grant-in-Aid		CAS Number: 7758-87-4				
<b>Radiation</b> : CuK $\alpha$ 1		<b>Filter</b> : Not specified				
<b>Lambda</b> : 1.54050		<b>d-sp</b> : Guinier				
<b>SS/FOM</b> : F30= 16(0.0192,95)						

ตารางที่ 2 แสดงค่า 2θ, intensity และ hkl ของ β-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ซึ่งเป็นข้อมูลมาตรฐานจาก 2003 JCPDS International Centre for Diffraction Data (PCPDFWIN) หมายเลข JCPDS

Pattern : 01-070-2065		Radiation = 1.540600					Quality : Calculated				
β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		2th	i	h	k	l	2th	i	h	k	l
Calcium Phosphate		10.863	151	0	1	2	63.310	41	4	3	4
		13.618	209	1	0	4	*63.310	41	1	2	11
		14.207	42	0	0	6	63.444	25	1	0	6
		16.974	249	1	1	0	*63.444	25	6	0	5
		18.415	21	1	1	3	63.800	8	3	4	0
		20.195	66	2	0	2	64.296	12	5	2	0
		21.392	19	0	1	8	64.668	17	0	4	14
		21.825	135	0	2	4	*64.668	17	4	2	14
		22.202	22	1	1	6	65.177	15	1	4	6
		25.773	260	1	0	10	*65.177	15	0	2	15
		26.167	41	2	2	8	65.328	15	3	3	3
		26.497	78	1	2	2	65.721	4	6	1	8
		27.424	60	1	1	9	65.897	22	3	4	8
		*27.424	60	2	0	8	66.027	14	5	1	13
		27.777	559	2	1	4	66.226	45	5	3	6
		28.703	13	0	0	12	66.418	24	1	3	3
		*28.703	13	1	2	5	67.400	36	2	3	14
		29.620	129	3	0	0	*67.400	36	1	5	10
		31.023	999	0	2	10	67.993	12	4	3	1
		*31.023	999	2	1	7	67.999	16	1	6	2
		32.436	203	1	2	8	68.146	7	6	1	0
		32.993	73	3	0	6	68.431	3	2	1	9
		33.477	61	1	1	12	68.598	6	2	5	4
		34.395	702	2	0	0	*68.598	6	1	6	11
		35.018	49	0	1	14	68.774	10	3	4	0
		35.104	87	2	2	3	68.902	8	3	4	11
		35.570	110	1	3	1	69.115	8	4	0	7
		35.866	41	1	3	1	*69.115	8	7	6	12
		36.115	7	3	1	2	69.243	7	6	1	5
		37.094	9	1	3	4	69.640	2	4	2	1
		37.328	87	1	1	11	70.341	5	2	2	3
		*37.328	87	2	2	6	70.567	12	3	3	2
		37.815	53	3	0	14	71.091	14	1	2	0
		38.158	6	5	2	15	71.371	18	1	4	0
		39.826	101	1	0	15	*71.371	18	1	4	0
		40.067	31	1	1	15	71.858	16	5	4	12
		40.157	28	0	4	2	72.360	30	4	4	0
		40.804	9	2	9	8	72.768	11	3	4	14
		*40.804	9	3	1	8	73.282	24	2	4	3
		41.054	115	4	0	4	73.434	26	0	0	2
		41.670	97	3	0	12	74.043	8	7	3	4
		42.959	13	1	2	14	74.190	5	4	4	6
		43.424	40	1	3	10	74.498	3	5	2	5
		43.552	60	0	5	0	75.022	27	2	6	2
		*43.552	60	0	0	1	75.308	37	4	2	1
		43.675	44	3	2	2	75.925	16	6	5	15
		43.896	46	2	3	2	76.022	27	2	6	2
		44.495	32	0	8	8	76.227	27	3	1	8
		44.722	41	3	2	4	76.294	15	3	3	13
		44.892	26	3	1	11	76.459	19	5	3	4
		45.298	66	2	12	2	*76.459	19	3	3	6
		*45.298	66	2	3	5	76.623	25	1	6	13
		45.967	9	4	1	0	76.623	25	6	2	4
		46.573	20	1	3	3	77.073	3	2	5	5
		46.943	217	1	0	10	77.874	5	1	1	14
		*46.943	217	3	2	7	78.128	14	1	4	10
		47.064	122	1	1	1	78.255	18	6	2	7
		*47.064	122	1	1	1	78.345	17	6	4	4
		47.952	139	2	3	8	78.449	8	0	4	2
		48.113	79	1	3	13	78.849	8	3	2	8
		48.357	118	1	6	6	79.014	8	2	6	11
		49.244	1	1	2	3	79.297	8	5	3	12
		49.785	36	0	1	10	79.589	15	4	1	3
		50.270	46	3	2	2	80.075	15	7	1	7
		50.684	40	2	9	11	80.530	8	1	5	6
		51.225	43	4	1	9	80.883	24	2	1	5
		51.435	70	0	5	4	*80.883	24	2	1	5
		51.587	43	2	3	11	80.883	24	1	5	6
		52.558	26	3	3	0					
		52.980	249	2	0	0					
		53.108	138	3	0	3					
		53.554	80	1	3	3					
		*53.554	80	1	3	3					
		53.724	52	2	4	1					
		*53.724	52	2	4	1					
		53.840	10	4	2	2					
		54.365	58	5	0	8					
		*54.365	58	1	1	1					
		54.560	43	3	2	13					
		*54.560	43	2	4	4					
		54.734	16	3	3	6					
		55.058	30	4	1	12					
		55.548	2	3	1	1					
		56.109	30	1	2	14					
		*56.109	30	2	3	3					
		56.493	20	0	5	10					
		*56.493	20	2	4	7					
		56.620	28	2	0	1					
		*56.620	28	4	0	1					
		57.380	45	3	3	3					
		*57.380	45	4	2	8					
		57.569	44	5	2	4					
		57.945	12	0	2	2					
		58.087	10	1	5	5					
		59.437	75	2	4	10					
		*59.437	75	5	1	7					
		59.560	82	3	2	2					
		59.740	43	4	1	15					
		60.297	23	1	6	8					
		60.617	4	4	2	11					
		60.845	27	2	1	12					
		60.947	18	3	0	0					
		61.492	34	6	0	0					
		61.874	7	3	1	14					
		*61.874	7	5	0	1					
		62.154	6	1	1	10					
		62.295	10	5	1	1					
		62.490	13	4	3	1					
		62.654	7	3	4	2					
Radiation : CuKα1		Filter : Not specified									
Lambda : 1.54060		d-sp : Calculated spacings									
SS/FOM : F30=221(0.0040,34)											

ตารางที่ 3 แสดงค่า 2 $\theta$ , intensity และ hkl ของไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งเป็นข้อมูลมาตรฐานจาก 2003 JCPDS International Centre for Diffraction Data (PCPDFWIN) หมายเลข JCPDS

Pattern : 01-084-1998		Radiation = 1.540600					Quality : Calculated				
Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)		2th	i	h	k	l	2th	i	h	k	l
Calcium Phosphate Hydroxide Hydroxylapatite		10.840	177	1	0	0	81.250	5	5	0	4
		16.854	47	1	0	1	81.751	16	4	4	0
		18.832	23	1	1	0	81.938	11	3	1	5
		21.779	63	2	0	0	82.400	5	6	1	2
		22.875	62	1	1	1	*82.400	5	6	0	3
		25.376	24	2	0	1	82.783	6	5	3	0
		25.900	359	0	0	2	83.203	9	4	4	1
		28.151	87	1	0	2	83.314	10	3	3	4
		28.944	161	1	2	0	83.468	34	3	4	3
		31.791	999	1	2	1	84.343	32	4	2	4
		32.218	522	1	1	2	84.491	16	0	0	6
		32.923	608	3	0	0	85.026	2	4	0	5
		34.088	212	2	0	2	85.522	16	2	5	3
		35.483	39	3	0	1	85.865	9	6	2	0
		38.199	2	2	2	0	87.418	22	1	5	4
		39.227	49	1	2	2	87.566	38	4	4	2
		39.823	198	3	1	0	*87.566	38	1	1	6
		40.469	17	2	2	1	88.099	22	3	2	5
		40.874	3	1	0	3	88.557	53	5	3	2
		42.020	56	3	1	1	89.617	2	6	1	3
		42.357	10	3	0	2					
		43.907	44	1	1	3					
		44.399	11	4	0	0					
		45.362	33	2	0	3					
		46.419	7	4	0	1					
		46.731	279	2	2	2					
		48.119	120	3	1	2					
		48.627	40	3	2	0					
		49.527	305	1	2	3					
		50.517	156	2	3	1					
		51.298	113	4	1	0					
		52.117	115	4	0	2					
		*52.117	115	3	0	3					
		53.258	137	0	0	4					
		54.523	10	1	0	4					
		55.909	58	2	3	2					
		*55.909	58	2	2	3					
		56.366	2	5	0	0					
		57.179	37	1	3	3					
		58.077	15	5	0	1					
		58.208	10	2	0	4					
		58.344	10	1	4	2					
		58.788	8	3	3	0					
		59.976	42	4	2	0					
		60.456	30	3	3	1					
		61.624	31	4	2	1					
		61.751	47	2	1	4					
		63.035	75	5	0	2					
		63.460	15	1	5	0					
		64.048	73	3	0	4					
		64.217	90	2	3	3					
		65.057	68	1	5	1					
		65.307	39	3	3	2					
		66.468	21	4	1	3					
		67.413	1	2	2	4					
		68.516	3	1	3	4					
		69.047	2	6	0	0					
		69.245	2	1	0	5					
		69.734	19	1	5	2					
		70.138	4	3	4	0					
		70.580	1	6	0	1					
		70.859	2	5	0	3					
		71.416	4	1	1	5					
		71.660	35	3	4	1					
		72.298	26	2	5	0					
		72.492	15	2	0	5					
		73.010	3	3	3	3					
		73.802	18	2	5	1					
		74.076	36	4	2	3					
		74.979	12	3	2	4					
		75.099	11	6	0	2					
		75.682	43	1	2	5					
		76.154	23	4	3	2					
		76.544	17	1	6	0					
		77.086	46	4	1	4					
		77.243	43	1	5	3					
		77.783	2	3	0	5					
		78.020	8	6	1	1					
		78.251	52	5	2	2					
		80.904	2	2	2	5					
<b>Lattice</b> : Hexagonal <b>S.G.</b> : P63/m (176) <b>a</b> = 9.41660 <b>c</b> = 6.87450 <b>Z</b> = 2		<b>Mol. weight</b> = 502.32 <b>Volume [CD]</b> = 527.91 <b>Dx</b> = 3.160 <b>Dm</b> = 3.080 <b>l/lcor</b> = 1.05									
<b>ICSD collection code</b> : 203027 <b>General comments</b> : Calc. density unusual but tolerable. <b>Temperature factor</b> : ITF <b>Sample source or locality</b> : Specimen from Holly Springs, Georgia, USA. <b>Additional pattern</b> : See PDF 73-293, PDF 73-1731, PDF 86-740 and PDF 9-432. <b>Data collection flag</b> : Ambient.											
Hughes, J.M., Cameron, M., Crowley, K.D., Am. Mineral., volume 74, page 870 (1989) Calculated from ICSD using POWD-12++ (1997)											
<b>Radiation</b> : CuK $\alpha$ 1 <b>Lambda</b> : 1.54060 <b>SS/FOM</b> : F30=1000(0.0000,30)		<b>Filter</b> : Not specified <b>d-sp</b> : Calculated spacings									



ตารางที่ 4 แสดงค่า  $2\theta$ , intensity และ hkl ของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นข้อมูลมาตรฐานจาก 2003 JCPDS International Centre for Diffraction Data (PCPDFWIN) หมายเลข JCPDS

Pattern : 00-044-1481		Radiation = 1.540600		Quality : High		
Ca(OH) <sub>2</sub>		2 $\theta$	I	h	k	l
Calcium Hydroxide Portlandite, syn		18.008	77	0	0	1
		28.672	77	0	0	1
		34.102	100	1	0	0
		36.527	80	1	0	0
		47.171	30	1	1	0
		50.813	31	1	1	0
		54.358	14	1	0	0
		56.092	14	1	0	0
		59.426	9	1	0	0
		67.634	9	1	0	0
		74.233	7	1	0	0
		77.911	6	1	0	0
		77.954	1	2	0	0
		79.096	1	2	0	0
		81.910	2	1	1	0
		84.751	5	2	0	0
		84.751	5	2	0	0
		86.197	3	2	0	0
		87.208	2	2	0	0
		96.030	2	2	0	0
		98.892	1	1	1	0
		98.892	2	1	1	0
		103.143	1	1	2	0
		106.056	1	2	0	0
		107.579	2	1	1	0
		110.521	1	1	2	0
		116.268	1	1	2	0
Lattice : Hexagonal S.G. : P-3m1 (164) a = 3.58990 c = 4.91600 Z = 1		Mol. weight = 74.09 Volume [CD] = 54.87 Dx = 2.242 Ilcor = 2.90				
Color: White Sample source or locality: Sample obtained from $\sigma$ Chemical Co. General comments: Average relative standard deviation in intensity of the ten strongest reflections for three specimen mounts = 2.2%. Additional pattern: Validated by a calculated pattern. Optical data: A=1.545, B=1.574, Sign=- Deleted and rejected by: Deleted by 4-733 which is satisfactory. Data collection flag: Ambient.						
Martin, K., McCarthy, G., North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA., ICDD Grant-in-Aid (1992)						
Radiation : CuK $\alpha$ 1 Lambda : 1.54056 SS/FOM : F25= 52(0.0167.29)		Filter : Monochromator crystal d-sp : Diffractometer Internal standard : Si				



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศศิธรดา ตันจิตวิริยะ เกิดวันที่ 9 กรกฎาคม 2531 จบการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จากนั้นเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีเซรามิก ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และสำเร็จการศึกษาในปี 2557

ในระหว่างการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ได้นำเสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบ Poster presentation ในการประชุมทางวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference 2014 ( PACCON 2014) จัดขึ้นโดย สมาคมเคมีแห่งประเทศไทย ระหว่างวันที่ 8-10 มกราคม 2557 ณ โรงแรม Centara Hotel and Convention Center จังหวัดขอนแก่น และมีผลงานตีพิมพ์ คือ Tanchitviriya,S. Kornpanom,W. Larпкиattaworn,S. Thunyakitpisal,P. and Kashima,P. D., Effects of polymer additives on porous structure formation of biphasic calcium phosphate scaffold, PACCON Proceeding (2014) : 572-575.

