

การพัฒนาเครื่องปฏิบัติการชีวภาพแบบไหลผ่านสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้เซลล์ต้นกำเนิด

นาย ณัฐพล วชิรโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF INFUSION BIOREACTOR FOR STEM CELLS BASED TISSUE ENGINEERING

Mr. Nuttapon Vachiraroj

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

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้เซลล์ต้นกำเนิด
โดย	นาย ณัฐพล วชิรโรจน์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไศรดา กนกพานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศธีรวัจนวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล กิตติสุขภกร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไศรดา กนกพานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ภาวสันต์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัทธา จินาวัดมน)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.นฤภร มนต์มธุรพจน์)

ณัฐพล วชิรโรจน์ : การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้เซลล์ต้นกำเนิด. (DEVELOPMENT OF INFUSION BIOREACTOR FOR STEM CELLS BASED TISSUE ENGINEERING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล, 109 หน้า.

โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ 30/70 โดยน้ำหนัก (Gel/HA) ถูกขึ้นรูปโดยการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน และใช้สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 0.01 (โดยน้ำหนัก) เป็นสารเชื่อมขวาง หลังจากนั้นนำไปทำแห้งแข็ง และเชื่อมขวางอีกครั้งด้วยการใช้ความร้อนที่ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลของการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีขนาดของรูพรุน 121 ± 39 และ 148 ± 83 ไมโครเมตร ตามลำดับ โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีรูเชื่อมกันตลอดผนังของโครงเลี้ยงเซลล์ความพรุนร้อยละ 55-60 ไฮดรอกซีอะพาไทต์กระจายทั่วทั้ง Gel/HA และความทนแรงกดที่สภาวะแห้งมีค่า 118 ± 21.68 และ 510 ± 109.08 กิโลปาสคาลตามลำดับ ผลของการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนู Wistar (MSC) ในสภาวะสแตติบบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีอัตราการแบ่งเซลล์เป็นสองเท่าที่ 233.8 และ 250.8 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA สามารถสร้างเอ็นไซม์ alkaline phosphatase (ALP) และแคลเซียมได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel 1.3 และ 1.4 เท่าตามลำดับในอาหารปกติ การเลี้ยงเซลล์บน Gel/HA ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี การแบ่งเซลล์เป็นสองเท่าใช้เวลา 192.9 ชั่วโมง นอกจากนั้นการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพยังช่วยให้เซลล์มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ ALP และแคลเซียมสูงกว่าการเลี้ยงแบบสแตติบ 1.7 และ 2.3 เท่าตามลำดับในอาหารปกติ อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสที่ MSC สร้างขึ้นหลังการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้อาหาร osteogenic medium เป็นเวลา 28 วัน มีค่า 1.61 นอกจากนี้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่สร้างขึ้นยังใช้เพาะเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้สารแขวนลอยของเซลล์เจ็ลจางได้ โดยสามารถเพาะเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1.3×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และเซลล์กระจายตัวทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา...2552..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4970307121 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : GELATIN / HYDROXYAPATITE / BONE TISSUE ENGINEERING / STEM
CELLS / BIOREACTOR

NUTTAPON VACHIRAROJ : DEVELOPMENT OF INFUSION BIOREACTOR FOR
STEM CELLS BASED TISSUE ENGINEERING. THESIS ADVISOR : SORADA
KANOKPANONT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : PASUTHA THUNYAKITPISAL,
Ph.D., 109 pp.

Two types of scaffolds, gelatin (Gel) and gelatin/HA (30/70 wt./wt.) (Gel/HA), were prepared using homogenization and freeze drying methods. Glutaraldehyde (0.01 wt./wt.) were used as a crosslinking agent. They were then crosslinked again using dehydrothermal method at 140°C for 48 hrs. The scaffolds had interconnected-homogeneous sized pores with approximated pore size of 121 ± 39 , and 148 ± 83 μm , and porosity of 65.4 ± 4.6 and 50.9 ± 5.9 %, for Gel and Gel/HA scaffold, respectively. Compressive modulus of Gel and Gel/HA scaffolds were at 118 ± 21.68 and 510 ± 109.08 kPa, respectively at dry state. An in-house designed infusion bioreactor was used for cell culture on Gel/HA scaffolds to evaluate cells proliferation comparing to the static culture. The results on *in vitro* static cell culture showed that population doubling time (PDT) of MSC on Gel and Gel/HA scaffolds were at 233.8 and 250.8 hrs, respectively while in a bioreactor, the PDT of Gel/HA scaffolds reduced to 192.3 hrs. In term of osteogenic differentiation, Gel/HA scaffolds enhanced alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium content of MSC by 1.3 and 1.4 times, respectively compared to those of the Gel scaffold in normal medium. Culture in the bioreactor enhances ALP activity and calcium content of MSC on Gel/HA by 1.7 and 2.3 times, respectively over those cultured at static condition. The results from energy-dispersive X-ray spectroscopy shown Ca:P ratio of Gel/HA scaffold culture MSC was at 1.61. The bioreactor also shows efficient cells seeding capability. The cell density of 1.3×10^4 cells/mm³ could be achieved using cell solution of 5×10^4 cells/ml in 6 hrs. The cells were spreaded out homogeneously throughout the scaffolds.

Department : Chemical Engineering Student's Signature

Field of Study : Chemical Engineering Advisor's Signature

Academic Year : 2009 Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.พสุธา รัญญะกิจไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คณะกรรมการ ซึ่งได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล กิตติศุภกร ประธานกรรมการ, รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ภาวนันต์, รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา จินาวัฒน์ และ ดร.นฤมิต มนต์มธุรพจน์ กรรมการที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ และกลุ่มวิจัยวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ห้องปฏิบัติการ iTissue Lab คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการแนะนำให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมูลนิธิโทรเรเพื่อการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาไทยอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กระดูก.....	4
2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก.....	9
2.3 โครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก.....	9
2.4 เจลาติน.....	12
2.5 ไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	17
2.6 โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่มีในระบบการค้า.....	20
2.7 Mesenchymal stem cells (MSC).....	22
2.8 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	24
2.9 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.2 สารเคมี.....	32
3.3 วัสดุและอุปกรณ์.....	33
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	34

	หน้า
3.4.1 ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจากเจลาตินผสมผงไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	34
3.4.2 ศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	34
3.4.3 การออกแบบและสร้างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	35
3.4.4 การเตรียม Mesenchymal Stem Cells (MSC).....	37
3.4.5 การขยายจำนวน และศึกษาธรรมชาติเซลล์บนจานเพาะเลี้ยง.....	38
3.4.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์.....	38
3.4.7 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์.....	38
3.4.8 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์.....	39
3.4.9 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	39
3.4.10 การทดสอบปริมาณเซลล์.....	41
3.4.11 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก.....	41
3.4.12 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต.....	42
3.3.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	43
3.3.14 ปัญหาทางจริยธรรม.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล.....	45
4.1 ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	45
4.1.1 ลักษณะทางกายภาพ.....	45
4.1.2 การทดสอบสมบัติทางกล.....	49
4.1.3 วัตถุประสงค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์.....	50
4.2 การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากไขกระดูก (Mesenchymal stem cells, MSC) ของหนูพันธุ์ Wistar และเซลล์ไลน์กระดูก (MT3C3).....	53
4.2.1 การศึกษาธรรมชาติของการขยายจำนวนเซลล์.....	53
4.2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MSC บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ polystyrene.....	57
4.3 สมบัติทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์.....	60
4.3.1 การทดสอบการยึดติดและเจริญเติบโตของเซลล์.....	60
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของ MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะการเลี้ยงแบบสตีติ.....	61
4.4 การออกแบบ และทดสอบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	64

4.5 การทดสอบการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกในเครื่อง ปฏิบัติการชีวภาพ.....	64
4.5.1 การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้น กำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) ที่เลี้ยงในอาหารปกติ (NM).....	64
4.5.2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไข กระดูกของหนู Wistar ที่เลี้ยงในอาหาร OM.....	67
4.6 การเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยเครื่องปฏิบัติการชีวภาพ.....	72
4.7 การเข้ากันได้กับเซลล์ภายในร่างกาย (<i>In vivo</i> biocompatibility).....	76
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	87
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	87
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	88
รายการอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	95
ภาคผนวก ก การวัดความทนต่อแรงกด.....	96
ภาคผนวก ข การออกแบบเครื่องปฏิบัติการชีวภาพ.....	98
ภาคผนวก ค อัตราการไหลในเครื่องปฏิบัติการชีวภาพ.....	99
ภาคผนวก ง การวัดจำนวนเซลล์โดยวิธี DNA.....	100
ภาคผนวก จ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP).....	103
ภาคผนวก ฉ การวัดปริมาณแคลเซียม.....	105
ภาคผนวก ช การคำนวณอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ที่วัด.....	106
ภาคผนวก ซ จรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง.....	107
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	109

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ขนาดรูพรุนและความพรุนและความพรุนของวัสดุต่างๆ ที่ใช้ทำโครงเลี้ยงเซลล์กระดูก.....	11
2.2	แสดงปริมาณกรดอะมิโนในเจลาติน.....	14
2.3	เปรียบเทียบสมบัติของเจลาติน Type A และ B.....	14
2.4	ตัวอย่างข้อมูลโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่มีในระบบการค้า.....	21
2.5	เปรียบเทียบการกลศาสตร์การไหลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่างๆ.....	26
2.6	เปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่างๆ.....	26
4.1	สรุปสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA).....	50
4.2	แสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของโครงเลี้ยงเจลาติน, โครงเลี้ยงเจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ และไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	51
4.3	ธรรมชาติของการเจริญเติบโตบนจานเพาะเลี้ยงชนิด polystyrene ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์ Wistar Rat (Mesenchymal Stem cells (MSC)) และเซลล์ไลน์กระดูก (MC3T3).....	56
4.4	แสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic Medium แบบสภาวะสถิตย์ และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่เวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	70
4.5	สรุปการเลี้ยง MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในสภาวะแบบสถิตย์ และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในอาหาร Normal Medium และ Osteogenic Medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	72
4.6	เปรียบเทียบการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ส่วนหัวของกระดูกต้นขาตัดตามยาว.....	5
2.2	ภาพตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก.....	7
2.3	ขั้นตอนการเจริญพัฒนาของกระดูก แบบ Endochondral ossification.....	8
2.4	แสดงโครงสร้างของเจลาติน.....	13
2.5	แสดงกระบวนการผลิตเจลาติน Type A และ B.....	15
2.6	แสดงวิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ.....	17
2.7	แสดงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปร่างของ MSC.....	23
2.8	ระบบการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ.....	25
3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.2	ส่วนประกอบและขนาดของตัวใส่โครงเลี้ยงเซลล์ (Chamber) ทำจากอะคริลิก และอุปกรณ์ภายใน.....	36
3.3	ภาพจำลองของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ทำการทดลอง ที่สภาวะ 5% CO ₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	37
3.4	การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสถิตย์ (Static Culture) เลี้ยงใน 6 well-plate ที่สภาวะ 5% CO ₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	34
3.5	การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่สภาวะ 5% CO ₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	35
3.6	แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยการปลูกถ่ายใน สัตว์ทดลอง.....	36
4.1	รูปถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินชนิด B (Gel) และเจลาติน Type B ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่อัตราส่วน 30/70 (Gel/HA).....	46
4.2	ลักษณะโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel).....	47
4.3	ลักษณะโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA).....	48
4.4	ผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์.....	48
4.5	ความทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) ในสภาวะแห้ง และเปียก.....	49

ภาพที่	หน้า	
4.6	<p>ขวา กราฟแท่ง และซ้าย กราฟเส้นแสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (a), โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (b) และไฮดรอกซีอะพาไทต์.....</p>	52
4.7	<p>ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์ Wistar Rat (Mesenchymal Stem cells (MSC)) (a) และเซลล์ไลน์กระดูก (MC3T3) (b).....</p>	54
4.8	<p>จุลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์ Wistar Rat (Mesenchymal Stem cells (MSC)) Passage ที่ 2 และ 3 (a) และเซลล์ ไลน์กระดูก (MC3T3) Passage ที่ 1 ถึง 8 (b).....</p>	55
4.9	<p>กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase และการเจริญเติบโต ของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร NM และ OM.....</p>	58
4.10	<p>เซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) (a) passage 2 และ (b) passage 3 ที่เจริญเติบโตบนจานเลี้ยงเซลล์.....</p>	59
4.11	<p>การยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) บนโครง เลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA).....</p>	60
4.12	<p>กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ (a), กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (b) และปริมาณแคลเซียม (c) จากเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู Wistar ที่ เลี้ยงในอาหาร NM และ OM บน โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยง เซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA).....</p>	62
4.13	<p>ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) โครงเลี้ยงเจลาตินใน อาหารเลี้ยงเซลล์ Normal Medium (a) Osteogenic Medium (b) และ โครง เลี้ยงเจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Normal Medium (c) Osteogenic Medium (d) ที่เวลา 4 สัปดาห์.....</p>	63
4.14	<p>กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ (a), กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (b) และปริมาณแคลเซียม (c) บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่เลี้ยงแบบสถิตย์ และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในอาหาร NM.....</p>	66

ภาพที่	เนื้อหา	หน้า
4.15	กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ (a), ปริมาณ alkaline phosphatase (b) และ ปริมาณแคลเซียม (c) บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่เลี้ยงแบบสถิตย์ (Static) และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ในอาหาร OM.....	69
4.16	ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) โครงเลี้ยงเจลาตินผสม ไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic Medium แบบ สภาวะสถิตย์ (a-b) และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (c-d) ที่เวลา 4 สัปดาห์	70
4.17	กราฟเส้นแสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic Medium แบบ สภาวะสถิตย์ (a) และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (b) ที่เวลา 4 สัปดาห์.....	71
4.18	แสดงตำแหน่งหน่วยมิลลิเมตรของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ตัดนำมาวิเคราะห์หา ปริมาณเซลล์.....	73
4.19	ร้อยละของเซลล์หลังการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และ Gel/HA เมื่อ เทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง โดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดย ใช้เซลล์ความเข้มข้น 2×10^4 และ 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยมีเซลล์วนอยู่ในระบบ 30 มิลลิลิตร เพาะในอาหาร α -MEM+FBS 15% ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	74
4.20	การกระจายตัวของเซลล์หลังการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้เซลล์ความเข้มข้น 2×10^4 และ 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง.....	75
4.21	แสดงการฝังโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) ชนิดต่างๆ ได้แผ่นหลังของหนู Wistar.....	77
4.22	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) หลังจาก ฝังได้แผ่นหลัง Wistar rat อายุ 8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	79
4.23	โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่ยังไม่ได้ฝังได้ผิวหนังบนหลังหนู โดยผ่านการตัดตาม ขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E.....	80
4.24	โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ยังไม่ได้ฝังได้ผิวหนังบนหลัง หนู โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E.....	81
4.25	โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูเป็น เวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E.....	82

ภาพที่	หน้า
4.26	โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E กำลังขยาย 40 เท่า..... 83
4.27	โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E กำลังขยาย 100 เท่า..... 84
4.28	โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ยังไม่ได้ฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค Von Kossa..... 85
4.29	โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค Von Kossa... 86
ก.1	กราฟแสดงค่า Young Modulus ซึ่งหาได้จากค่าความชันระหว่าง stress กับ strain ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ Gel/HA ที่สภาวะแห้ง..... 97
ข.1	แสดงส่วนประกอบต่างๆ ในเครื่องปฏิบัติการชีวภาพ..... 98
ค.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเร็วรอบในการหมุนของปั๊มต่ออัตราการไหล. 99
ง.1	กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์โดยวิธี DNA..... 102
จ.1	กราฟมาตรฐานของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) 104
จ.1	กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม..... 106

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เป็นศาสตร์ที่นำหลักการของวิศวกรรมและชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูรักษา และพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อ (Tissue Function) ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจ จากการประมาณการของกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยปี 2555 ค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยที่สูญเสียอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่างๆมีค่าใช้จ่ายประมาณ 400,000 ล้านบาทต่อปี หรือประมาณ 17.5 ล้านบาทต่อคน [Ma L. และคณะ 2003] ของผู้ป่วยในประเทศไทย ซึ่งนับว่าเป็นจำนวนเงินที่มากที่ไม่อาจมองข้ามได้

องค์ประกอบที่สำคัญในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffolds) ที่ผลิตจากชีววัสดุ ซึ่งมีลักษณะและสมบัติที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ที่นำมาเพาะลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ มีความพรุนที่ต่อเนื่อง มีขนาดของรูพรุนที่เหมาะสม มีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย มีความแข็งแรง และมีความสามารถในการย่อยสลายภายในร่างกายที่เหมาะสมกับลักษณะการเกิดของเนื้อเยื่อใหม่ เซลล์สำหรับเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งอาจเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อจำเพาะ เช่น เซลล์ผิวหนังแท้ เซลล์กระดูก เซลล์ประสาท เป็นต้น หรือ เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อจำเพาะต่างๆ ได้ ซึ่งจากรายงานในต่างประเทศในช่วงที่ผ่านมา พบว่ามีความสนใจในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อใช้งานในวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่างๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสภาพแวดล้อมที่ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุด ซึ่งปัจจัยสภาวะของสภาพแวดล้อมดังกล่าวมีอยู่หลายหลาก เช่น การใช้สารเคมีบางชนิด และการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ช่วยกระตุ้นเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในรูปแบบต่างๆ เป็นต้น

Mesenchymal stem cells (MSC) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (Mesoderm) สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ เช่น กระดูก, กระดูกอ่อน, เนื้อเยื่อไขมัน, เส้นเอ็นและกล้ามเนื้อ จึงถูกนำมาใช้ร่วมกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ เพื่อประโยชน์ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้อย่างมาก แต่ปัญหาของงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อคือโครงเลี้ยงเซลล์มีความหนา ซึ่งทำให้ผลเสีย เช่น การใส่เซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ (Cells seeding) ไม่มีประสิทธิภาพ, การเลี้ยงให้ MSC เจริญเติบโตได้ไม่ดี เนื่องจากการจำกัดของ Mass transfer และการศึกษาใน *in vitro* ของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ต้องการเครื่องปฏิกรณ์

ชีวภาพที่มีการให้แรงทางกลเพื่อให้ MSC เปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูกได้ ดังนั้นการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจึงมีบทบาทสำคัญสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในการควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมกับการเลี้ยง MSC และเปลี่ยนแปลงให้เป็นเนื้อเยื่อกระดูก ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือการออกแบบระบบให้เหมาะสมกับการเลี้ยง MSC เพื่อขยายจำนวน (Proliferation) และเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลง (Differentiation) ไปเป็นเซลล์กระดูก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อออกแบบและสร้างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) แบบไหลผ่าน (Infusion) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells) และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน (Proliferation) ตลอดจนการเปลี่ยนแปลง (Differentiation) ไปเป็นเซลล์กระดูก

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินผสมแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium Phosphate, Ca-P) และทดสอบคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ทางกายภาพ และทางชีววิทยา ให้มีขนาดของรูพรุนในช่วง 100-300 μm ความพรุน 50-80% และความแข็งแรง (Compressive strength) ไม่ต่ำกว่า 200 kPa
2. ออกแบบและสร้างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่าน (infusion) และทดสอบการเลี้ยงเซลล์ โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของ MSC จากหนู Wistar โดยมีการกระจายตัวของเซลล์ทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์อย่างดี
3. ทดสอบคุณสมบัติการเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก โดยการใช้ normal และ differentiating medium ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และตรวจสอบสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ALP activity และ Calcium content
4. ทดสอบการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ต้นแบบ และข้อมูลของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมแคลเซียมฟอสเฟต
2. ต้นแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการเพิ่มปริมาณ และชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast)
3. ข้อมูลการขยายปริมาณการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดแบบสภาวะอยู่นิ่ง และในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ
4. ข้อมูลการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

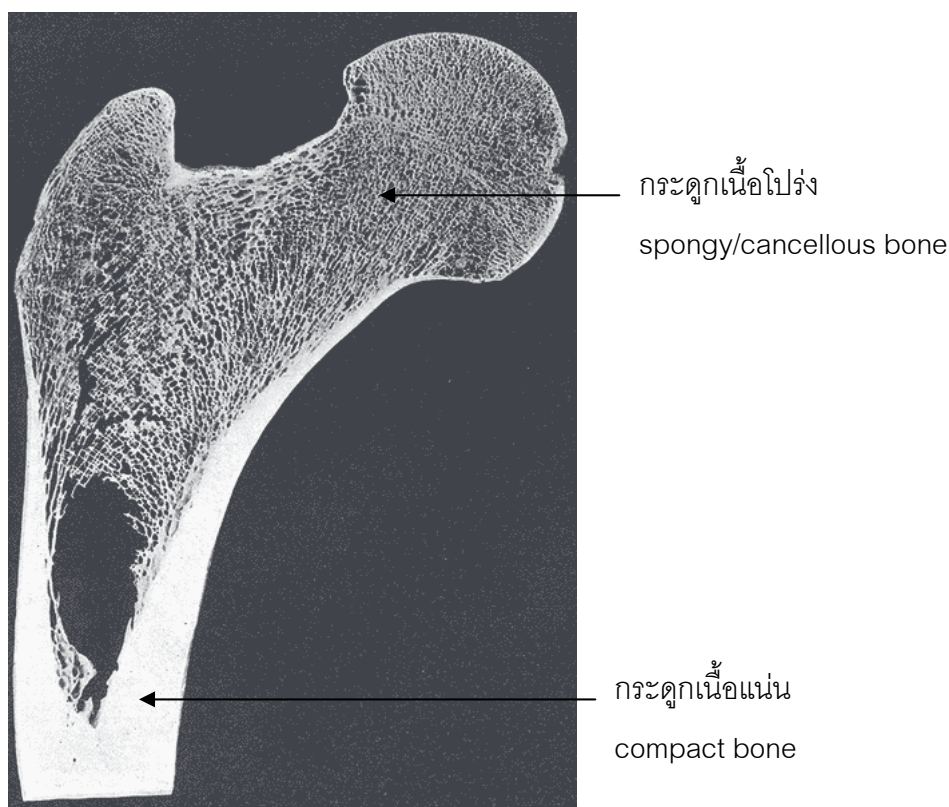
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระดูก (Bones)

กระดูก (Bones) เป็นอวัยวะที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างแข็งภายใน (endoskeleton) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง หน้าที่หลักของกระดูกคือการค้ำจุนโครงสร้างของร่างกาย การเคลื่อนไหว การสะสมแร่ธาตุและการสร้างเซลล์เม็ดเลือด กระดูกประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และน้ำ โดยสัดส่วนทั้งสามนี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุของกระดูก สำหรับกระดูกที่เจริญเต็มที่แล้วในผู้ใหญ่ จะมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ประมาณร้อยละ 25 สารอนินทรีย์ร้อยละ 65 และน้ำร้อยละ 10 ซึ่งส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ จะประกอบไปด้วยคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ถึงประมาณร้อยละ 93 ที่เหลือจะเป็น proteoglycan และโปรตีนอื่นๆ ซึ่งไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagen proteins) สำหรับส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์คือ เกลือแร่ต่างๆ ที่จับแผลงอยู่กับเนื้อเยื่อพื้นที่สำคัญคือแคลเซียม และฟอสเฟต เนื้อเยื่อพื้นส่วนนี้จะทำให้กระดูกมีความแข็งแรง และสามารถทนต่อแรงอัด (compressive strength) ในขณะที่ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์จะช่วยให้กระดูกสามารถต้านทานต่อแรงดึงและแรงบิด (tractional and torsional forces) นอกจากนี้การจัดเรียงตัวที่เหมาะสมเป็นระเบียบของคอลลาเจน การผสมผสานกันอย่างพอเหมาะของคอลลาเจนและแร่ธาตุต่างๆ ในเนื้อเยื่อพื้นมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการที่กระดูกมีอัตราส่วนของความแข็งแรงต่อน้ำหนัก (strength to weight ratio) สูงเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างอื่นๆ ในร่างกาย [Duthie R.B. และคณะ 1983] การเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูกในรูปแบบที่แตกต่างกัน ทำให้กระดูกเป็นอวัยวะที่มีหลายรูปร่างลักษณะ เพื่อให้สอดคล้องกันกับการทำงานของกระดูกในแต่ละส่วน เช่น กะโหลกศีรษะ (skull) ที่มีลักษณะแบนแต่แข็งแรงมาก เพื่อป้องกันการกระแทกกระเทือนของสมอง หรือกระดูกต้นขา (femur) ที่มีลักษณะยาวเพื่อเป็นจุดเกาะของกล้ามเนื้อต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกาย เป็นต้น

กระดูกไม่ได้เป็นโครงสร้างที่แข็งทึบเพียงอย่างเดียว หากแต่มีช่องว่างที่อยู่ระหว่างโครงสร้างแข็ง ในกระดูกแบบยาวจะพบว่าด้านนอกของกระดูกจะมีเนื้อกระดูกที่แข็งมากๆ ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า กระดูกเนื้อแน่น (compact bone) ซึ่งมีช่องว่างของเนื้อกระดูกน้อยมาก และคิดเป็นประมาณ 80% ของเนื้อกระดูกในผู้ใหญ่ ส่วนชั้นในของกระดูกจะมีลักษณะที่โปร่งคล้ายเส้นใยสานกัน เรียกว่า กระดูกเนื้อโปร่ง (spongy/cancellous bone) ซึ่งทำให้กระดูกมีความเบา และเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดและไขกระดูก (marrow) ดังรูปที่ 2.1 นอกสุดของกระดูกจะมีเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) หุ้มอยู่โดยรอบ และมีหลอดเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยงเนื้อกระดูก ยกเว้นที่บริเวณข้อต่อซึ่งไม่มีเยื่อหุ้มกระดูกอยู่ [Elaine N. และคณะ 2006]



รูปที่ 2.1 ส่วนหัวของกระดูกต้นขาตัดตามยาว (ที่มา: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>)

เนื้อเยื่อพื้นฐานของกระดูกคือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษ เรียกว่าเนื้อเยื่อกระดูก (osseous tissue) ประกอบขึ้นจากวัสดุคอมโพสิตที่มีความแข็งแรงแต่น้ำหนักน้อย ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทท์ (calcium hydroxyapatite) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความแข็งแรง โดยมีความทนแรงกดประมาณ 130-180 MPa [Paul K. Chu และคณะ และคณะ 2008] และต่อต้านแรงกดได้มาก นอกจากนี้ยังมีคอลลาเจน (collagen) เป็นโปรตีนเส้นใยที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกระดูก เมื่อดูโครงสร้างของกระดูกเนื้อแน่นได้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 2.2) พบเนื้อเยื่อกระดูกมีลักษณะที่เป็นวงซ้อนๆกัน โดยมีศูนย์กลางเป็นช่องขนาดใหญ่ที่เรียกว่า ช่องฮาเวอร์เซียน (Haversian canal) ซึ่งเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูก และวงรอบๆเป็นที่อยู่ของเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่แล้ว

ในเนื้อเยื่อกระดูกประกอบด้วยเซลล์กระดูก (bone cells) ที่มีส่วนสำคัญในการสร้างและการก่อรูปร่างของกระดูกอีกด้วย เซลล์กระดูกมีสามชนิด ได้แก่

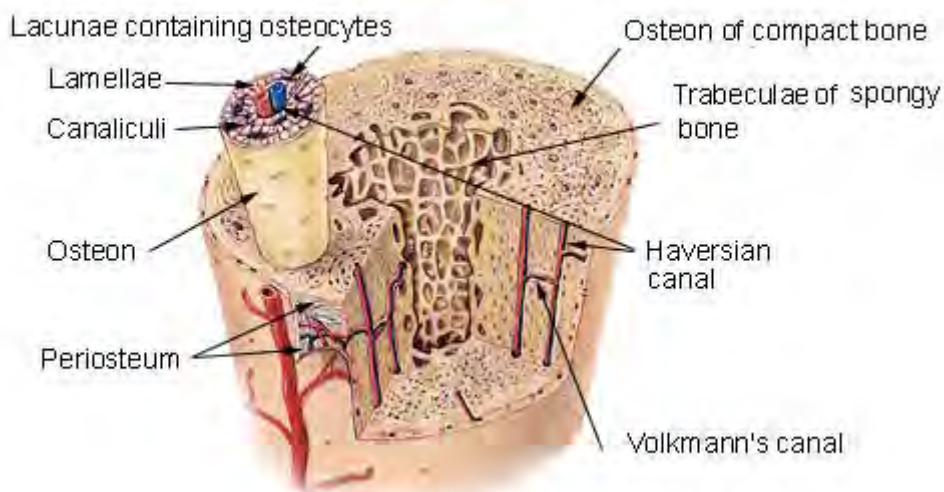
ออสติโอบลาสต์ (Osteoblast) เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) เซลล์นี้จะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้าง

โปรตีนที่เรียกว่า ออสติออยด์ (osteoid) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้จะมีสารอนินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก นอกจากนี้ ออสติโอ بلاสต์ยังสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อกระดูก รวมทั้งสารนอกเซลล์อื่นๆอีกด้วย

ออสติโอไซต์ (Osteocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจากออสติโอ بلاสต์ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว รอบๆเซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลากูนา (lacuna) และแต่ละลากูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็กๆที่เรียกว่า คานาlikuไล (canaliculi) ซึ่งทำให้แต่ละออสติโอไซต์มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาวเวอร์เซียนเข้ามายังแต่ละเซลล์ผ่านทางช่องดังกล่าวนี้ แม้ออสติโอไซต์จะเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่ แต่มันยังมีหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียมและสารนอกเซลล์อื่นๆด้วย

ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโมโนไซต์ (monocyte stem cells) เซลล์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการก่อรูปกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) ในการร่อนเนื้อกระดูก และทำให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้ กระบวนการดังกล่าวยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย [Frank H. และคณะ 1987]

Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)



รูปที่ 2.2 ภาพแสดงภาคตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก
(ที่มา: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>)

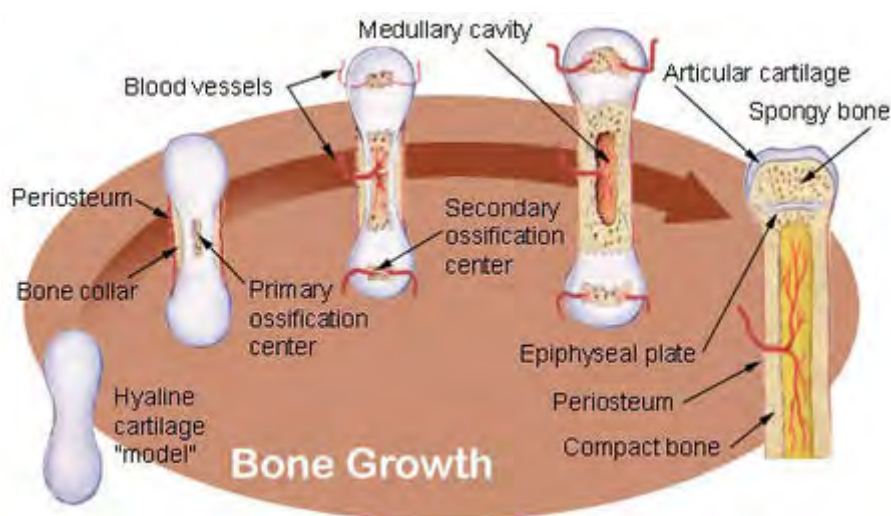
การเจริญพัฒนาของกระดูกจะเริ่มโดยกระบวนการสร้างเนื้อกระดูก (ossification) สามารถแบ่งออกได้เป็นสองรูปแบบ ได้แก่

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

Endochondral ossification เป็นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน (cartilage) ที่มีการเจริญมาก่อนแล้ว โดยที่กลุ่มเซลล์มีเซนไคม์จะเข้าไปแทนที่เซลล์กระดูกอ่อนผ่านทางหลอดเลือด เริ่มจากส่วนกลางของกระดูกซึ่งเป็นจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ เมื่อเซลล์มีเซนไคม์มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก จึงมีการสะสมของเนื้อกระดูกมากขึ้น นอกจากนี้ มักพบว่าจะมีจุดการสร้างกระดูกทุติยภูมิ (secondary ossification center) ที่บริเวณปลายกระดูก โดยการสร้างกระดูกในจุดนี้จะเริ่มหลังจากคลอด การสร้างกระดูกในทั้งสองจุดจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งมาบรรจบกันที่แนวแผ่นอีพิไฟเซียล (epiphysial plate) ซึ่งเป็นแนวของกระดูกอ่อนที่ยังสามารถทำให้เกิดการยืดของกระดูกได้ จนกระทั่งเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ แนวดังกล่าวนี้จะถูกแทนที่ด้วยกระดูกทั้งหมด ดังรูปที่ 2.3

แม้กระบวนการเจริญพัฒนาของกระดูกจะหยุดไปแล้ว แต่ยังคงมีกระบวนการก่อรูปของกระดูกอย่างต่อเนื่อง เพื่อซ่อมแซมความเสียหายเล็กๆน้อยๆ ของกระดูก และเป็นการรักษาระดับแคลเซียมในกระแสเลือดอีกด้วย [Bryan H. และคณะ 2005]

การศึกษาการเกิดแร่ธาตุจากเซลล์ osteoblastic ที่ได้จากการแยกจากเนื้อเยื่อกระดูกของมนุษย์ และหนู นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่แยกออกมาได้จะสังเคราะห์โปรตีน และเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในกระดูก เช่น alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin และ คอลลาเจน type I ในการเพาะเลี้ยง เซลล์ primary จากกระดูกของมนุษย์สามารถเลี้ยงไว้ได้นาน 30 วัน และมีปุ่มเล็กที่สร้างขึ้นเซลล์ ซึ่งปุ่มนี้บรรจุไปด้วย matrix ที่หนาแน่น ประกอบไปด้วย ผลิตภัณฑ์ของ calcium phosphate ฝังอยู่ใน matrix กระบวนการปลดปล่อยของบรรจุ matrix นี้ออกมาจากเซลล์ เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นในการเกิดแร่ธาตุของกระดูก ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องมีการชักนำเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์กระดูกที่ประกอบไปด้วยแร่ธาตุ โดยใช้ β -glycerophosphate, glucocorticoids, sodium β -glycerophosphate, calcium hexose monophosphate และ dexamethasone [Kim H.J. 2005]



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเจริญพัฒนาของกระดูก แบบ Endochondral ossification

(ที่มา: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>)

2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (Bone Tissue engineering)

วัสดุทดแทนกระดูกซึ่งในการรักษาโดยใช้วัสดุทดแทนกระดูกเกิดขึ้นได้เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น โรคทางกระดูก การผ่าตัด และอุบัติเหตุ การปลูกถ่ายกระดูกที่ใช้โดยทั่วไปมี 3 วิธี คือ การปลูกถ่ายด้วยวัสดุจากตัวผู้ป่วยเอง (autograft) การปลูกถ่ายด้วยวัสดุจากผู้อื่น (allograft) และการปลูกถ่ายด้วยวัสดุเลียนแบบชีวภาพ (biomimetic materials) [Zhang N. และคณะ 2007] แต่ทั้ง 3 วิธีก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายด้าน เช่น ด้านวัสดุ พื้นที่ผิวที่รับการปลูกถ่ายกระดูก ปัญหาการติดเชื้อ จึงมีการพัฒนาวิธีสังเคราะห์วัสดุเพื่อมาแก้ปัญหาดังกล่าว โดยอาศัยความรู้ความก้าวหน้าทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ให้มีส่วนเข้ามาพัฒนาวัสดุทดแทน กระดูกไปยัง

บริเวณกระดูกที่เสียหายเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกภายในร่างกาย วัสดุใหม่นี้ทำงานโดยการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ หรือที่เรียกว่า โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) กระดูกในธรรมชาติประกอบด้วยคอลลาเจน โปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีอัตราส่วนระหว่างสารอินทรีย์ต่อสารอนินทรีย์ประมาณ 30:70 [Yuehuei H. A. และคณะ 2003] ดังนั้นในวัสดุทดแทนกระดูกจึงควรมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ที่คล้ายคลึงกับส่วนประกอบในเนื้อเยื่อและสารอนินทรีย์ที่คล้ายคลึงกับส่วนแร่ธาตุที่มีอยู่ในกระดูกจริง และสามารถเตรียมให้มีอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ได้ โดยมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มายึดเกาะได้ดี รวมถึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกได้ นอกจากนี้จะต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อร่างกายอีกด้วย

2.3 โครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (Bone Tissue engineering Scaffold)

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ วัสดุและการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์เป็นสิ่งสำคัญ โครงเลี้ยงเซลล์(Scaffold)หรือ Artificial extracellular matrices (ECM) คือ วัสดุที่สร้างขึ้นชั่วคราวทรงสามมิติเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ได้ โดยอาจทำการฉีดเซลล์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์และเซลล์จะเจริญเติบโตอยู่ภายในซึ่งต้องมีสารอาหารและการควบคุมโมเลกุลที่ต้องแพร่ผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ (โปรตีนและ growth factor เป็นต้น) สิ่งกระตุ้นทางกายภาพและเชิงกล อุณหภูมิ ความดันและการขนส่งมวลสารต้องเหมาะสมกับการงอก การแบ่งเซลล์และการเกิดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่ ในขณะเดียวกันที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะเกิดขึ้นมาใหม่นั้น วัสดุที่ใช้โครง

เลี้ยงเซลล์ต้องสามารถย่อยสลายและไม่ทิ้งสิ่งแปลกปลอมไว้ในร่างกาย [Peter X.M. และคณะ 2004] โดยทั่วไปเรานำโครงเลี้ยงเซลล์ใช้กับผิวหนัง กระดูก ประสาทและตับ เป็นต้น หลักที่ต้องคำนึงในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ไป คือ

1. โครงสร้างเป็นสามมิติ เพื่อเป็นโครงสร้างค้ำจุนให้เซลล์สามารถเจริญเติบโต
2. มีความเป็นรูพรุนสูง โดยมีความเป็นรูพรุนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และรูพรุนต้องมีขนาดที่เหมาะสม โดยทั่วไปขนาดรูพรุนประมาณ 100-200 ไมโครเมตร และรูพรุนควรเชื่อมต่อกัน (Interconnected pore) เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ สารอาหารและของเสียต่างๆ สามารถส่งผ่านภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างสะดวก
3. มีลิแกนด์หรือสมบัติทางเคมีสำหรับให้เซลล์สามารถยึดเกาะ เซลล์เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้
4. สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย โดยไม่ทิ้งสารที่เป็นพิษไว้ ร่างกายสามารถกำจัดได้ตลอดเวลา และมีอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสมกับอัตราการเกิดขึ้นของเนื้อเยื่อใหม่
5. มีโครงสร้างที่แข็งแรงพอสำหรับค้ำจุนเนื้อเยื่อ
6. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์
7. ควรมีสมบัติเพิ่มการเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโต
8. มีความสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก

รายละเอียดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ต้องพิจารณาคือ

2.3.1 ขนาดรูพรุนและความพรุน

ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่จะสร้างขึ้นนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อที่เราต้องการนำไปใช้ เช่น ผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บจากการเผาไหม้ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับผิวหนังแท้ ควรมีรูพรุนประมาณ 150 ไมโครเมตร และเซลล์ osteoblast จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ประมาณ 200-400 ไมโครเมตร สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่โดยทั่วไปควรมีขนาดรูพรุนอย่างน้อย 100 ไมโครเมตร [Chang B.S. และคณะ 2002] และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน 150-710 ไมโครเมตร จะช่วยให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ดีขึ้น [Ishaug S.L. และคณะ 1998] ขนาดและความพรุนของวัสดุต่างๆที่ใช้ทำโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกแสดงในตารางที่ 2.1 ขนาดรูพรุนสามารถแบ่งออกเป็นสามประเภทคือ

- Microporous มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร โมเลกุลขนาดเล็กๆ เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้
- Mesoporous ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูพรุนอยู่ในช่วง 2-50 ไมโครเมตร โดยโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้

- Macroporous ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูพรุนใหญ่กว่า 50 ไมโครเมตร โดยโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่และเซลล์สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้

ขนาดของรูพรุน และความพรุนสำหรับของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.1 สำหรับเส้นเลือดจะสามารถแทรกเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร และเมื่อขนาดรูพรุนและความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่าง ๆ และเซลล์เพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ปฏิบัติการตอบสนองของเนื้อเยื่อข้างเคียงและเซลล์ที่มีต่อโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับรูปร่าง พื้นผิวภายนอกและโครงสร้างภายในของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยจากงานวิจัยของ Palsson B. เสนอว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปร่างโค้งช่วยให้อัตราการตอบสนองกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ดีที่สุด [Palsson, B. และคณะ 2003] โครงเลี้ยงเซลล์ที่ดี โครงสร้างของรูพรุนควรเชื่อมโยงกันเพื่อให้เส้นเลือดสามารถเข้าไปหล่อเลี้ยงเซลล์ที่เข้าไปภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้ดี จากงานวิจัยของ Chang และคณะ (2002) เสนอว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนเชื่อมโยงกันสามารถช่วยให้อัตราการสร้างกระดูกได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนแบบไม่เชื่อมโยงกัน [Chang B.S. และคณะ 2002]

ตารางที่ 2.1 ขนาดรูพรุนและความพรุนและความพรุนของวัสดุต่างๆ ที่ใช้ทำโครงเลี้ยงเซลล์กระดูก [Paul K.C. และคณะ 2008]

ชนิดของวัสดุ	ขนาดรูพรุน (ไมโครเมตร)	ความพรุน (%)
CaP+PLGA	100	75
β -TCP+Chitosan-Gelatin	322-355	85-96
HA+PLLA	100-300	81-91
HA+PLGA	800-1800	30-40

2.3.2 วัสดุสำหรับสร้างโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์สร้างด้วยวัสดุหลัก 3 ชนิดคือ

1. พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน ไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) แป้ง ไคตินและไคโตซาน เป็นต้น พอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้มากกว่าวัสดุชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีสมบัติสามารถเข้ากันได้กับเซลล์ (biocompatibility) ที่ดี

2. พอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น polylactic acid (PLA) polyglycolic acid (PGA) และโคพอลิเมอร์ PLGA โดยวัสดุจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นเวลากว่า 20 ปี อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์สังเคราะห์ประเภท poly(\square -hydroxy acids) จะปล่อยสารที่มีสมบัติเป็นกรดเมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ค่า pH ต่ำลงกว่า pH ในสภาวะร่างกายปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายของพอลิเมอร์นั้นเร็วขึ้น [Buckley C. และคณะ 2004]

3. เซรามิกส์ เช่น hydroxyapatite (HA) และ \square -tricalcium phosphate (\square -TCP) เซรามิกส์นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเช่นเดียวกับวัสดุชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีสมบัติที่สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ (biocompatibility) และมีสมบัติที่คล้ายคลึงกับสารประกอบอนินทรีย์ธรรมชาติของกระดูกและฟัน [Chu T.M.G. และคณะ 2002] ข้อเสียของเซรามิกส์คือ เปราะ มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเซรามิกส์สามารถทนแรงกดได้ดีกว่าแรงดึง

วัสดุที่เหมาะสมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจะนำมาทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจำเป็นต้องใช้วัสดุทั้งจากพอลิเมอร์และเซรามิกส์ประกอบกัน โดยพอลิเมอร์ทำหน้าที่คล้าย Extra cellular matrix (ECM) ช่วยในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ ส่วนเซรามิกส์จะเป็นตัวชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Karageorgiou V. และคณะ 2005]

2.4 เจลาติน (Gelatin)

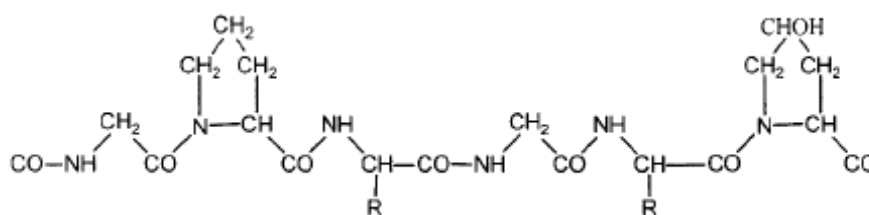
เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากการนำคอลลาเจนทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Partial hydrolysis) จากนั้นผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และทำให้แห้งได้เจลาตินที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเส้นเอ็น ผิวหนัง กระดูกและเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัวและหมู เป็นต้น เจลาตินประกอบด้วยโปรตีน 90-84%, แร่ธาตุ 1-2% และน้ำ 8-15% ซึ่งองค์ประกอบของเจลาตินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของคอลลาเจนที่ใช้และกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เจลาตินมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 100,000 Da โดยเจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด โดยมีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีน, โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยรายละเอียดปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในเจลาตินสรุปดัง

ตารางที่ 2.2 ลำดับ กรดอะมิโนของเจลาตินโดยทั่วไปคือ -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- โครงสร้างของเจลาตินแสดงดังรูปที่ 2.4

เจลาตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้รับความสนใจในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติที่เหมาะสม คือ สามารถเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต (biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) ไม่ก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (nonimmunogenic) และราคาถูก โดยทั่วไปเจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Type A หรือเรียก Basic gelatin เจลาตินชนิดนี้ได้จากการผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟูริก เป็นต้น โดยใช้คอลลาเจนที่ได้จากหนังหมูเป็นส่วนใหญ่ สมบัติของเจลาตินชนิดนี้ คือ มีค่า pI (isoelectric point) ประมาณ 9 เหมาะสำหรับการใช้งานกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

2. Type B หรือเรียก Acidic gelatin ได้มาจากการผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเบสนิยมใช้คอลลาเจนจากหนังวัวและกระดูก ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเบสนี้เกิดปฏิกิริยาที่กลุ่มเอไมด์ของคอลลาเจนซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิล แสดงถึงเจลาตินชนิดนี้มีประจุเป็นลบ เจลาติน type B มีค่า pI (isoelectric point) ประมาณ 5 เหมาะสำหรับการใช้งานกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส กระบวนการผลิตเจลาตินและสมบัติของเจลาติน Type A และ B แสดงดังรูปที่ 2.5 และตารางที่ 2.3 ตามลำดับ



R = glycine-X-Y triplet

X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของเจลาติน

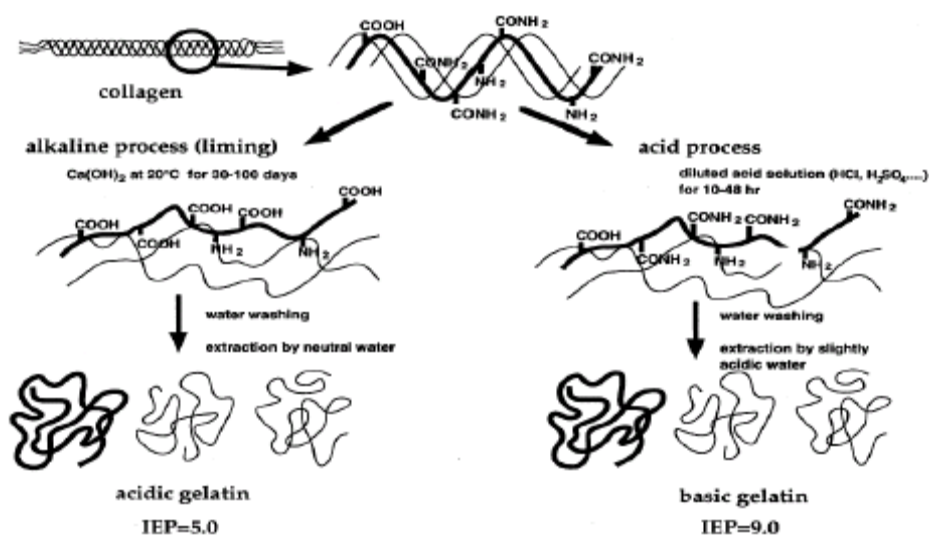
(ที่มา: Lee, SB., 2003; 24: 2503-2511.)

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในเจลาติน (ที่มา: Neuman, RE., 1949; 289-297.)

Amino acid residue	ปริมาณในเจลาติน (%)
Glycine	30.50
Alanine	9.20
Isoleucine	1.50
Leucine	3.20
Valine	2.70
Serine	2.90
Threonine	2.20
Proline	16.30
Phenylalanine	2.10
Tyrosine	0.69
Tryptophan	-
Methionine	0.80
Cystine	0.09
Histidine	0.67
Arginine	8.80
Lysine	5.10
Aspartic acid	6.30
Glutamine acid	11.70

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบสมบัติของเจลาติน Type A และ B

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



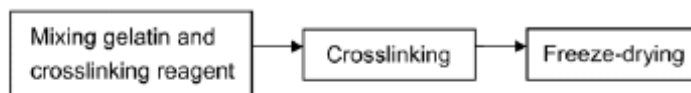
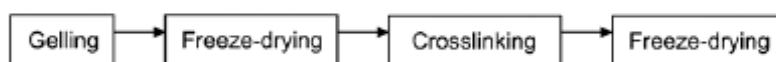
รูปที่ 2.5 แสดงกระบวนการผลิตเจลาติน Type A และ B

(ที่มา: Tabata, Y., 1998; 31: 287-301.)

ปี ค.ศ. 2003 Young Moo Lee และคณะ ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคน (β -glucan) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนเชื่อมต่อกัน โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 90-150 ไมโครเมตร เมื่อนำมาทดสอบเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast พบว่า การยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนใกล้เคียงกับการยึดเกาะของเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ (polystyrene petri dish) เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วบนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคน ที่อัตราส่วน 90/10 wt/wt การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนของเจลาตินต่อเบตา-กลูแคนเพิ่มมากขึ้น ที่เวลา 48 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนอัตราส่วน 90/10 wt/wt มีจำนวนเซลล์ประมาณ 330,000 เซลล์ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนอัตราส่วน 50/50 wt/wt มีจำนวนเซลล์ประมาณ 200,000 เซลล์ [Lee SB. และคณะ 2003]

ในปี ค.ศ. 2005 Sang Bong Lee และคณะ สร้างโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินโดยใช้วิธี salt-leaching โดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง วิธี salt-leaching สามารถสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีรูพรุนได้ตามที่ต้องการ งานวิจัยนี้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 350 ไมโครเมตร ความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ และอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินทดสอบการเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ human fibroblast เมื่อเวลา 1 สัปดาห์ผ่านไป พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยเทคนิค salt-leaching เซลล์เกาะที่บริเวณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็งเซลล์ส่วนใหญ่รวมตัวกันอยู่ที่บริเวณด้านบนและด้านล่างโครงเลี้ยงเซลล์ ที่เวลา 2 สัปดาห์ เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดีและมีเซลล์แผ่ซึ่งแสดงถึงความเข้ากันได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ยังไม่มีการย่อยสลาย การทดลองภายในร่างกาย (*in vivo*) พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์และมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ [Sang B.L. และคณะ 2005]

ปี ค.ศ. 2007 Lien, S.M. และคณะ ศึกษาวิธีการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วย glutaraldehyde (GTA) และ genipin (GP) ที่แตกต่างกันได้แก่ วิธีที่ 1 (mixing-crosslinking) ผสมสารเชื่อมโยงพันธะกับสารละลายเจลาตินและทำแห้งเยือกแข็ง วิธีที่ 2 (scaffold-crosslinking) นำสารละลายเจลาตินแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้สารละลายเจลาตินเป็นเจล และทำแห้งเยือกแข็ง จากนั้นทำการเชื่อมโยงพันธะโดยการจุ่มในสารละลายตัวเชื่อมโยงพันธะและทำแห้งเยือกแข็ง และวิธีที่ 3 (gel-crosslinking) คล้ายคลึงกับวิธีที่ 2 หลังจากให้นำสารละลายเจลาตินแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเปลี่ยนสภาพเป็นเจล จากนั้นนำเจลจุ่มในสารละลายตัวเชื่อมโยงพันธะและทำให้แห้งเยือกแข็ง วิธีการเชื่อมโยงพันธะสรุปดังรูปที่ 2.6 Huang, T.G. และคณะศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ พบว่าโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยวิธีที่ 1 มีรูพรุนสม่ำเสมอและเชื่อมโยงกันแต่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าวิธีที่ 2 และ 3 เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ทดสอบเลี้ยงเซลล์ chondrocytes จากข้อต่อของหนู Wistar และวิเคราะห์ด้วยการย้อมสี H&E พบว่าเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน หลังจากการเพาะเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วย GP มีการสร้างคอลลาเจนและ glycosaminoglycan เมื่อผ่านไป 30 วันหลังจากเพาะเซลล์ พบว่าเซลล์มีการกระจายทั่วเนื้อเยื่อลักษณะเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อกระดูก แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยวิธีที่ 3 (gel-crosslinking) สามารถประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก [Lien S.M. และคณะ 2007]

Method I : mixing-crosslinking**Method II : scaffold-crosslinking****Method III : gel-crosslinking**

รูปที่ 2.6 แสดงวิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ
(ที่มา: Lien, S.M. และคณะ, 2006)

2.5 ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite)

สารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ เป็นสารประกอบจำพวกแคลเซียมฟอสเฟต ที่มีสูตรทางเคมี คือ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ หรือ $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}(\text{OH})_2$ มีอัตราส่วนโดยโมลของ Ca:P เป็น 1.67 รูปผลึกเป็นโครงสร้างโมเลกุลจะเป็นเสมือนโครงตาข่าย (lattice work) สามมิติ โดยมีไอออนบวก (cations) เป็นแกนกลางล้อมรอบด้วยไอออนลบ (anions) ในลักษณะที่สมดุลกันพอดี [Duthie R.B. และคณะ 1983]

Esmail Jabbari และคณะ (2005) ได้ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่เป็นนาโนคอมโพสิตระหว่าง hydrogel/apatite เพื่อการงอกของกระดูก โดยอนุภาคนาโนของ hydroxyapatite (HA) จะถูกนำมาต่อกิ่งบน hydrophobic unsaturated poly(ethylene glycol)oligomer ก่อนเพื่อเพิ่มเสถียรภาพในการแขวนลอยในสารละลายไฮโดรเจล การต่อกิ่งจะมี 2 ขั้นตอน ในขั้นแรก poly(ethylene glycol)methacrylate (PEGMA) จะถูกควบแน่นกับ 3-isocyanatopropyltrimethoxysilane (iCPTMS) เพื่อเกิด PEGMA-PTMS urethane เพื่อให้เกิด PEGMA-PTMS urethane โดยมี unsaturated methylacrylate และ trimethoxysilane เป็นหมู่ปลาย และในขั้นที่ 2 หมู่ปลายของ urethane ที่เป็น trimethoxysilane จะถูกทำปฏิกิริยาด้วยหมู่ฟอสเฟต และคาร์บอเนต ที่ผิวของ HA เพื่อสร้าง HA ที่มีกิ่ง PEGMA oligomers (gHA) [Esmail J. และคณะ 2005]

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนของ hydrogel/apatite เตรียมได้จาก PLEOF ซึ่งใช้เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ ย่อยสลายได้ ส่วนสารที่ทำให้เกิดการเชื่อมโยง ได้แก่ methylenebisacrylamide (MBIS) และมี NaCl เป็นสารที่ทำให้เกิดรู (porogen) นำ gHA โดยน้ำหนักเท่ากับไฮโดรเจลใส่ลงในส่วนผสมพอลิเมอร์ แล้วย้ายไปใส่ในแม่แบบเทฟลอน แล้วนำไปใส่ในเตาอบ เพื่อให้เกิดการเชื่อมโยง ส่วนสารที่ทำให้เกิดรูนั้นจะเอาออกโดย scaffold ไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 วัน ซึ่งต้องเปลี่ยนน้ำทุกๆ 8 ชั่วโมงแล้วนำไปทำให้แห้งในสุญญากาศเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน โครงเลี้ยงเซลล์ถูกฆ่าเชื้อด้วยเมทานอลแล้วล้างด้วย PBS แล้วนำไปทดสอบการยึดติดกับเซลล์ (neonatal heart fibroblast cells) เพาะไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ติดกับโครงเลี้ยงเซลล์ แล้วล้างด้วย PBS แล้วทำให้สามารถซึมน้ำได้โดยการแช่ใน PBS กับ 0.1% triton x-100 และ 0.1M glycine จากนั้นย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ด้วย 4',6-Diamidino-2-phenylindole หรือ SYTOX Green แล้วสลับด้วย Texas Red-X Phalloidin เนื่องจาก PLEOF hydrogel นั้นเฉื่อยทำให้เซลล์ไม่ติดกับผิวของแบบจำลอง แต่เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปปรับปรุงพื้นผิวด้วยด้วยคอลลาเจน จะทำให้เซลล์ติดที่ผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ได้

Guang Chen และคณะ (2004) ได้ทำการปรับปรุง โครงเลี้ยงเซลล์ poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ด้วยไฟโบรอินจากไหม (silk fibroin, SF) โดยจาก SEM แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลาย ไฟโบรอินจะมีผลต่อสัดส่วนวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ผสม PCL-SF ที่ได้ส่วน ATR-FTIR ได้แสดงให้เห็นว่ามี SF อยู่ที่ผิวของ scaffold และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุล และ wettability ของ โครงเลี้ยงเซลล์ผสมนั้นดีขึ้นมาก เมื่อนำเซลล์เนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์มาเพาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ผสมพบว่าเซลล์ เพียงไม่กี่เซลล์ที่นำไปเพาะเมื่อเวลาผ่านไป 7 วันมีเซลล์เกิดขึ้นจำนวนมาก การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยไฟโบรอินจากไหมเป็นการทำให้ PCL เข้ากับร่างกายได้ดีขึ้น จึงทำให้สามารถนำไปใช้เป็นเนื้อเยื่อวิศวกรรมได้จริงๆ [Guang C. และคณะ 2004]

Kong X.D. และคณะ (2004) ทำการตกผลึกระหว่างไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) บนไฟโบรอินจากไหม โดยใช้แคลเซียมฟอสเฟตตกตะกอนในสารละลายของไฟโบรอินจากไหมที่ pH 8 และอุณหภูมิห้อง จากผลการทดลอง ค่อนข้างแข็งแรงซึ่งจะทำให้ฟิสิกของเอไมด์นั้นเลื่อนไปจากตำแหน่ง 1517-1539 cm^{-1} และจาก TEM แสดงให้เห็นอีกว่าผลึก HA รูปร่างเหมือนท่อนไม้ (rod-like) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 นาโนเมตร [Kong X.D. และคณะ 2004]

Li Wang และคณะ (2004) ได้ทำการสังเคราะห์วัสดุประกอบระหว่างไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) กับไฟโบรอินจากไหม (SF) โดยวิธีการตกตะกอนร่วม ซึ่งทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของไฮดรอกซีอะพาไทต์ต่อไฟโบรอินจากไหม พบว่าที่ปริมาณไฟโบรอินจากไหมมากกว่า 40% โดย

น้ำหนักขึ้นไป การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผลึก HA จะแคบลง วัสดุประกอบที่สังเคราะห์ได้นี้รูปพรุนจะเป็นรูเปิดประมาณ 62-74 % และประมาณ 70 % ของรูที่เชื่อมต่อกันมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-115 ไมโครเมตร แต่ที่ปริมาณของไฟโบรอินจากไหมเท่ากับ 30% โดยน้ำหนัก พบว่าผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์มีขนาดใกล้เคียงกันและกระจายตัวของผลึกออกเป็นสามมิติ [Li W. และคณะ 2004]

Chang M.C. และคณะ (2005) ได้ทำการสังเคราะห์วัสดุประกอบร่วมของเจลาติน (GEL) กับ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) โดยทำการตกตะกอนผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ในสารละลายเจลาตินที่ pH 8 และอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส พบว่าในการวิเคราะห์ด้วย FT-IR พันธะเคมีระหว่างแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์กับคาร์บอกซิลไฮดรอกซีอะพาไทต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย TEM พบว่า ไฮดรอกซีอะพาไทต์จะรวมตัวกันเป็นผลึกระดับนาโนเมตรตลอดเส้นใยเจลาติน และมีขนาดของผลึกในสารละลายเจลาตินเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างเจลาตินกับไฮดรอกซีอะพาไทต์เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเจลาตินมากจะทำให้ได้ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ขนาดเล็ก และที่ความเข้มข้นของเจลาตินน้อยจะทำให้ได้ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ขนาดใหญ่ [Chang M.C. และคณะ 2005]

Hae-Won Kim และคณะ (2005) ทำการเตรียมไฮดรอกซีอะพาไทต์จากเจลาติน 2 ชนิด คือ เจลาติน (Type B)-calcium nitrate และ gelatin-ammonium hydrogen phosphate ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วปรับเป็น pH 10 กวนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่ 40 องศาเซลเซียส นำไปเทใส่แม่พิมพ์ที่ทำจากพอลิสไตรีน แข็งจนแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส แล้ว freeze-dried 72 ชั่วโมง ทำการเชื่อมโยงพันธะด้วย dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride (EDC) แล้วนำไปเลี้ยงเซลล์ osteoblastic MG63 พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี และยังมีกิจกรรมของ alkaline phosphatase (ALP) ในปริมาณสูง [Hae-Won Kim และคณะ 2005]

นอกจากนี้ยังการใช้วัสดุชนิดอื่นมาใช้ในการทำโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกชนิดอื่นอีก เช่น มีการใช้ N-methyl-2-pyrrolodone มาใช้ร่วมกับพอลิเมอร์ผสมชนิดอื่นในการผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่นำไปฝังในร่างกายมนุษย์ซึ่ง poly(D,L-lactide-co-caprolactone (PLCL) พอลิเมอร์ผสมเป็นตัวเลือกหนึ่งที่สามารถใช้เป็นส่วนประกอบวัสดุนี้ ในที่นี้ผลิตเพื่อใช้สำหรับกระตุ้นการเจริญของกระดูกเนื่องจากส่วนประกอบของพอลิเมอร์ที่ผสมเข้าด้วยกันมีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก และยังช่วยเพิ่มการซ่อมแซมกระดูกหลังจากกระดูกหัก รวมถึงยังมีการใช้พอลิเมอร์ผสม PLCL ประกอบร่วมกับ Hydroxyapatite และ Tricalcium phosphates สำหรับศึกษาในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกพอลิเมอร์ผสม PLCL สังเคราะห์โดยใช้ L-lactide และ

Caprolactone ด้วยกระบวนการ Ring-opening polymerization และจะทำการผสม Hydroxyapatite หรือ Tricalcium phosphates ลงในพอลิเมอร์ผสมเพื่อสร้างเป็น PLCL พอลิเมอร์ประกอบ ส่วนการขึ้นรูปนั้นจะทำเป็นฟิล์ม (ทั้งของพอลิเมอร์ผสมธรรมดาและพอลิเมอร์ประกอบ ด้วยวิธี Solvent casting และทำให้ฟิล์มมีโครงสร้างเป็นรูพรุนโดยให้อยู่ภายใต้ Supercritical CO₂ ที่ 3300 psi ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยขนาดรูพรุนจะอยู่ในช่วง 40-80 μm จากการศึกษาพบว่าฟิล์มที่มีรูพรุน (ทั้งของ Copolymer ธรรมดาและ Composite) สลายตัวใน Ringer solutions เร็วมากกว่าฟิล์มที่ไม่มีรูพรุน (Untreated non-porous films) [Aydin H. และคณะ 2004] และมีการใช้ PLCL sponges โดยนำไปเคลือบด้วย Ca/apatite สำหรับทำเป็นวัสดุใส่ในกระดูกที่เสียหายเพื่อช่วยสร้างเนื้อกระดูก (Bone-filling material) และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Non coated control sponges) โดยทำการฝังเพื่อทดสอบในส่วนเปลือกของกระดูกต้นขา (Femur cortical) ที่ทำให้บาดเจ็บในหนูและภายใน Dorsal subcutaneous space แล้วตรวจสอบทาง Histological หลังการฝังที่เวลา 2, 4, 33 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า วัสดุที่ใช้ฝัง (Implants) พบปริมาณกระดูกเท่าๆกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบการตอบสนองการอักเสบเล็กน้อย ส่วนการสลายตัวของพอลิเมอร์พบว่าส่วนใหญ่ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้พบว่า Osteoblasts เพิ่มจำนวนได้ดีบนวัสดุ Ca/apatite-coated ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบเล็กน้อยเท่านั้น จากการศึกษาสรุปได้ว่าการเคลือบ PLCL sponges ด้วยCa/apatite ช่วยในติดของ Osteoblasts แต่ไม่ได้เพิ่มจำนวนการสร้างเนื้อกระดูกมากไปกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อศึกษาในสิ่งมีชีวิต [Holmbom J. และคณะ 2005]

2.6 โครงสร้างเซลล์กระดูกที่มีในระบบการค้ำ

ในปัจจุบันมีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ในเชิงการค้าเพื่อใช้สำหรับซ่อมแซมกระดูกส่วนที่เสียหาย ซึ่งวัสดุส่วนใหญ่จะมี hydroxyapatite และ tricalcium phosphate เป็นองค์ประกอบหลัก ดังตารางที่ 2.4 โดยเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่ามีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการสร้างกระดูกทดแทน

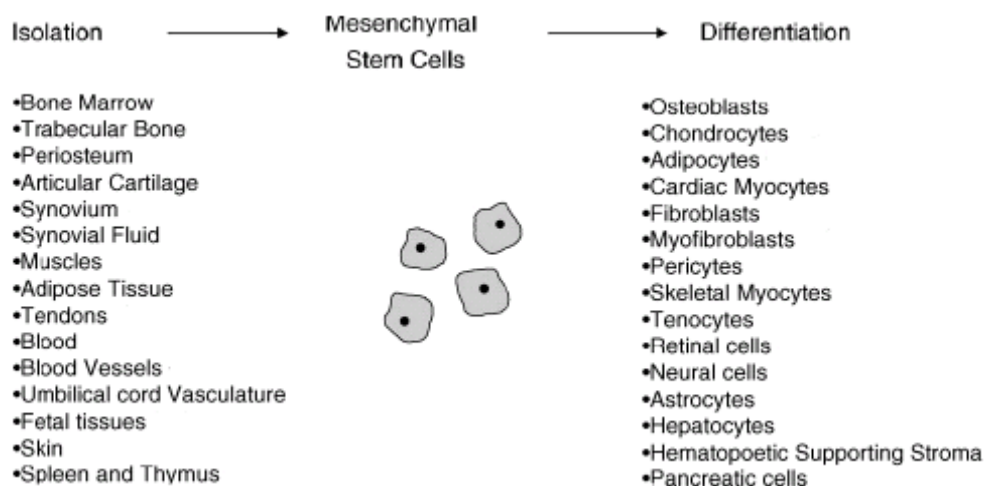
ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างข้อมูลโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกที่มีในระบบการค้า

ชื่อผลิตภัณฑ์	วัสดุที่ใช้เตรียม	ข้อมูล	ที่มา
<p>ApaPore™</p> 	Hydroxyapatite	โครงสร้างคล้ายกระดูกเนื้อ โปร่ง มีรูพรุนขนาดเล็ก ความ พรุน 25% รูเชื่อมต่อกันทำให้ อาหารไหลผ่านได้ดี และ กระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลง เป็นกระดูก	Apatech Available at URL: http://www.medcompare.com/ details/39074/ApaPore- Hydroxyapatite-Bone-Graft- Substitute.html
<p>Bi-Ostetic™</p> 	60% Hydroxyapatite และ 40% □- Tricalcium Phosphate	ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา และ ผ่านจากรับรองจาก FDA	Berkeley Advanced Biomaterials Available at URL: http://www.medcompare.com/ details/31900/Bi-Ostetic-Slow- Resorbtion-Bone-Filler.html
<p>Cem-Ostetic®</p> 	Calcium Salts และ Nanocrystalline hydroxyapatite	ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา และ ผ่านจากรับรองจาก FDA ใช้กับ ผู้ป่วยอายุ 13-78 ปี	Berkeley Advanced Biomaterials Available at URL: http://www.medcompare.com/ details/31901/Cem-Ostetic- Optimal-Bone-Generation.html
<p>VITOSS®</p> 	beta-tricalcium phosphate อนุภาคขนาด 100 nm	ขนาดรูพรุน 1-1000 μm	Orthovita Available at URL: http://www.medcompare.com/ details/20379/VITOSS- Synthetic-Cancellous-Bone- Void-Filler.htm
<p>Plexur™ P Bone Void Filler</p> 	polylactide-co- glycolide,	มีการเติม calcium, phosphate, trace elements และ extracellular matrix proteins ลงเพื่อช่วยในการ เชื่อมต่อกกระดูก	Osteotech, Inc. Available at URL: http://www.medcompare.com/ prodalerts.asp?id=1409

2.7 Mesenchymal stem cells (MSCs)

Mesenchymal stem cells คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (Mesoderm) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ เช่น กระดูก, กระดูกอ่อน, เนื้อเยื่อไขมัน, เส้นเอ็นและกล้ามเนื้อ แสดงดังรูปที่ 2.7 MSC สามารถแยกออกมาจากไขกระดูก เนื้อเยื่อไขมัน และเลือดสายสะดือ (cord blood) เป็นต้น ในปี 1995 Lennon และคณะ แยก MSC จากไขกระดูกจาก Fisher F-344 rat อายุ 2-4 เดือน [Lennon, D.P. และคณะ 1995] เซลล์ MSC เมื่อนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์ยึดเกาะบนจานเลี้ยงเซลล์และเริ่มเจริญเติบโตรวมกันเป็นกลุ่มหรือเรียกว่า fibroblastic-like cell cluster (fibroblast colony forming units: CFU-F) [Sautier J.M. และคณะ 1993] การควบคุมให้ MSC เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ สามารถทำได้โดยการใส่ growth factor และ cytokines เป็นต้น นอกจากนี้การกำหนดให้เซลล์ MSC เปลี่ยนรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดใดนั้น ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ โดยหลังจากการแยก MSC จากไขกระดูกและต้องการเลี้ยงเซลล์ MSC ให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กระดูกควรอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ dexamethasone, ascorbic acid และ β -glycerolphosphate (osteogenic supplements) [Donzelli E. และคณะ 2007] การเกิดกระดูกต้องการโครงเลี้ยงเซลล์ลักษณะสามมิติเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนรูปร่างได้

ปี ค.ศ. 2006 International Society for Cellular Therapy (ISCT) ได้เสนอหลักเกณฑ์ 3 ประการเพื่อกำหนดและบ่งชี้เซลล์ MSC ดังนี้ คือ [Dominici M. 2006] ประการแรกเซลล์จะต้องยึดติด (adherent) กับจานพลาสติกบนจานทดลองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ประการที่สองเซลล์จะต้องให้ผลบวกต่อแอนติเจนเหล่านี้ เช่น CD105, CD73 และ CD90 นอกจากนี้ยังต้องไม่มีการแสดงออกของ hematopoietic antigen เช่น CD45, CD34 รวมถึง marker ของเซลล์โมโนไซต์ เซลล์แมโครฟาจและบีเซลล์ ประการที่สามเซลล์จะต้องสามารถชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้อย่างน้อย 3 ชนิดคือ เซลล์ osteoblast, adipocytes และ chondroblast



รูปที่ 2.7 แสดงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปร่างของ MSCs
(ที่มา: Pountos A. และคณะ, 2005)

ในปี ค.ศ. 2004 Tabata Y. และคณะ [Tabata, Y. และคณะ 2004] สร้างโครงเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินและเติมเบตา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (β -tricalcium phosphate: β -TCP) ในปริมาณต่าง ๆ และนำไปทดสอบเลี้ยงเซลล์ mesenchymal stem cells (MSCs) ที่แยกจาก bone marrow ของหนู (Fisher 344 rat เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์) เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูก เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสม β -TCP ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งมีขนาดรูพรุน 180-200 ไมโครเมตร ความพรุน 96% ทดสอบเลี้ยงเซลล์ MSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 15% FCS พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากการใส่เซลล์ พบว่าเซลล์สามารถเกาะโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี β -TCP อัตราส่วนต่าง ๆ ได้ดีเท่ากัน แต่รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงตามปริมาณของ β -TCP เมื่อปริมาณ β -TCP มากเซลล์มีรูปร่างแบน และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาการเกิดสร้างเนื้อเยื่อกระดูกพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย β -TCP 50 wt% เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูกมากที่สุด และในปี ค.ศ. 2007 Donzelli, E. และคณะ [Donzelli E. และคณะ 2007] ใช้โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน type I จากบริษัท Gingistat เพื่อเลี้ยงเซลล์ MSC ที่แยกออกจากไขกระดูกของ Sprague-Dawley rat เพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ โดยใส่เซลล์ 1×10^6 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ เปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (CTRL) และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ osteogenic supplement (OS medium) ได้แก่ dexamethasone, β -glycerolphosphate และ 2-phosphate-ascorbic acid ผลการวิจัยพบว่า การเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium ในวันที่ 7 หลังจากการเพาะเซลล์ เซลล์มี

การเจริญเติบโตที่ทั้งโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนและเซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่ม (colony) ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดา (CTRL) เซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่มในวันที่ 21 หลังจากการเพาะเซลล์ และขนาดของกลุ่มเซลล์มีขนาดเล็กกว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium และผลการวิเคราะห์ ALP activity assay พบว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium มีค่า ALP สูงกว่า กลุ่ม CTRL เมื่อทดสอบย้อมสีด้วย alizarin red พบว่ามีการสะสมของแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นในการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium ช่วยกระตุ้นให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้

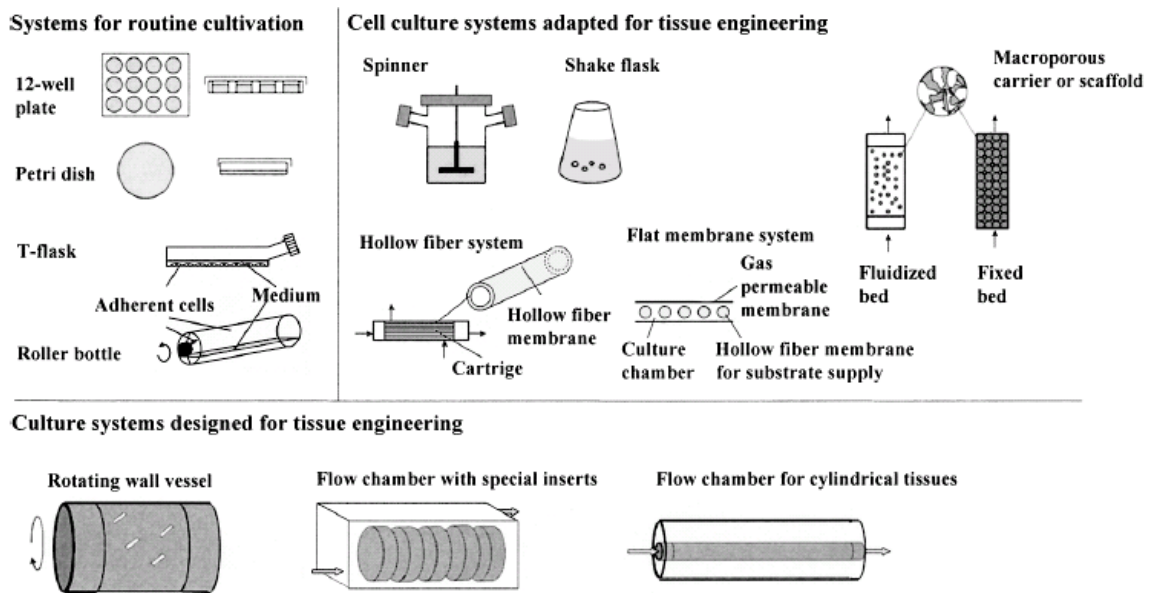
นอกจากการเติมสารต่างๆ เช่น growth factor หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ของ MSC เป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เพื่อควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ MSC สามารถทำควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้โดยการดัดแปลงหรือปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีสมบัติเหมาะสมกับ MSC เช่น สมบัติทางเคมีของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถควบคุมพฤติกรรมของเซลล์ การยึดเกาะ, รูปร่างและการเปลี่ยนแปลงหน้าที่เป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ โดยพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ควรประกอบด้วยหมู่ methyl (-CH₃), hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH), amino (-NH₂) และ silane (-SH) ซึ่งหมู่เหล่านี้พบใน biological system โดยในปี ค.ศ. 2006 Curran, J.M. และคณะ ศึกษาการปรับปรุงพื้นผิว (silane-modified surface) เพื่อควบคุมการยึดเกาะของ MSC และการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่นในสภาวะเลียนแบบร่างกาย (*in vitro*) โดยทดสอบเลี้ยงเซลล์ human MSC ด้วยจานแก้วเพาะเชื้อที่ดัดแปลงหมู่ที่พื้นผิวได้แก่หมู่ methyl (-CH₃), hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH), amino (-NH₂) และ silane (-SH) พบว่าหมู่ -NH₂ และ -SH ช่วยสามารถกระตุ้นให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (osteoblasts) นอกจากนี้หมู่ -OH และ -COOH ช่วยให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็น chondrocytes [Curran J.M. และคณะ 2006]

2.8 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor)

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีบทบาทสำคัญสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในการควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมกับการเลี้ยง MSC เพื่อเปลี่ยนแปลงให้เป็นเนื้อเยื่อกระดูก เนื่องจากการเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาในสภาวะที่อยู่สถิตย์ (Static) มีปัญหาเช่น ผลของการถ่ายโอนมวลสารทำให้ไม่สามารถกระจายอาหาร และออกซิเจนไปได้ทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ และมีการสะสมของเสียที่สร้างขึ้นจากเซลล์โดยไม่มีกระบวนการระบายออก ทำให้เซลล์ไม่สามารถกระจายตัวและเจริญเติบโตได้ทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะเจริญได้ดีที่ผิวรอบนอกของโครงเลี้ยงเซลล์ ส่วนด้านในของโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะไม่เจริญและตายในที่สุดทำให้สร้างเนื้อเยื่อได้ไม่ดี รวมทั้งช่วยใน

การทดสอบ Intracellular matrix ที่เซลล์สร้างขึ้น เพื่อให้ได้ผลไวและไม่มีปัญหาของระบบ ภูมิคุ้มกันเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อใช้ในงานด้าน วิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้

ขั้นตอนของการเลี้ยงเซลล์ทำโดยทำการเตรียมเซลล์จากไซกระดุกเพื่อแยก MSC ต่อจากนั้นนำ MSC ที่แยกได้นำมาเลี้ยงกับโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งทำมาจากโพลีเมอร์ซึ่งมีคุณสมบัติเข้ากับสิ่งมีชีวิตได้ เซลล์เจริญเติบโตได้ดี และย่อยสลายได้ ทำการเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งมีการควบคุมต่าง ๆ เช่น pH, อุณหภูมิ, ออกซิเจน, อาหาร และแรงทางกลที่ใช้ในการชักนำให้ เซลล์เจริญและเปลี่ยนแปลงหน้าที่ไปเป็นเซลล์กระดูก เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีอยู่หลายชนิด โดย แบ่งออกเป็นชนิดที่อยู่กับที่ได้แก่ T-flasks, petri dishes, multi well plates และแบบที่มีการกวน ผสมในถัง เช่น shake flasks, stirred vessels, super spinner (รูปที่ 2.8) การเลี้ยงเซลล์ในโครง เลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีผลในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ตับ, หลอดเลือดหัวใจ และกระดูกอ่อน ขึ้นอยู่กับ ช่วงเวลาในการเลี้ยง, อาหารที่ใช้เลี้ยง, การ หมุนเวียนของอาหารซึ่งมีผลต่อขนส่งสารอาหารผ่านเซลล์และการตรึงออกซิเจนของเซลล์ [Sajc L. และคณะ 2002, Pörtner R. และคณะ 2005]



รูปที่ 2.8 ระบบการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (ที่มา: Pörtner R. และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบการกลศาสตร์การไหลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่างๆ [Feed และ คณะ 1998]

ชนิดของ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ	กลไกของการผสม	การถ่ายโอน มวลสาร	แรงเฉือน (Shear)
Static flask	Diffusion	Slow	None
Mixed flask	Convective flow	Fast	Turbulent, steady
Rotating vessel	Construct setting	Fast	Laminar, dynamic
Perfused Cartridge	Convective flow	Fast	Laminar

ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่างๆ

ชนิดของ เครื่องปฏิกรณ์ ชีวภาพ	เวลาที่ใช้ ในการเลี้ยง	การเพิ่มจำนวน (เท่าจากเซลล์ เริ่มต้น)	เอกสารอ้างอิง
biaxial rotating	7 วัน	2	Zhi-Yong และคณะ, 2009
T-flasks	8 วัน	6.9	Yang และคณะ, 2006
Rotating wall vessel	8 วัน	435.5	Yang และคณะ, 2006
Stirred bioreactor	14 วัน	400	Collins และคณะ, 1998
Fixed bed bioreactor	14 วัน	4.2	Meissner และคณะ, 1999
Perfusion chamber	16 วัน	10	Koller และคณะ, 1993

Freed และคณะ (1997) ได้ทดสอบการเกิดกระดูกอ่อนโดยการเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหมุน (Rotating) โดยใช้เซลล์กระดูกข้อต่อของลูกวัวเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติของ polyglycolic acid ใช้เซลล์ 5×10^6 เซลล์ ต่อ PGA 1 ชั้น ที่มีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร ใช้ PGA 10 ชั้น ในปริมาตรอาหาร 125 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงไว้ 3 เดือนบนโลก และนำไปเลี้ยงต่ออีก 4 เดือนบนสถานีอวกาศเมียร์ แล้วเปรียบเทียบกับที่เลี้ยงบนโลกพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตทั้งบนโลกและอวกาศ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนซึ่งวัดได้จากปริมาณของ proteoglycan และ type II collagen แต่รูปร่างของเซลล์ที่เลี้ยงบนโลกจะมีลักษณะเป็นจานแบน (Plate) ซึ่งเป็นผลมาจากแรงโน้มถ่วงของโลก ส่วน

ในอวกาศจะมีลักษณะเป็นทรงกลมเพราะไม่มีผลจากแรงโน้มถ่วงของโลกทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ทุกทิศทาง คุณสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์บนโลกจะดีกว่าที่สถานีอวกาศเมียร์ [Freed และคณะ 1997]

ต่อมาคณะเดียวกัน [Freed และคณะ 1998] ได้ศึกษาการเกิดกระดูกอ่อนในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหมุน เซลล์นำมาจากข้อต่อของวัวเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ polyglycolic acid ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ โดยโครงสร้างของเซลล์-โพลีเมอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.7 มิลลิเมตร หนา 5 มิลลิเมตร เลี้ยงไว้ 40 วัน เปรียบเทียบกับการเกิดกระดูกอ่อนจากธรรมชาติ พบว่ามี glucosaminoglycan (GAG) มากกว่า 68% และ type II collagen มากกว่า 33% ของน้ำหนักเปียก ในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติการเพาะเซลล์จะใช้ความหนาแน่นสูงเพื่อทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์และพัฒนาไปเป็นกระดูกอ่อนต่อไป

Pei และคณะ (2002) ศึกษาการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่างๆ พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของวัว 3 วัน ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีเซลล์เพิ่มขึ้น 76-132% เปรียบเทียบกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น 47-63% มีปริมาณ glucosaminoglycan, type II collagen และความยืดหยุ่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในปฏิกรณ์ชีวภาพมากกว่าในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งผลของการหมุนมีความเร็วต่ำเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพทำให้อาหารผสมเข้ากัน และมีแรงเฉือนต่ำ แต่มากกว่าในจานซึ่งอยู่ในสภาวะสถิตย์ ซึ่งการให้แรงทางกลจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์และเปลี่ยนแปลงไปเซลล์กระดูกอ่อน ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตข้างหน้าเกี่ยวกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือการออกแบบระบบให้เหมาะสมกับการเลี้ยง MSC เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก [Pei M. และคณะ 2002]

Marolt และคณะ (2006) ได้ทำการเลี้ยง MSC จากไขกระดูกของมนุษย์ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไฟโบรอินจากไหมในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหมุน โดยใช้อาหารที่อาหารที่ซักรทำให้เกิดเซลล์กระดูกอ่อน และกระดูก ใช้เซลล์ passage ที่สอง เลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ได้ผลคือ ในอาหารที่ซักรทำให้เกิดกระดูกอ่อนมีเซลล์เพิ่มขึ้น 1.5 เท่า มี glucosaminoglycan เพิ่มขึ้น 4 เท่า ในอาหารที่ซักรทำให้เกิดกระดูก พบว่าเซลล์เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า กิจกรรมของ alkaline phosphatase (ALP) เพิ่มขึ้น 8 เท่า และปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้น 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดอาหารควบคุม [Marolt และคณะ 2006]

Mygind และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเกิดเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน ทำมาจาก hydroxyapatite ที่ได้จากปะการัง ขนาดของรูพรุน 200 และ 500 นาโนเมตร ใช้ MSC ของมนุษย์ เลี้ยงที่สภาวะสถิตย์ และ spinner flasks เป็นเวลา 21 วัน พบว่ารูขนาด 200 นาโนเมตร แสดงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกเร็วกว่ารูพรุนขนาด 500 นาโนเมตร ซึ่งแสดงโดย

กิจกรรมของ alkaline phosphatase และ real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction สำหรับการตรวจสอบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระดูก รูขนาด 500 นาโนเมตรมีจำนวนเซลล์สูงกว่าจากการตรวจด้วย ปริมาณ DNA, scanning electron microscopy และ fluorescence microscopy [Mygind T. และคณะ 2007]

Zhi-Yong และคณะ (2009) ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์บนโครงเลี้ยงเซลล์ polycaprolactone–tricalcium phosphate (PCL–TCP) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ biaxial rotating เพื่อให้เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก พบว่าหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 28 วันในอาหาร osteogenic medium พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเซลล์เริ่มต้น และเซลล์มีชีวิตอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ห่างจากผิว 2 เซนติเมตร มีการสร้าง alkaline phosphatase และแคลเซียม 1.5 เท่า และ 5.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะสถิตย์ [Zhi-Yong และคณะ 2009]

2.9 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ในประเทศไทย

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการจดสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้เซลล์ต้นกำเนิด

ต่างประเทศ

— เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

: European Patent 1359214

: ปี 2003

เจ้าของผลงาน : Oostr และ Jaap

ทำการคิดค้นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหมุนวนอาหารผ่านท่อโดยใช้ปั๊มจากถังพักเข้าสู่ภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งภายในบรรจุโครงเลี้ยงเซลล์ โดยมีการผ่านอาหารจากทางด้านล่างของ ผ่านโครงเลี้ยงเซลล์แล้วออกทางด้านบน หมุนวนอาหารเข้าถังพัก แล้วหมุนวนไปเรื่อยๆ เป็นวงจร โดยโครงเลี้ยงเซลล์ทำมาจากวัสดุประเภทพลาสติก เช่น polycarbonate (PC), polyethylene (PE) หรือ polypropylene (PP) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อโดยรังสีแกมมา ระบบการเลี้ยงเซลล์อยู่ใน 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีนี้สามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ของผู้ป่วยเพื่อนำไปใช้รักษาตัวเองผู้ป่วย (Autologous tissue) ได้ [Oostr และ Jaap 2003]

: United States 6943008

: ปี 2005

เจ้าของผลงาน : Teng Ma

ทำการเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูก โดยตัวโครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุน ซึ่งบรรจุเส้นใย polyethylene terephthalate นำไปเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งมีช่องผ่านอาหาร ช่องบน กลาง และล่าง ช่องขาเข้าตรงข้ามกับขาออก โครงเลี้ยงเซลล์ชั้นแรกอยู่ระหว่าง ช่องบนและช่องกลาง และโครงเลี้ยงเซลล์อีกชั้นอยู่ระหว่างช่องกลางและช่องล่าง โดยมีการหมุนวนของอาหารตลอดเวลา พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี เนื่องจากการแพร่ผ่านของอาหารได้ตลอดโครงเลี้ยงเซลล์ [Teng Ma 2005]

— การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไฮดรอกซีอะพาไทต์

: United States Patent 5487933

: ปี 1996

เจ้าของผลงาน : Eugene W.W.

เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติเพื่อนำมาใช้ปลูกทดแทนกระดูกที่เสียหาย โดยเตรียมเป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์, ไฮดรอกซีอะพาไทต์ผสมคอลลาเจน และไฮดรอกซีอะพาไทต์ผสมเจลาติน ได้ความพรุน 20-80% และขนาดของรูพรุน 25-2500 μm ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของการผสม และการเอาไปใช้ทดแทนกระดูกในบริเวณที่ต้องการนำไปใช้ [Eugene W.W. 1996]

— การใช้ MSC เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้เกิดเซลล์กระดูก

: United States Patent 6214369

: ปี 2001

เจ้าของผลงาน : Lucas P.A. และ Grande D.A.

เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติเลี้ยงเซลล์ MSC เพื่อซ่อมแซมกระดูกอ่อน (cartilage) หรือกระดูก (bone) โดยการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี MSC ลงในกระดูกหรือกระดูกอ่อนที่เสียหาย พบว่า MSC สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกอ่อนและกระดูกได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมควรมีลักษณะเป็นตาข่าย (mesh), ฟองน้ำ (sponge) งานวิจัยนี้ใช้โครงเลี้ยงเซลล์จาก polyglycolic acid ลักษณะเป็นตาข่าย โดยแยก MSC จากกล้ามเนื้อของกระต่าย จากนั้นเลี้ยง MSC ในโครงเลี้ยงเซลล์ polyglycolic acid และฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี MSC ที่กระดูกบริเวณหัวเข่าใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี MSC เป็นกลุ่มควบคุม ที่เวลา 6 สัปดาห์หลังการปลูกถ่ายกลุ่มควบคุมเกิด fibrocartilage ในขณะที่กลุ่มทดลองมีเซลล์ซึ่งยังไม่มี

การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ที่เวลา 12 สัปดาห์ กลุ่มควบคุมไม่มีการเกิด fibrocartilage เพิ่มขึ้น มีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เพิ่มมากขึ้นแต่ไม่พบการสร้างกระดูก ในขณะที่กลุ่มทดลองเกิดขึ้นของกระดูกอ่อนความหนาเท่ากับข้อต่อกระดูกอ่อนพบการสร้างกระดูกขึ้นใหม่ แสดงให้เห็นว่าการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ MSC สามารถช่วยซ่อมแซมกระดูกและกระดูกอ่อนที่เสียหายได้ [Lucas P.A. และ Grande D.A. 2001]

: United States Patent 20080033548

: ปี 2008

เจ้าของผลงาน : Xuenong Zou, Li Haisheng และ Bunge Cody

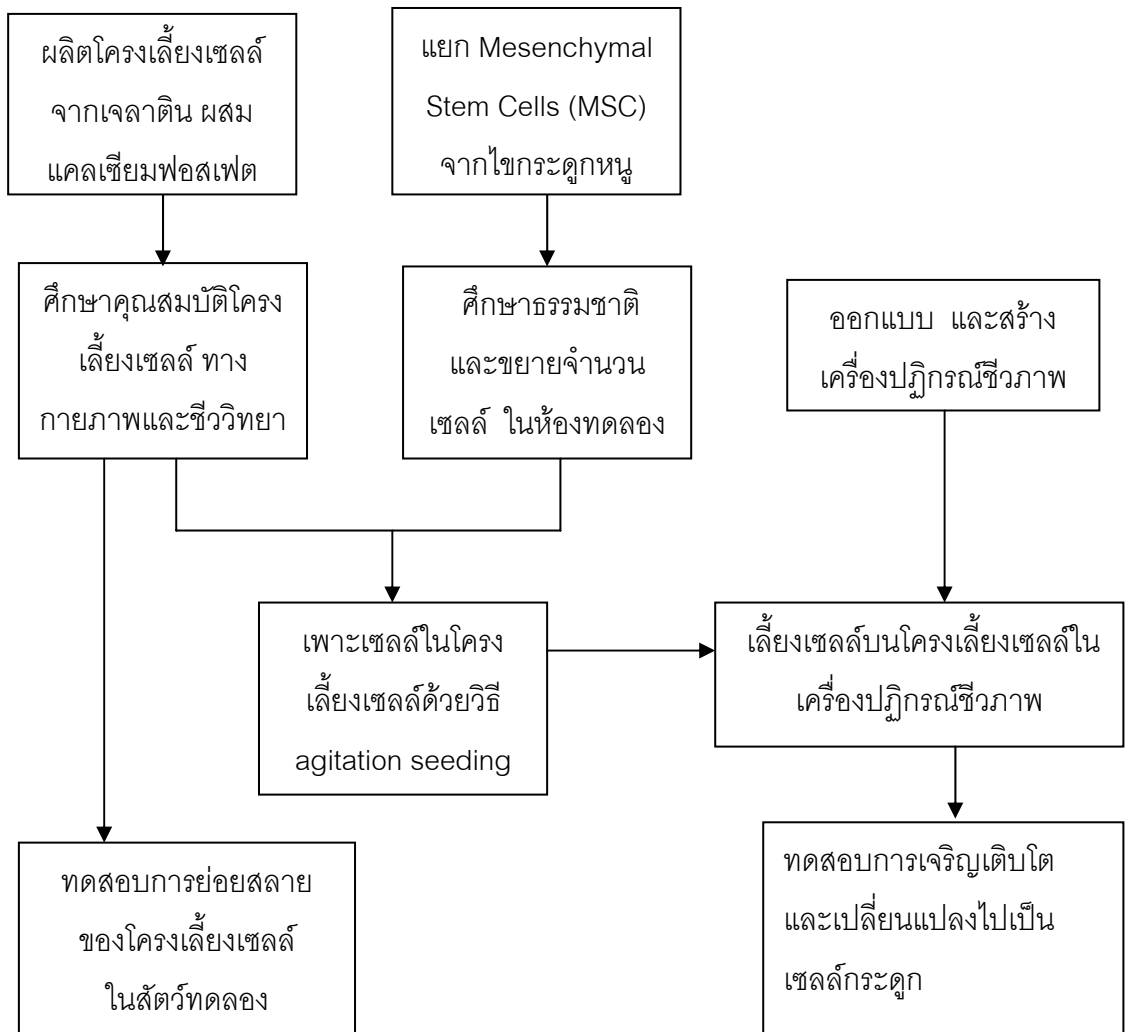
เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีขนาดของรูพรุน 400-500 ไมโครเมตร และความพรุน 50-90% นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดเท่ากับช่วงการหักของกระดูกผู้ป่วยมาเพาะเซลล์ MSC และสารอื่นๆ ได้แก่ proteins, peptides, transcript factors, osteogenic genes, cytokines, therapeutic agents และ growth factors และนำไปเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal calf serum, ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน การนำไปฝังในผู้ป่วย และมีการใช้ hyaluronan และ dexamethasone เพื่อเชื่อมต่อกกระดูก โดยใช้เวลาในการรักษา 12 สัปดาห์ [Xuenong Zou และคณะ 2008]

รายงานการวิจัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกแสดงให้เห็นโดยสรุปว่า การเลี้ยง MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากจากวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติภายในระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน [Hutmacher, D.W. 2000] ขนาดของรูพรุน 100 ไมโครเมตรขึ้นไป ความทนแรงกดประมาณ 500-1000 kPa โดยมีสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 [Paul, K.C. และคณะ 2008] ในสภาวะที่มีการให้อาหารผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลของอาหาร 1-3 มิลลิลิตรต่ออนาที [Hosseinkhani, H., และคณะ 2006] จะทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี และช่วยเหนี่ยวนำให้ MSC เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

สรุปแผนการดำเนินงานวิจัย ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.2 สารเคมี

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (USB corporation, Cleveland, OH, USA)
2. Alpha-modified eagle medium (α -MEM) (Hyclone, MA, USA)
3. L-Ascorbic (Sigma Co., St. Louis, USA)
4. Bisbenzimidazole H33258 Fluorochrome Trihydrochloride
5. Calcium carbonate standard (Sigma Co., St. Louis, USA)
6. O-cresolphthalein complex substrate (Sigma Co., St. Louis, USA)
7. Dexamethasone (Sigma Co., St. Louis, USA)
8. Diethylether (K36335621 631, AnalaR, VWR International Ltd., England)
9. Dimethylsulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, Germany)
10. Ethanol, absolute (Normapur, Fontenay Sous Bols)
11. Ethanolamine (Sigma Co., St. Louis, USA)
12. Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone MA, USA)
13. Gelatin type B (pI 5, Niita gelatin, Japan)
14. Glutaraldehyde solution (Fluka, Buchs, Germany)
15. β -glycerophosphate (Fluka, store at 4°C)
16. Hemocytometer (Counting chamber, Boeco, Germany)
17. Hexamethyldisilazane (HMDS) (Fluka, Buchs, Germany)
18. Hydroxyapatite (Fluka, Buchs, Germany)
19. p-Nitrophenol standard solution (Sigma Co., St. Louis, USA)
20. p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (Sigma Co., St. Louis, USA)
21. Penicillin-Streptomycin solution (10,000 units/ml) (Hyclone MA, USA)
22. Phosphate buffer saline without Ca^{2+} and Mg^{2+} (1X PBS(-)) (Hyclone, MA, USA)
23. Trypan blue solution (0.4%) (Sigma Co., St. Louis, USA)
24. Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin in EDTA.4Na) (Hyclone, MA, USA)
25. Sigma Cote (Sigma Co., St. Louis, USA)
26. Sodium chloride (Fluka, Buchs, Germany)
27. Tri-sodium citrate (Sigma Co., St. Louis, USA)
28. Sodium hydroxide (Fluka, Buchs, Germany)

3.3 วัสดุและอุปกรณ์

1. 1.5 ml sterilized vials (Corning USA)
2. 10 cm. polystyrene tissue culture discs (NUNC, Denmark)
3. 6 well polystyrene tissue culture plates (NUNC, Denmark)
4. 48 well polystyrene tissue culture plates (NUNC, Denmark)
5. 96-well black plate (Corning USA)
6. CO₂ incubator (Series II 3110 Water Jacketed Incubator, Thermo Forma, USA)
7. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) (JSM-5800LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
8. Ethylene oxide (Steri-Vac™ gas sterilizer, 3M , USA)
9. -80°C freezer (Heto, PowerDry LL3000, USA)
10. Fine coat (JFC-1100E, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
11. Fluorescent microplate reader (F-2000, HITACHI, Japan)
12. Homogenizer (EW-04739-01, IKA, USA)
13. Laminar Flow (HWS Series 254473, Australia)
14. Lyophilizer (Heto, PowerDry LL3000, USA)
15. Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
16. Orbital shaker (Innova 2000, New Brunswick, USA)
17. Paraffin film
18. Peristaltic Pump (MCP V5.21 15M 726B-0773, Watson-Marlow, USA)
19. Phase-contrast microscope (IX70, Olympus Optical Co., Japan)
20. Scanning Electron Microscopy (JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
21. Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)
22. Sterilized filter system (0.2 µm) (Corning, USA)
23. Sterilized pipette (Costar, USA)
24. Universal Testing Machine (No. 5567, Instron, USA)
25. UV-Vis spectrophotometer (UV-2540, Shimadzu, Japan)
26. Vacuum drying oven and pump (VD23, Binder, Germany)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจากเจลาตินผสมผงไฮดรอกซีอะพาไทต์

สารละลายเจลาตินชนิด B (pl เท่ากับ 5) 5% โดยน้ำหนัก และผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง และผ่านการร่อนได้ขนาดของอนุภาค 100-212 ไมโครเมตร นำมาผสมกันที่อัตราส่วน 30:70 โดยน้ำหนัก เติมนิวตารอลดีไฮด์ 0.01%v/v นำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติมนิวตารอลลงไปปั่นต่ออีก 15 วินาที เทสารผสมลงในภาตสแตนเลสขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร สูง 1 เซนติเมตร ที่แช่เย็นไว้แล้ว ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทำแห้งแข็ง (Lyophilization) ที่ความดัน 0.1 Torr เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเชื่อมขวางอีกครั้งด้วยการใช้ความร้อนที่ 140 องศาเซลเซียส ในสภาวะสูญญากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร สูง 2 มิลลิเมตร โดยตัดบริเวณด้านบนและด้านล่างออก แล้วนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซ Ethylene oxide อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 40 ความดัน 46 Torr เวลา 8 ชั่วโมงก่อนการทดสอบ ลักษณะสมบัติต่อไป โดยใช้สถานที่ที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 ศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

- 1) รูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron microscope, SEM) การหาขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kang H.W. โดยวัดขนาดของรูพรุนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแบบสุ่ม 100 รู ในแนวราบ (horizontal) และแนวตัดขวาง (cross-section) จากนั้นนำขนาดของรูพรุนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย [Kang H.W. และคณะ 1999]
- 2) การหาความพรุน (porosity) ของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยการแทนที่เอทานอลในช่องว่างของโครงเลี้ยงเซลล์ [Jiankang และคณะ 2007] โดยคำนวณหาความพรุนจาก

$$\text{ความพรุน (\% โดยน้ำหนัก)} = (W_w - W_d) / (W_w - W_i) \times 100 \quad \dots(1)$$
 เมื่อ W_w = น้ำหนักเปียก
 W_d = น้ำหนักแห้ง
 W_i = น้ำหนักเปียกหลังซึบเอทานอลออก
- 3) การดูดซับน้ำ โดยชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถคำนวณได้ดังนี้

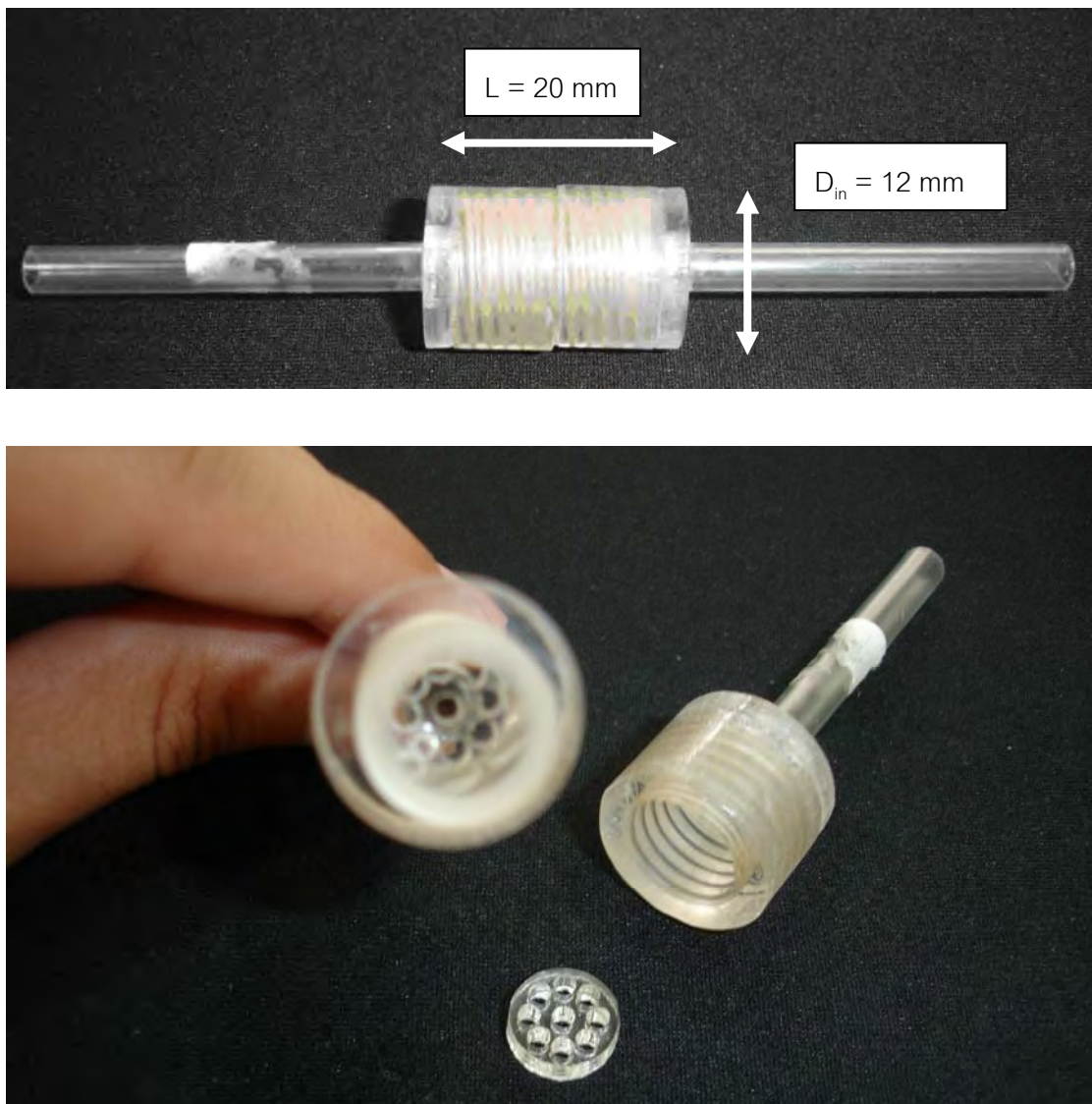
$$\text{การดูดซับน้ำ (\% โดยน้ำหนัก)} = (W_w - W_d) / W_w \times 100 \quad \dots(2)$$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } W_w &= \text{น้ำหนักเปียก} \\ W_d &= \text{น้ำหนักแห้ง} \end{aligned}$$

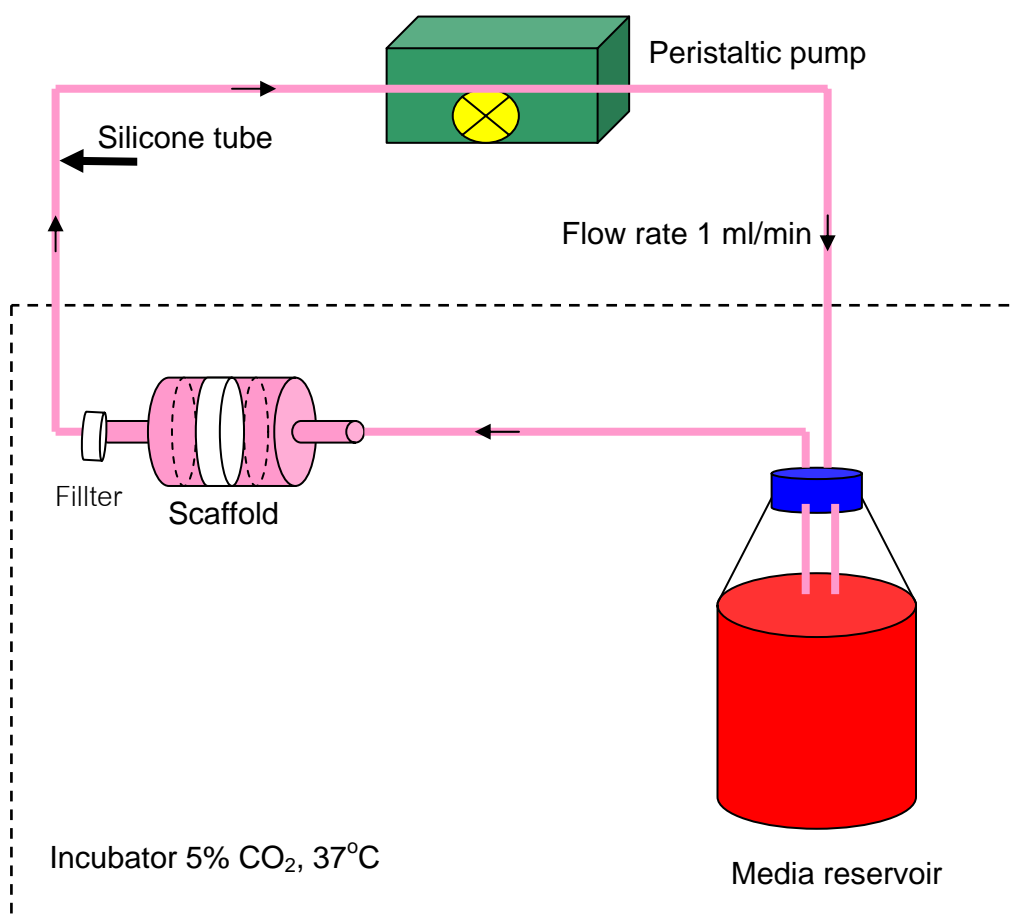
- 4) สมบัติเชิงกล ความทนแรงกด (compressive modulus) โดยใช้เครื่อง Universal Testing Machine ตามมาตรฐาน ASTM D-638 โดยใช้อัตราการกด 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที เพื่อคำนวณหาค่า young modulus โดยหาได้จากค่าความชันระหว่างกราฟของความเค้น (compression stress) และความเครียด (compression strain) ที่ initial stress-strain ในช่วง 5-30% แรกของแรงกด แบบแห้งสามารถใช้โครงเลี้ยงเซลล์ทำการทดสอบได้เลย ส่วนในแบบเปียกนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในสารละลาย PBS ก่อน 3 ชั่วโมง และซับน้ำส่วนเกินออก แล้วจึงนำไปทดสอบ (ดูรายละเอียดการคำนวณในภาคผนวก ก)
- 5) ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ โดยเพาะเซลล์ 1×10^6 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 69.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ประเมินการยึดเกาะของเซลล์ (Attachment) ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) ที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วันในสภาวะสถิตย์ (Static culture) โดยมีการวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA (ดูหัวข้อ 3.4.10)

3.4.3 การออกแบบและสร้างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านทำจากอะคริลิกมีลักษณะดังรูปที่ 3.2 ตัวใส่โครงเลี้ยงเซลล์ (Chamber) ทำจากอะคริลิกและใช้สายยางซิลิโคนเป็นสายสำหรับลำเลียงอาหาร การทดลองทำโดยให้มีการหมุนวนของอาหารจากถังเก็บเข้าสู่ตัวโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพาะ MSC ดังรูปที่ 3.3 โดยมีอัตราการหมุนวนคงที่ 1-3 มิลลิลิตรต่อนาที [Hosseinkhani H. และคณะ 2006] อุปกรณ์ทั้งหมดฆ่าเชื้อโดยก๊าซ Ethylene oxide อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง การทดสอบควบคุมอัตราการไหล ทำโดยเปลี่ยนความเร็วรอบของปั๊ม และวัดอัตราการไหลที่ผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งอยู่ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ



รูปที่ 3.2 ส่วนประกอบและขนาดของตัวใส่โครงเลี้ยงเซลล์ (Chamber) ทำจากอะคริลิก และ อุปกรณ์ภายใน



รูปที่ 3.3 ภาพจำลองของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ทำการทดลอง ที่สภาวะ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.4 การเตรียม Mesenchymal Stem Cells (MSC)

MSC ถูกสกัดจากกระดูกต้นขาหลังของ Wistar rat (เพศเมีย, อายุ 3 สัปดาห์) ซึ่งจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ตามวิธีของ Ratanavaraporn J. และคณะ 2009 โดยผ่าเอากระดูกต้นขาหลังของหนูตั้งแต่บริเวณสะโพก เลาะเศษเนื้อเยื่ออื่นออกให้สะอาด ตัดที่ปลายทั้งสองข้างของกระดูกจะพบช่องไขกระดูก ใช้เข็ม (26-gauge needle) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (Alpha-modified eagle medium: α -MEM ที่มี 15% FCS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) ทะลวงผ่านช่องไขกระดูกลงหลอดขนาดหนึ่งมิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งก้อนไขกระดูกหลุดออกหมด ทำสารแขวนลอยเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เข็มฉีดพ่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นดูดใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 มิลลิลิตรไว้เรียบร้อยแล้ว ทำการเพาะเซลล์ในสภาวะ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 4 หลังจากการเพาะเซลล์ เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่เกาะจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยน

อาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ในวันที่ 7-10 หลังจากการเพาะเซลล์ สามารถทำการแบ่งเซลล์ (subculture) ได้ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 mM (pH7.4) ที่มี 0.25 wt% trypsin และ 0.02 wt% EDTA อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที สำหรับการทดลองใช้เซลล์ใน passage ที่สอง [Tabata, Y. และคณะ 2004] การทดลองด้านเซลล์ทั้งหมดทำ ณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ชั้น 9 ตึก อ.ป.ร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.5 การศึกษาธรรมชาติเซลล์บนจานเพาะเลี้ยง

1.) การขยายจำนวนเซลล์ เมื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงชนิด Polystyrene ให้มีความหนาแน่นประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (4 วัน) ทำการแบ่งเซลล์โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 mM (pH7.4) ที่มี 0.25 wt% trypsin และ 0.02 wt% EDTA อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เซลล์จะหลุดออกจากจานเพาะเลี้ยงหลังจากนั้นแบ่งเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงใหม่ที่มีอาหาร α -MEM ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร, 15% FCS และ 50 U/ml penicillin streptomycin

2.) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) เปรียบเทียบเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงโดยอาหารปกติประกอบด้วย α -MEM, 10% FCS และ 50 U/ml penicillin streptomycin กับที่เลี้ยงด้วยอาหาร Osteogenic medium ที่ประกอบด้วย α -MEM, 10% FCS และ 50 U/ml penicillin streptomycin 0.5 ug/ml L-ascobic 2-phosphate, 10^{-8} M dexamethasone โดยศึกษารูปร่างของเซลล์ว่าเรียวยาวคล้ายกระดูก หรือมีรูปร่างกลม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon, TS100 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) ตามวิธีในหัวข้อ 3.4.11

3.4.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์

เตรียมสารละลายเซลล์ 5×10^5 เซลล์/200 ไมโครลิตร (สำหรับทดสอบการเจริญเติบโต) และ 1×10^6 เซลล์/200 ไมโครลิตร (สำหรับทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก) หยดลงโครงเลี้ยงเซลล์ที่ฆ่าเชื้อด้วยก๊าซ Ethylene oxide แล้วนำไปเขย่าด้วย Shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง

3.4.7 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์

หลังจากเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงใน อาหารประกอบด้วย α -MEM, 15% FCS และ 50 U/ml penicillin streptomycin ใน 6 well-plate ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน ตรวจสอบการยึดเกาะของ

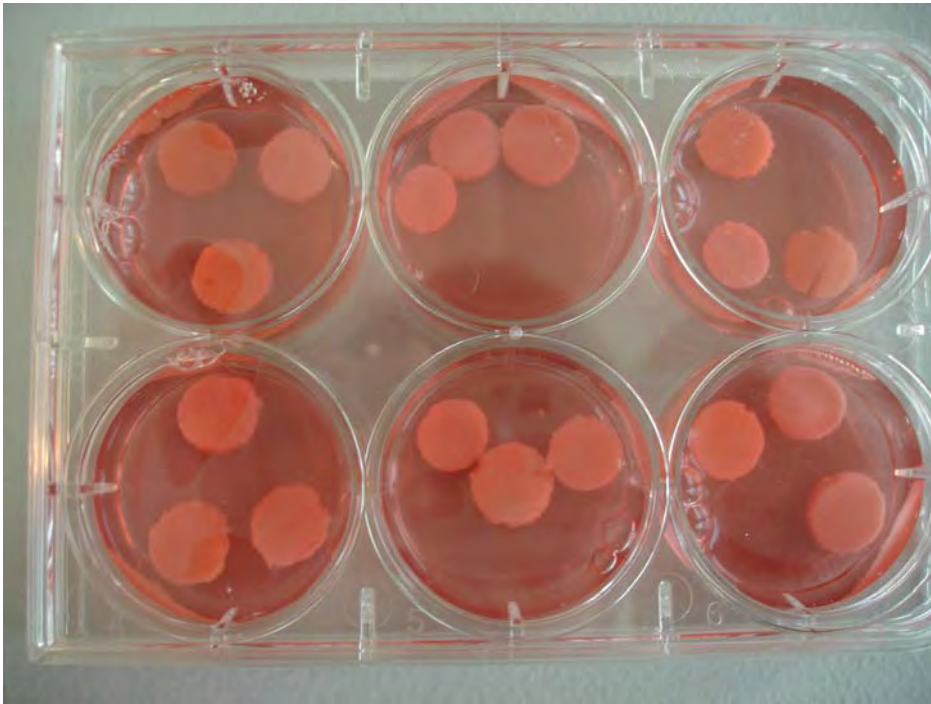
เซลล์ (Attachment) ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) ที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ด้วยวิธี DNA assay (หัวข้อ 3.4.10)

3.4.8 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์

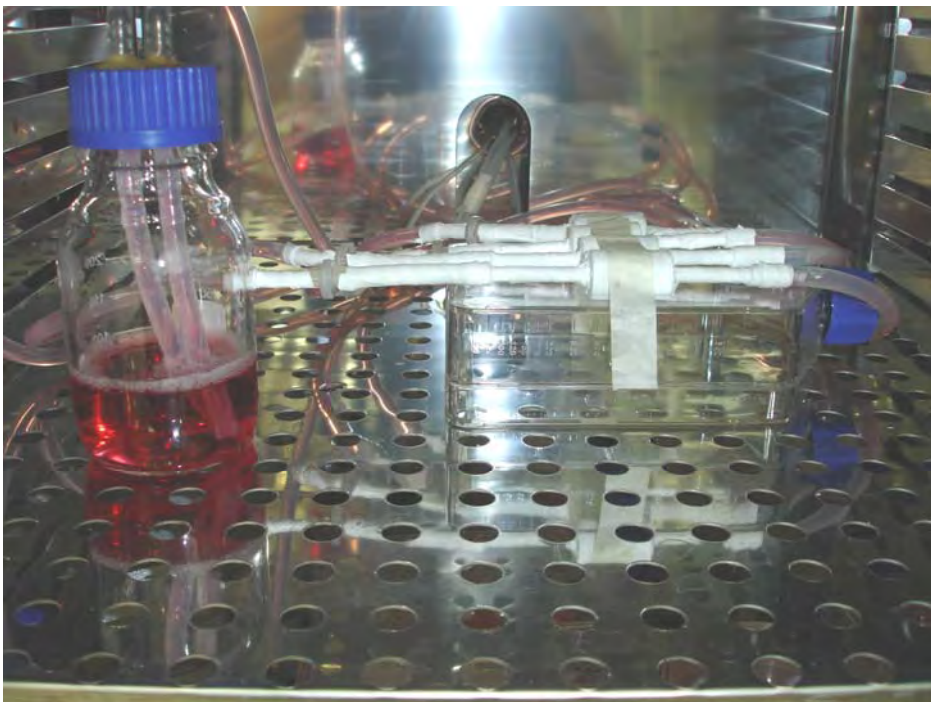
หลังจากเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้แบ่งเซลล์เป็น 2 กลุ่ม การทดลอง คือ 1) กลุ่มที่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น Osteogenic Medium, OM (ซึ่งประกอบด้วย α -MEM, 10% FBS, 50 U/ml pen/strep, 50 μ g/ml, L-ascorbic, 10^{-6} M dexamethasone และ 1 M \square -glycerophosphate) และ 2) กลุ่มควบคุมที่ยังคงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิม (Normal media, NM) ใน 6 well-plate ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีการประเมินสัญญาณการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกทุกๆ 1 สัปดาห์ โดยการวัด ALP activity และ Calcium content (หัวข้อ 3.4.11)

3.4.9 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

เลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะสถิตย์ (Static Culture) เลี้ยงใน 6 well-plate ดังรูปที่ 3.4 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพดังรูป 3.5 โดยมีการหมุนวนของอาหารจากถังเก็บเข้าสู่ตัวโครงเลี้ยงเซลล์แบบไหลผ่าน (perfusion) โดยมีอัตราการหมุนวนคงที่ เปรียบเทียบกับเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์แบบสถิตย์ที่เลี้ยงใน 6 well-plate ในอาหารปกติ และอาหาร Osteogenic medium ที่ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน



รูปที่ 3.4 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสถิตย์ (Static Culture) เลี้ยงใน 6 well-plate ที่สภาวะ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.5 การเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่สภาวะ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.10 การวัดปริมาณเซลล์

DNA assay เป็นวิธีประมาณการเปลี่ยนแปลงของประชากรเซลล์ด้วยการใส่สารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติจับจำเพาะกับ DNA เช่น Bisbenzidine (Hoechst) มีมวลโมเลกุลขนาด 533.88 และยอมบริเวณเบส A-T ให้เรืองแสงได้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่มีการกระตุ้นด้วยความถี่ 340-380 nm และปลดปล่อยพลังงานแสงที่ 430-450 nm ซึ่งสามารถใช้ในการสร้างกราฟการเจริญของเซลล์ เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับปัจจัยเร่งการเจริญได้ [Takahashi Y. และคณะ 2005]

โดยสามารถคำนวณเวลาการแบ่งตัวที่คูณ (population doubling time, PDT) [Freshney และคณะ 1994] ได้จาก

$$\text{เวลาแบ่งตัวที่คูณ PDT} = 1/r \text{ (ชั่วโมง)} \quad \dots(3)$$

$$\text{โดย } r = \text{จำนวนชั้นอายุต่อหนึ่งหน่วยเวลา} \quad \dots(4)$$

$$= 3.32 (\log N_H - \log N_1) / (t_2 - t_1) \text{ (รุ่นต่อชั่วโมง)} \quad \dots(5)$$

เมื่อ N_1 เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้น ที่เวลา t_1

N_H คือจำนวนเซลล์ทั้งหมด ที่เวลา t_2

หากเวลาการแบ่งตัวที่คูณน้อยแสดงว่าเซลล์เจริญเติบโตได้ดี

3.4.11 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

- กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase, ALP เป็นวิธีการวัดปริมาณของเอนไซม์ ALP ซึ่งจะสร้างขึ้นในเซลล์กระดูก ทำโดยการให้ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้ผนังเซลล์แตก ของเหลวที่อยู่ภายในถูกปล่อยออกมา ได้เป็น cell lysate โดยเอนไซม์จะอยู่ใน cell lysate นั้นด้วย เอนไซม์ ALP จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น p-Nitrophenyl phosphatase โดยบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยากับ 3N NaOH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405nm [Takahashi Y. และคณะ 2005] วิธีโดยละเอียดแสดงในภาคผนวก จ

- ปริมาณแคลเซียม โดยวิธีเติม 1M HCl ลงใน cell lysate แล้วนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้ว โดย HCl จะช่วยช่วยแคลเซียมให้ออกมา หลังจากนั้น เติมสารละลาย ethanolamine buffer และ O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) แคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สารสีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร [Takahashi Y. และคณะ 2005] วิธีโดยละเอียดแสดงในภาคผนวก ข

การดูรูปร่างของเซลล์และวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบของธาตุที่เซลล์หลั่งออกมาบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron microscope, SEM) และ energy dispersive X-ray (EDS) เพื่อดูปริมาณแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca:P) ที่เซลล์สร้างขึ้นมา หากเป็นกระดูกมนุษย์ค่าจะอยู่ประมาณ 1.15-1.71 [Hwang Y.S. และคณะ 2009] ปกติการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในหลอดทดลอง (*in vitro*) บนจานเพาะเลี้ยง ใน Osteogenic medium จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALP สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 และแคลเซียมจะสูงในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง [Porter R. 2004]

3.4.12 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต

โดยทำการศึกษาในหนู Rat สายพันธุ์ Wistar (outbred) เพศเมีย น้ำหนักประมาณ 150-200 กรัม อายุ 8 สัปดาห์ สั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ซึ่งพิจารณาการใช้สัตว์ทดลองโดยเน้นในเรื่อง ความต่อต้านทางภูมิคุ้มกัน (Immunological response) และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้ามาที่ผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์ (Cell infiltration) และความสามารถในการย่อยสลาย (Biodegradability) ของโครงเลี้ยงเซลล์ วิธีการทดลองใช้หนูในการปลูกถ่ายจำนวน 3 ตัว ($n = 3$) และปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเจลาตินและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร ความหนา 2 มิลลิเมตร ฝังลงในหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วผ่านำชิ้นงานออกมาตรวจสอบ สรุปลงได้ดังแผนผังในรูปที่ 3.5

การตรวจสอบเนื้อเยื่อทาง Histology เทคนิคการย้อมสี (staining) ขั้นตอนการย้อมสีประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ นำชิ้นงานที่ได้ไปเคลือบด้วยพาราฟิน หลังจากนั้นตัดชิ้นงานให้เป็นแผ่นบาง แล้วนำไปวางบนแผ่นสไลด์ จากนั้นล้าง wax medium ด้วยไซลีน (Xylene) ที่เคลือบเซลล์และส่วนอื่นของเนื้อเยื่อไว้ไม่ให้ติดสีที่ใช้ย้อม จากนั้นล้างไซลีนออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์และนำเนื้อเยื่อลงสู่น้ำเพื่อการย้อมสี

- H&E staining โดยใช้ฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) ทำหน้าที่เป็นสีย้อมสำหรับเนื้อเยื่อที่มีประจุลบ อีโอซิน (eosin) เป็นสีย้อมสำหรับเนื้อเยื่อที่มีประจุบวก ใช้เป็นสีย้อมทับเพื่อให้เห็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น คอลลาเจนจะติดสีชมพูของอีโอซิน ส่วนนิวเคลียสจะติดสีม่วงของ ฮีมาทอกซิลิน [Hwang Y.S. และคณะ 2009]

- Von Kossa staining โดยนำตัวอย่างมาจุ่มในสารละลาย 5% silver nitrate ที่มีแสงจากหลอดไฟ 60 วัตต์ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วตรึงด้วยสารละลาย 5% sodium thiosulphate 5 นาที โดยแคลเซียมจะย้อมติดสีดำของ Von Kossa [Hwang Y.S. และคณะ

2009] จากนั้นทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจากน้ำที่เกิดจากสีที่ใช้ย้อม จากนั้นทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์สีขึ้น โดยใช้ไซลีนเป็นตัวดึงแอลกอฮอล์ที่ตกค้างอยู่ที่ชิ้นเนื้อเยื่อออกให้หมด นำเอาแผ่นกระจกบางๆ ปิดทับลงบนชิ้นเนื้อเยื่อสไลด์โดยใช้ mounting medium ช่วยยึดแผ่นให้ติดกับสไลด์ ช่วยให้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เห็นภาพได้ชัดเจนและเป็นวิธีการเก็บรักษาสไลด์เนื้อเยื่อได้นาน [Moorehead W.R. 1974] ทำโดยคุณปรีชา เรืองเวชวรชัย ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

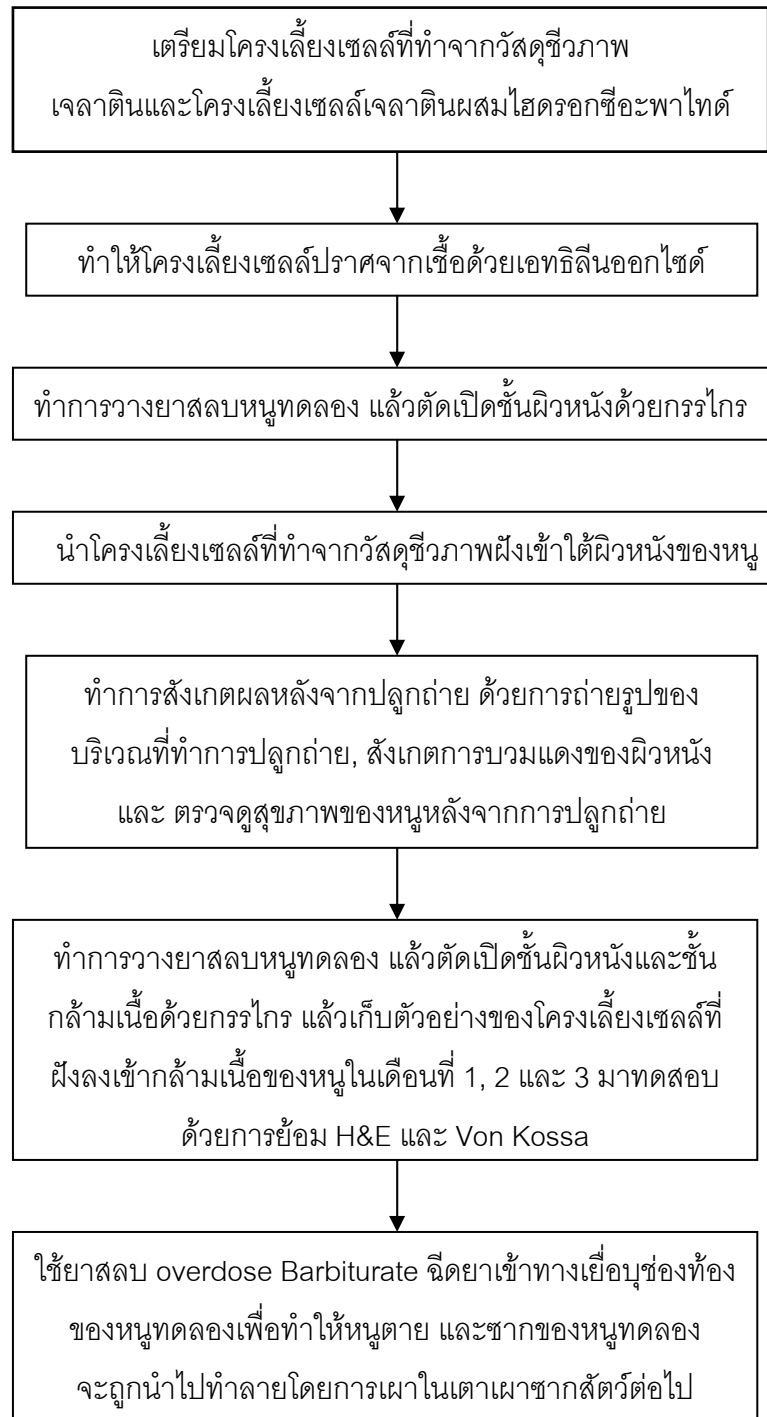
3.3.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย และ ค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบที (t-test) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P\text{-value} < 0.05$)

3.3.14 ปัญหาทางจริยธรรม

การทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง ทำตามมาตรฐานการดูแลและใช้สัตว์ทดลองแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพสามารถสรุปได้ดังนี้



รูปที่ 3.6 แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษานี้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินชนิด B และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (30:70) ที่ขึ้นรูปโดยการให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization) ร่วมกับกระบวนการทำแห้งแข็ง (freeze-dried) และเชื่อมขวาง (crosslink) โดยใช้วิธีทางความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT) โดยมีการเปรียบเทียบลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ในด้านกายภาพ เคมี และชีววิทยา เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue engineering)

4.1 ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

4.1.1 ลักษณะทางกายภาพ

ลักษณะทั่วไปของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินชนิด B (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินชนิด B ผสม ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่อัตราส่วน 30/70 (Gel/HA) แสดงดังรูปที่ 4.1 โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินยวบตัวได้ง่าย สนิ่มนวลและมีความยืดหยุ่นมากกว่า แต่เมื่อมีการผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ลงไปแล้วโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ มีความแข็งแรงมากขึ้นสามารถจับได้ง่ายขึ้น



Gel

Gel/HA

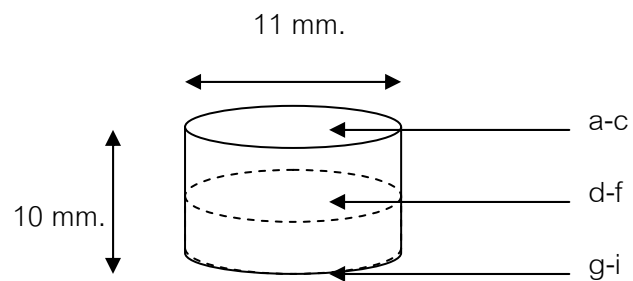
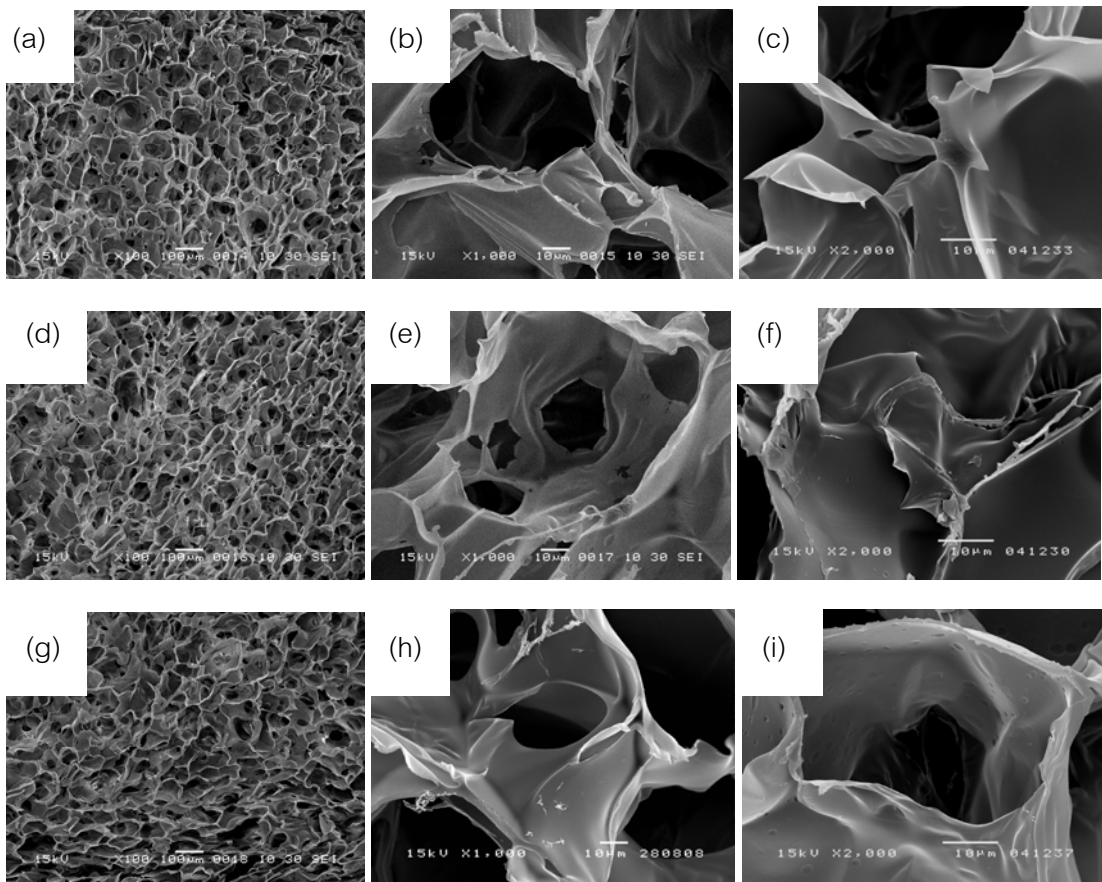
รูปที่ 4.1 รูปถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินชนิด B (Gel) และเจลาติน Type B ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่อัตราส่วน 30/70 (Gel/HA)

ผลการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างรูพรุนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ของ Gel และ Gel/HA ลักษณะโครงสร้างภายในของ Gel ที่ความเข้มข้น 5 % โดยน้ำหนัก มีรูพรุนที่เชื่อมโยงกัน ผนังของโครงเลี้ยงเซลล์มีความพรุนมาก ผิวของโครงเลี้ยงเซลล์เรียบ ดังรูปที่ 4.2 โดยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีความพรุน

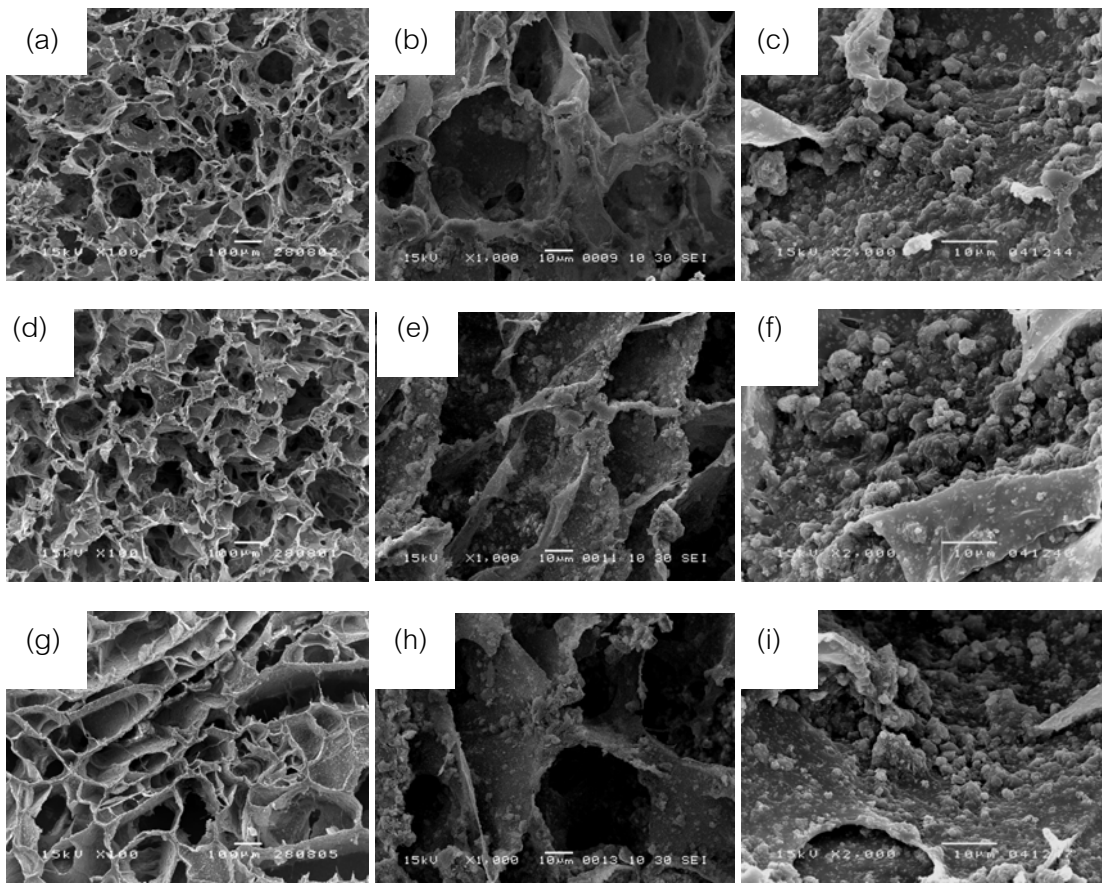
สม่ำเสมอ ขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 121 ± 39 ไมโครเมตร ส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ Gel โดยมีขนาดเฉลี่ยที่ 148 ± 83 ไมโครเมตร ผิวของโครงเลี้ยงเซลล์มีความขรุขระ เนื่องจากผลึกของผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์กระจายตัวบนผิวของเจลาตินทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4.3) โดยผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์มีขนาดอยู่ที่ 1-5 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.4) ซึ่งขนาดของรูพรุนอย่างน้อยควรมีขนาด 100 ไมโครเมตร ซึ่งเกี่ยวข้องกับ ขนาด, การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการขนส่งอาหาร ออกซิเจนและของเสีย [Hutmacher DW. และคณะ 2000] และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีค่าเท่ากับ 0.07 ± 0.01 และ 0.40 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่สูงขึ้นเกิดจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เติมเข้าไป

ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีค่าเท่ากับร้อยละ 65.4 ± 4.6 และ 50.9 ± 5.9 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และ Gel/HA พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel มีความพรุนมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA โดยไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เติมเข้าไปส่งผลต่อลักษณะผนังของโครงเลี้ยงเซลล์ คือ ความพรุนโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง แต่ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เติมเข้าไปไม่ได้ทำให้ขนาดของรูพรุนเล็กลง จึงไม่ส่งผลต่อรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ Gel ซึ่งหากโครงเลี้ยงเซลล์มีความพรุนมากจะทำให้เกิดช่องเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุนได้มาก เพื่อเป็นช่องให้เซลล์ และอาหารเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปได้ ซึ่งจะช่วยให้เซลล์เจริญได้ดี แต่ความพรุนต้องไม่กระทบกับคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ความทนแรงกด [Oudadesse H. และคณะ 2005]

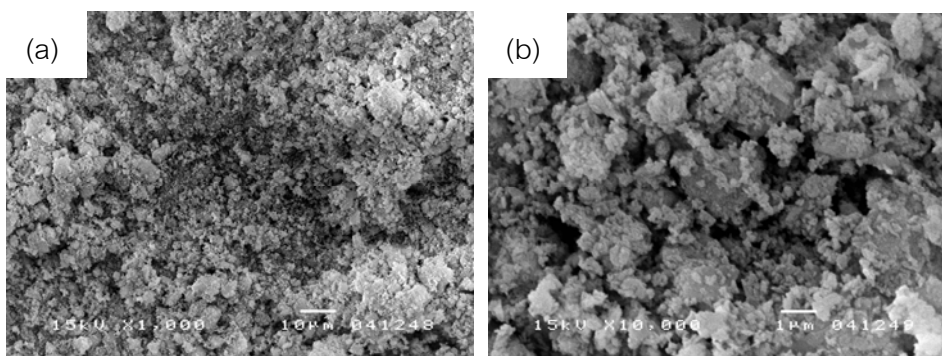
โครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ถูกนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำ (water swelling) ของโครงเลี้ยงเซลล์โดยการวัดน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์เปียกภายหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ 37°C เทียบกับน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์แห้ง พบว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีค่าเท่ากับ 20.52 ± 1.45 และ 14.35 ± 1.32 ตามลำดับ จากผลที่ได้จะเห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel มีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดีกว่า เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ Gel มีความหนาแน่นน้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA โดยโครงสร้างภายในเกิดความพรุนมากกว่า ซึ่งสามารถทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ Gel กักเก็บน้ำได้ดีกว่า ความสามารถในการดูดซับน้ำจึงสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA และหลังจากการผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า มีปริมาณผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์สะสมบนโครงเลี้ยงเซลล์มาก ส่งผลต่อความสามารถในการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ทำให้จำนวนเท่าของการดูดซับลดลง 30% [Oonishi H. และคณะ 1995]



รูปที่ 4.2 ลักษณะโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) ด้านบน (a-c) ตรงกลาง (d-f) ด้านล่าง (g-i) กำลังขยาย 100x, 1,000x และ 2,000x จากซ้ายไปขวาตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ลักษณะโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) ด้านบน (a-c) ตรงกลาง (d-f) ด้านล่าง (g-i) กำลังขยาย 100x, 1,000x และ 2,000x จากซ้ายไปขวาตามลำดับ

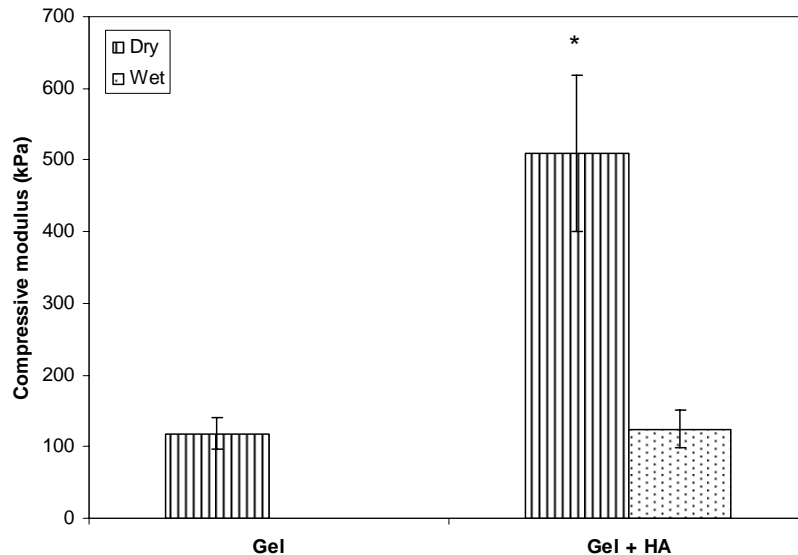


รูปที่ 4.4 ผลิตของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (บริษัท Fluka, ประเทศ Germany) ที่นำมาใช้ผสมในโครงเลี้ยง Gel/HA 1,000x (a) และ 1,0000x (b)

4.1.2 การทดสอบสมบัติทางกล

โครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ถูกนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการทนแรงกด (Compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่อง Universal testing machine ค่าความทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA โดยทดสอบแบบแห้ง มีค่าเท่ากับ 118 ± 21 และ 510 ± 109 kPa ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อมีการเติมผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีค่าความทนแรงกดเพิ่มมากกว่าแบบ Gel ถึง 5 เท่า ความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากไฮดรอกซีอะพาไทต์เข้าไปฝังและกระจายตัวอยู่ในเนื้อของเจลาติน ทำให้มีการเสริมความแข็งแรงจากโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียว [Takahashi, Y. และคณะ, 2005] (รูปที่ 4.5)

นอกจากนั้นยังมีการทดสอบความทนต่อแรงกดในสภาวะเปียก โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำมาชั่งน้ำหนักส่วนเกินออกและนำไปทดสอบความทนทานต่อแรงกด โครงเลี้ยงเซลล์ Gel ไม่สามารถวัดความทนแรงกดได้เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์มีความอ่อนนุ่มมากจนเครื่อง Universal testing machine ไม่สามารถอ่านค่าได้ ส่วน Gel/HA มีความทนทานต่อแรงกดที่ 124 ± 26 kPa ซึ่งลดลงมาประมาณ 5 เท่าจากสภาวะแห้ง



รูปที่ 4.5 ความทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) ในสภาวะแห้ง และเปียก (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับความสามารถในการทนแรงกดในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel ในสภาวะเดียวกัน)

การเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และ โครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA แสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกต่อไป จากรายงานการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินผสม β -tricalcium phosphate มีขนาดของรูพรุน 180-200 ไมโครเมตร ความพรุนร้อยละ 95 ค่าความทนแรงกด 2.6 MPa [Takahashi และคณะ 2004] นอกจากนี้ยังมีรายงานลักษณะสมบัติที่เหมาะสมของโครงเลี้ยงเซลล์ดังนี้ ขนาดรูพรุนประมาณ 200-400 ไมโครเมตรความทนต่อแรงกด (compressive modulus) 17-20 GPa [Paul .K. และคณะ 2008]

ตารางที่ 4.1 สรุปลักษณะสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA)

Properties		Gel	Gel/HA
Size (mm.)	Diameter	10 \pm 0.6	11 \pm 0.9
	Height	2 \pm 0.2	2 \pm 0.4
Density (mg./mm ³)		0.07 \pm 0.01	0.40 \pm 0.09
Pore size (μ m)		121 \pm 39	148 \pm 83
Porosity (%)		65.4 \pm 4.6	50.9 \pm 5.9
Compressive modulus (kPa)	Dry	118 \pm 21	510 \pm 109
	Wet	-	124 \pm 26
Water swelling (times)		20.52 \pm 1.5	14.35 \pm 1.32

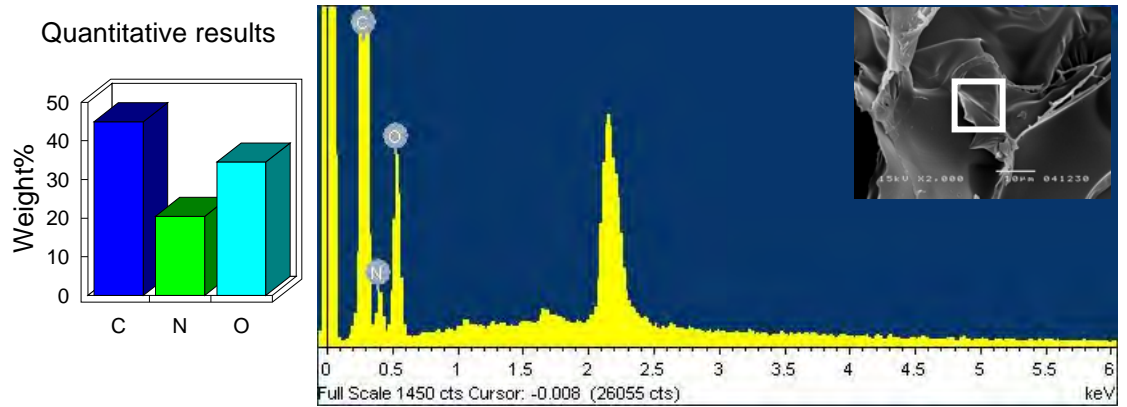
4.1.3 วัตถุประสงค์ประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการวิเคราะห์ธาตุด้วยเครื่อง energy dispersive x-ray spectrometry (EDS) ดังรูป 4.6 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน, ไนโตรเจน และออกซิเจน ส่วนในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA จะมีแคลเซียม และฟอสฟอรัสเพิ่มเข้ามา โดยอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส มีค่าเท่ากับ 1.78 ส่วนของไฮดรอกซีอะพาไทต์ประกอบด้วย ออกซิเจนแคลเซียม และฟอสฟอรัส โดยอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส มีค่าเท่ากับ 1.60 (ตารางที่ 4.2) ซึ่งอัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีค่าใกล้เคียงกับกระดูกของมนุษย์ซึ่งมีรายงานว่าอยู่ระหว่าง 1.15-1.70 [Hwang Y.S. และคณะ 2009]

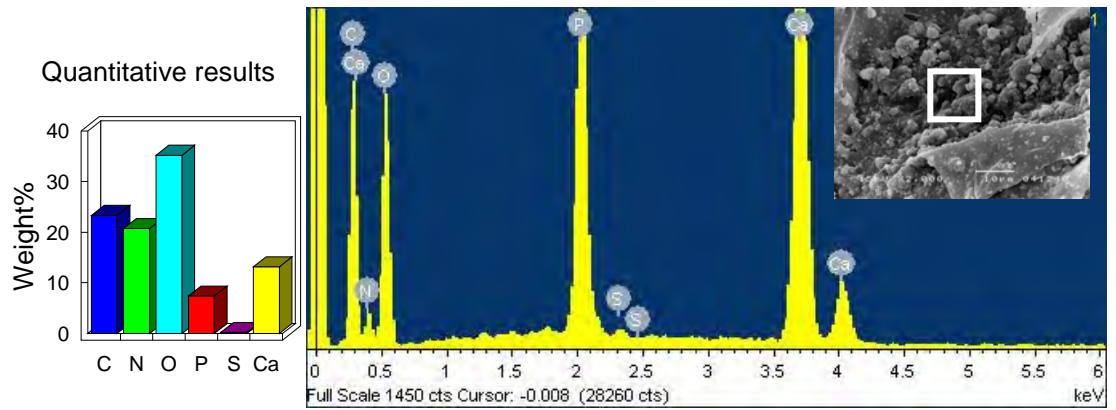
ตารางที่ 4.2 แสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของพื้นผิวภายในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน, โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ และผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์

Element	Scaffold type		
	Gel	Gel/HA	HA
C	44.95	23.31	-
N	20.50	20.73	-
O	34.55	35.21	71.61
P	-	7.39	10.92
S	-	0.18	-
Ca	-	13.17	17.47
Total	100	100	100
Ca:P	-	1.78	1.60

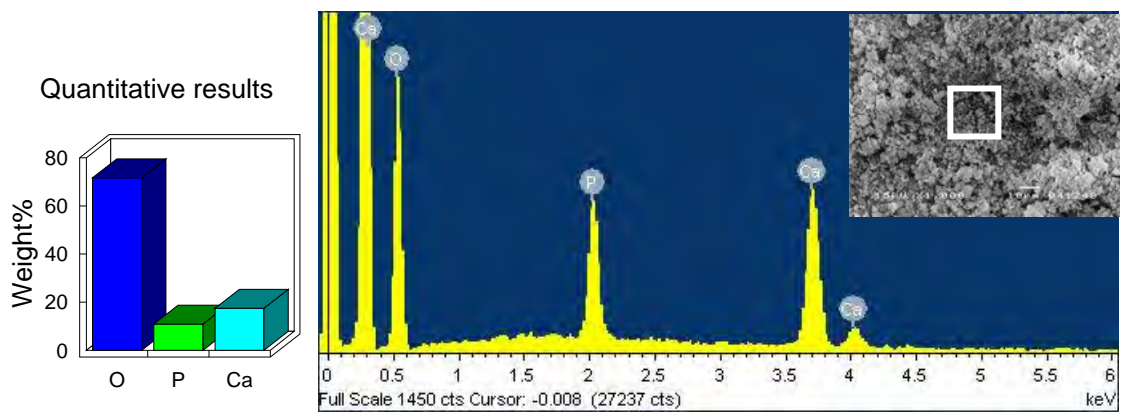
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 4.6 ขวา กราฟแท่ง และซ้าย กราฟเส้นแสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (a), โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (b) และไฮดรอกซีอะพาไทต์

(c)

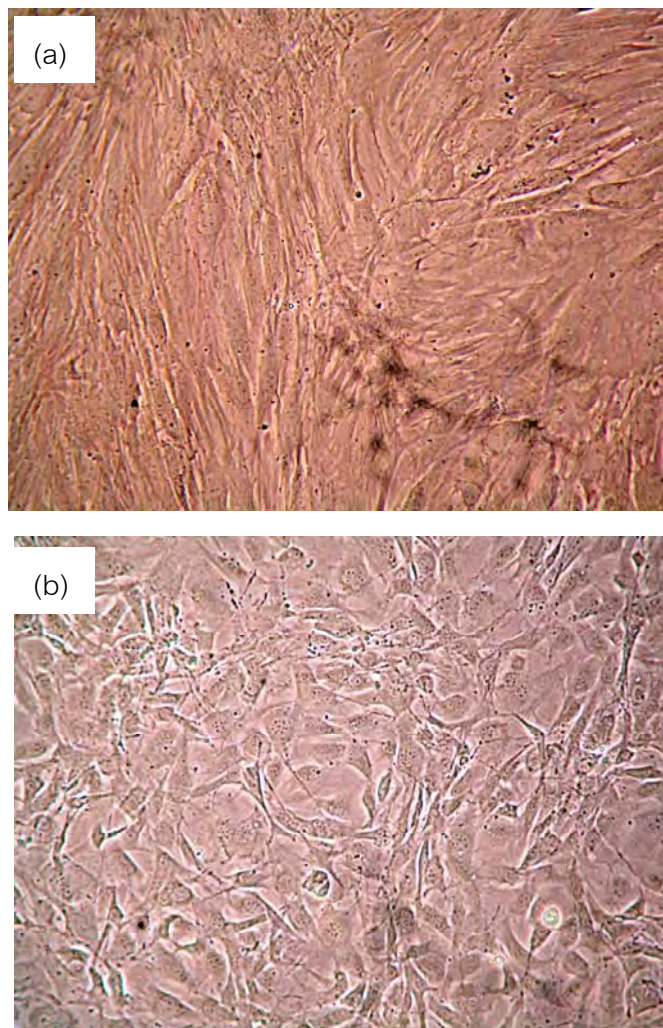
4.2 การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากไขกระดูก (Mesenchymal stem cells, MSC) ของหนูพันธุ์ Wistar และเซลล์ไลน์กระดูก (MT3C3)

4.2.1 การศึกษาธรรมชาติของการขยายจำนวนเซลล์

การศึกษารวมชาติของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากไขกระดูก (MSC) และเซลล์ไลน์กระดูก (MT3C3) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จาก calvarias ของหนู *Mus musculus* (mouse) [Isama K. และคณะ 2003] (รูปที่ 4.7) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก polystyrene มีการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ ทำเพื่อทดสอบความคงตัวและศักยภาพของเซลล์ทั้งสองชนิดในสภาวะปกติภายนอกร่างกาย (*in vitro* culture) ลักษณะรูปร่าง (Morphology) ของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน คือ MSC มีรูปร่างยาวกว่า MC3T3 เนื่องจากความแตกต่างของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่ง MSC เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ประกอบด้วยเซลล์เนื้อเยื่อหลายๆ ชนิดที่ยังไม่เปลี่ยนแปลง ส่วน MC3T3 มีรูปร่างคล้ายเซลล์กระดูกประเภท Osteoblast มากกว่า [Manfred R และคณะ, 2002] เนื่องจากเป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง (*differentiate*) แล้ว ผลของอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองชนิด แสดงในตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.8 จะเห็นว่า MSC และ MC3T3 ที่เจริญเติบโตบนภาชนะเลี้ยงเซลล์ polystyrene ด้วยอัตราที่ต่างกันเล็กน้อย โดย MSC ที่แยกจาก Wistar rat เจริญเติบโตช้ากว่า MC3T3 จะเห็นได้จากอัตราการแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (population doubling time, PDT) ของ MSC ที่เลี้ยงใน passage ที่ 2-3 ต่ำกว่าของ MC3T3 ประมาณ 2.2-3.6 ชั่วโมง โดย PDT ของเซลล์ทั้งสองชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการย้ายเซลล์ไปเลี้ยง (trypsinization) เพื่อขยายจำนวนใน passage ต่อๆ มา แม้ว่าการทดลองนี้ ไม่ได้มีการทดสอบความคงตัวของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยตรวจสอบแอนติเจน และเปปไทด์ที่ผิวเซลล์ ได้แก่ CD105 และ CD73 เป็นต้น ซึ่งถือเป็น Primary cells [Park และคณะ 2007] แต่ได้มีรายงานการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู Wistar ด้วยวิธีนี้และได้ทำการทดสอบแล้วว่าเซลล์ที่แยกได้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด [Hong L. และคณะ 2007] ส่วนเซลล์ MC3T3 ซึ่งมีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งกระดูกที่ได้รับการปรับปรุงพันธุกรรม แต่ถือว่าเป็นเซลล์มาตรฐานที่สามารถนำมาใช้ในการทดสอบวัสดุเลี้ยงเซลล์กระดูกได้ โดยมีรายงานการใช้งานวิจัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง [Langer, R. และคณะ 2000, Freed L. และคณะ 1997]

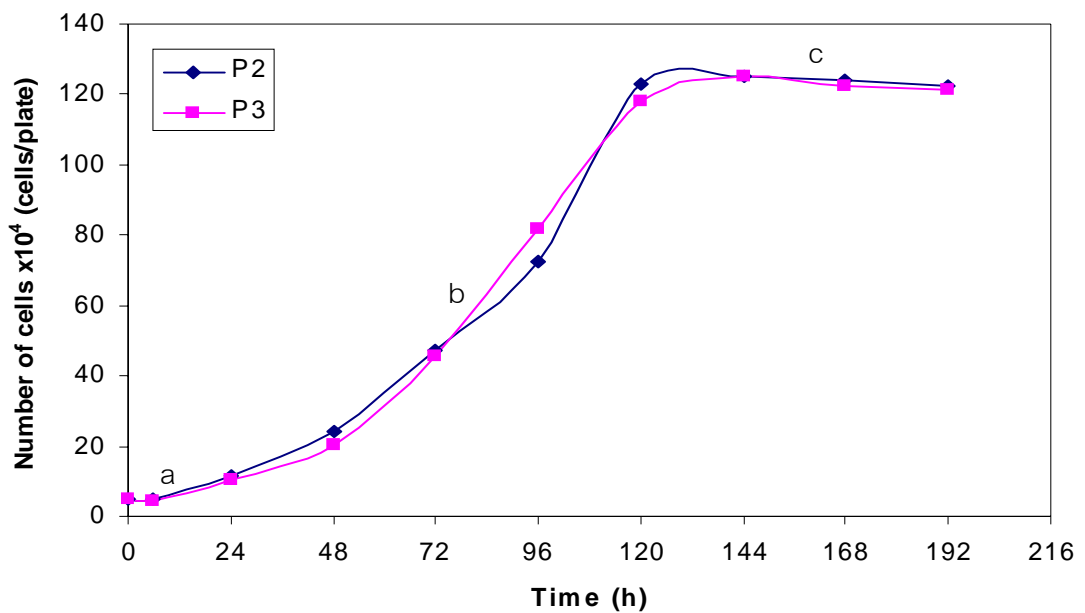
การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Static Culture ที่มีการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน เซลล์ทั้งสองชนิดมี Lag phase ในช่วง 48 ชั่วโมงแรก เนื่องจากเซลล์มีการใช้พลังงานเพื่อปรับตัว เกาะติดพื้นผิว และสร้าง Extra cellular matrix (ECM) โดยมีอัตราการเพิ่มประชากรต่ำที่สุด โดยเริ่มมีการเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็ว (Log phase) ในช่วง 48-120 ชั่วโมงโดยหากคำนวณอัตราการ

เจริญเติบโตในช่วงนี้จะพบว่า MSC มีอัตราการแบ่งตัว 1.3 เท่าต่อ 1 ชั่วโมง และ MC3T3 มีอัตราการแบ่งตัว 2.1 เท่าต่อ 1 ชั่วโมง หลังจาก 120 ชั่วโมงปริมาณประชากรของเซลล์ทั้งสองชนิดเริ่มเข้าสู่ Stationary phase โดยปริมาณเซลล์เริ่มคงที่เนื่องจากข้อจำกัดในด้านพื้นที่และอาหาร ปริมาณสูงสุดของ MSC อยู่ที่ 1.2×10^5 เซลล์/ 2.8×10^4 มม.² และ MC3T3 อยู่ที่ 2×10^5 เซลล์/ 2.8×10^4 มม.² (รูปที่ 4.8)

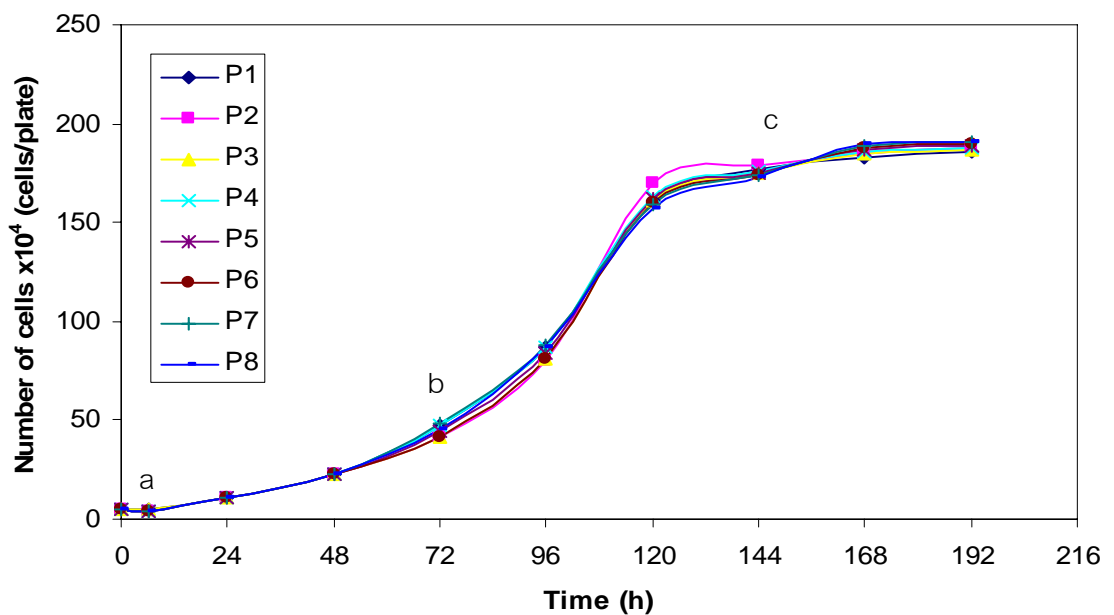


รูปที่ 4.7 ภาพถ่ายภาพใต้วัดกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์ Wistar Rat (Mesenchymal Stem cells (MSC)) (a) และเซลล์ไลเนาะกระดูก (MC3T3) (b) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เพาะเลี้ยงบน จานเพาะเลี้ยงชนิด polystyrene ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM+FBS 15% และ 10% สำหรับ MSC และ MC3T3 ตามลำดับ ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, บรรยากาศ 5% CO₂ เป็นเวลา 5 วัน กำลังขยาย 20 เท่า (Nikon, TS100)

(a)



(b)



รูปที่ 4.8 จลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์ Wistar Rat (Mesenchymal Stem cells (MSC)) Passage ที่ 2 และ 3 (a) และเซลล์ไลน์กระดูก (MC3T3) Passage ที่ 1 ถึง 8 (b) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM, 15% FBS ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 บนจานเลี้ยงเซลล์ polystyrene พื้นที่ 2.8×10^4 มม. กราฟแสดง a คือ Lag phase, b คือ Exponential phase และ c คือ Stationary phase

ตารางที่ 4.3 ธรรมชาติของการเจริญเติบโตบนจานเพาะเลี้ยงชนิด polystyrene ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์ Wistar Rat (Mesenchymal Stem cells (MSC)) และเซลล์ไลน์กระดูก (MC3T3)

Passage	อัตราการแบ่งตัว (multiplication rate, r) (รุ่นต่อชั่วโมง)		เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT) (ชั่วโมง)	
	Mesenchymal Stem cells (MSC)	Bone Cell Line (MC3T3)	Mesenchymal Stem cells (MSC)	Bone Cell Line (MC3T3)
	1		0.0417	
2	0.038	0.0423	25.99	23.62
3	0.038	0.0417	26.33	23.99
4		0.0418		23.90
5		0.0417		23.95
6		0.0417		23.99
7		0.0416		24.03
8		0.0415		24.12

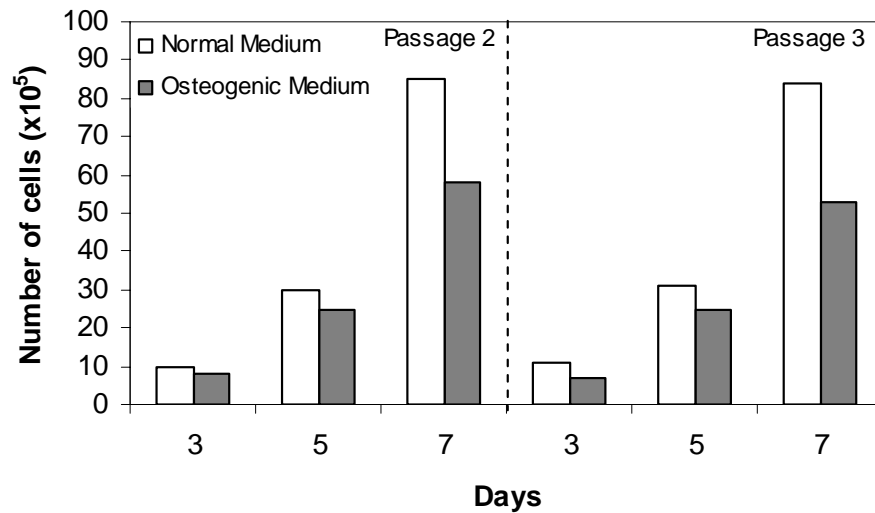
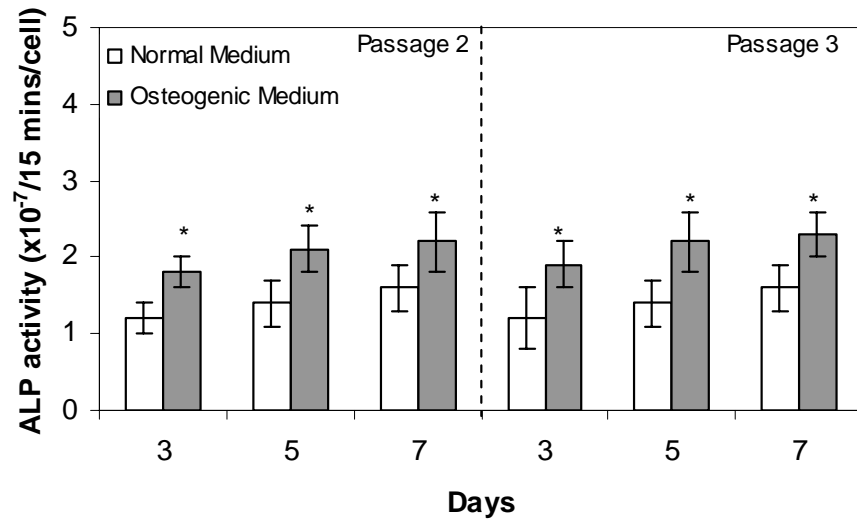
หมายเหตุ

- อัตราการแบ่งตัว (multiplication rate, r) คำนวณจาก
 อัตราการแบ่งตัว $r = \frac{\text{จำนวนชั้นอายุต่อหนึ่งหน่วยเวลา}}{3.32 (\log N_H - \log N_I) / (t_2 - t_1)}$ (รุ่นต่อชั่วโมง)
 เมื่อ N_I เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้น ที่เวลา t_1
 N_H คือจำนวนเซลล์ทั้งหมด ที่เวลา t_2
- เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT) คำนวณจาก
 เวลาแบ่งตัวทวีคูณ $PDT = 1/r$ (ชั่วโมง) [Freshney และคณะ 1994]

4.2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MSC บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ polystyrene

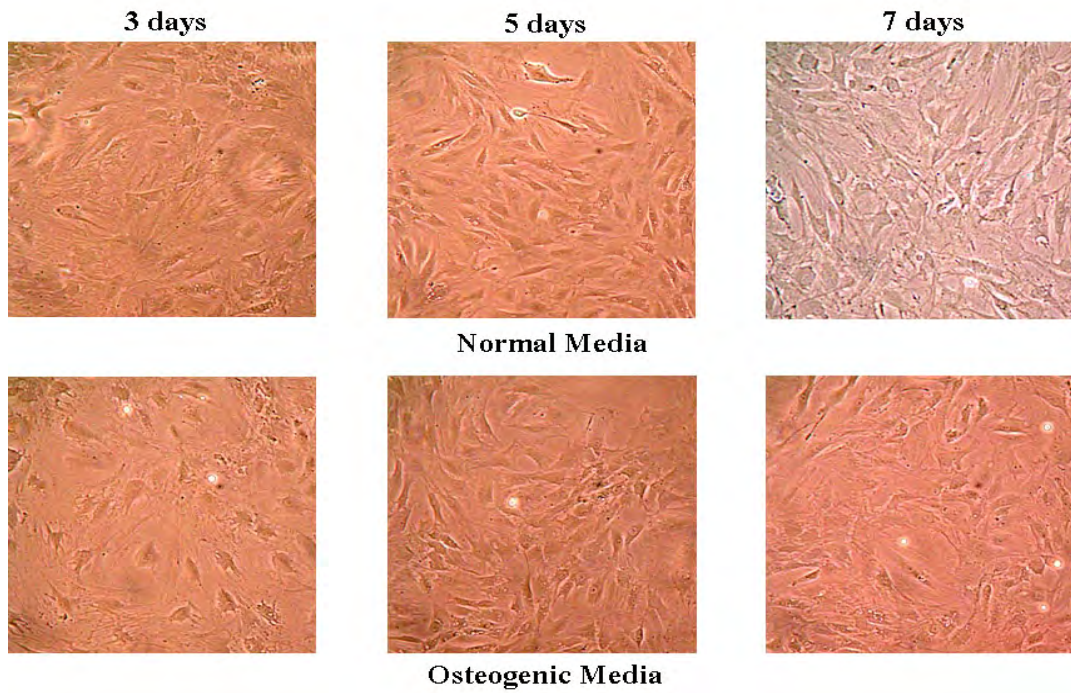
เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิด MSC บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ polystyrene เลี้ยงในอาหารปกติ (Normal medium, NM) และอาหารที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteogenic medium, OM) ใน passage 2 และ 3 (รูปที่ 4.10) พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน OM เหนี่ยวกิจกรรมของ เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) มากกว่าเซลล์เลี้ยงใน NM ทุกช่วงเวลา ที่เป็นที่น่าสังเกตคือในวันที่ 7 เซลล์มีการเจริญเติบโตมาก แต่กิจกรรมของเอนไซม์ ALP ต่อจำนวนเซลล์ยังคงเดิม (รูปที่ 4.9) แต่เซลล์ที่เลี้ยงใน NM จะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าใน OM มีรายงานการวิจัยว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่องค์ประกอบของสารจำพวก osteo-inductive agents เช่น β -glycerophosphate, glucocorticoids, sodium β -glycerophosphate, calcium hexose monophosphate และ dexamethasone [Kim และ 2005] มีผลดีต่อการเกิดกระดูก และกิจกรรมของ ALP เกิดขึ้นสูงสุดในช่วงสองสัปดาห์แรก ของการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูก [Kim และคณะ 2005] เอนไซม์ ALP ที่เซลล์สร้างขึ้นถือเป็นสัญญาณการเปลี่ยนเป็นกระดูกช่วงแรก (early marker) จากผลการทดลองในรูปที่ 4.9 กิจกรรมของ ALP ใน OM สูงกว่า NM ตั้งแต่วันที่ 3 โดยยังไม่พบ ALP สูงสุดอาจเนื่องจากยังเลี้ยงในเวลาที่ยังสั้นไป

รูปร่าง (morphology) ของเซลล์ที่สังเกตด้วยตาของ MSC ใน NM และ OM แตกต่างกัน (รูปที่ 4.9) โดยเซลล์ที่ถูกเลี้ยงใน OM ที่มีกิจกรรมของ ALP สูงกว่ามีรูปร่างกลมกว่า และสังเกตได้ชัดกว่าใน Passage 3 เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวลดลง แสดงให้เห็นผลของการใช้อาหาร Osteogenic Medium ที่ลดอัตราการเจริญเติบโต แต่เพิ่มกิจกรรมของ ALP ที่เด่นชัดในช่วง 7 วัน MSC เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีแนวโน้มที่เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกง่ายกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากไขมัน [Zhang D.Z. และคณะ 2008] รายงานที่ผ่านมา MSC ที่ถูกเลี้ยงใน passage ที่ 5 เป็นต้นไปหลังจากการแยก จะมีเริ่มมีการเสียสภาพการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไป [Strem และคณะ 2005] ทำให้งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของจำนวนมากใช้ MSC ใน passage ต้นๆ เท่านั้น

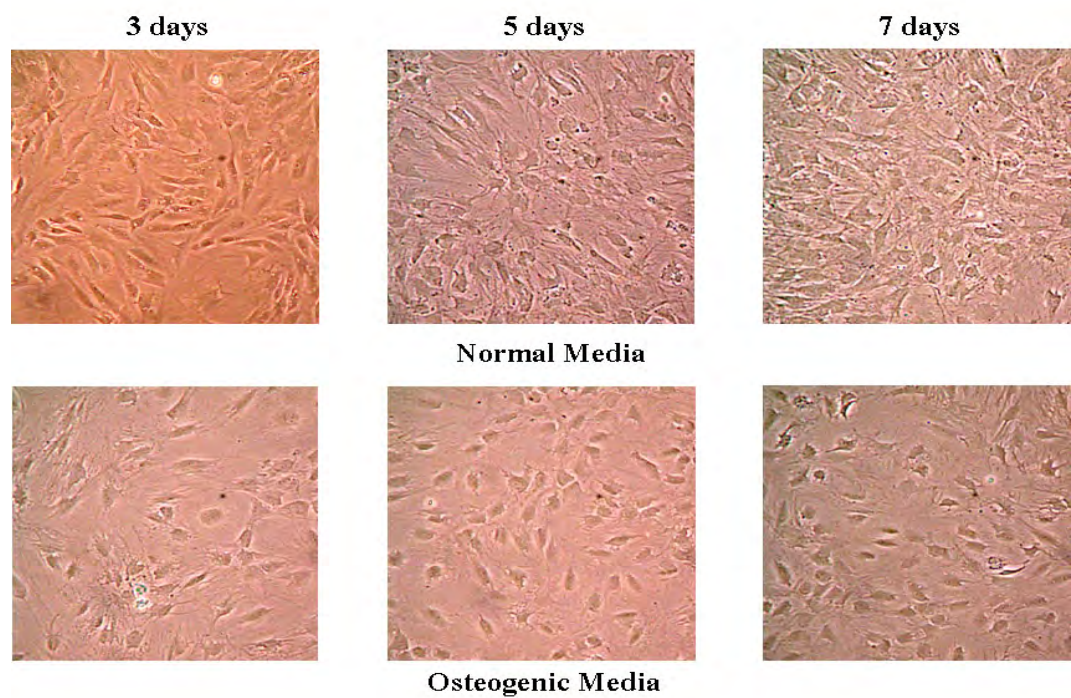


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) และการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium และ Osteogenic Medium ของ Passage ที่ 2 และ 3 บน Polystyrene cell culture plate ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง NM และ OM ที่ความเชื่อมั่น 95% ในช่วงเวลาเดียวกัน) (ไม่มีการทดสอบนัยสำคัญทางสถิติในรูปถ่ายเนื่องจากใช้ตัวอย่างหาปริมาณ ALP 3 ซ้ำ และใช้นัยสำคัญจำนวนเซลล์โดยตรง 1 ซ้ำ)

(a) passage 2



(b) passage 3

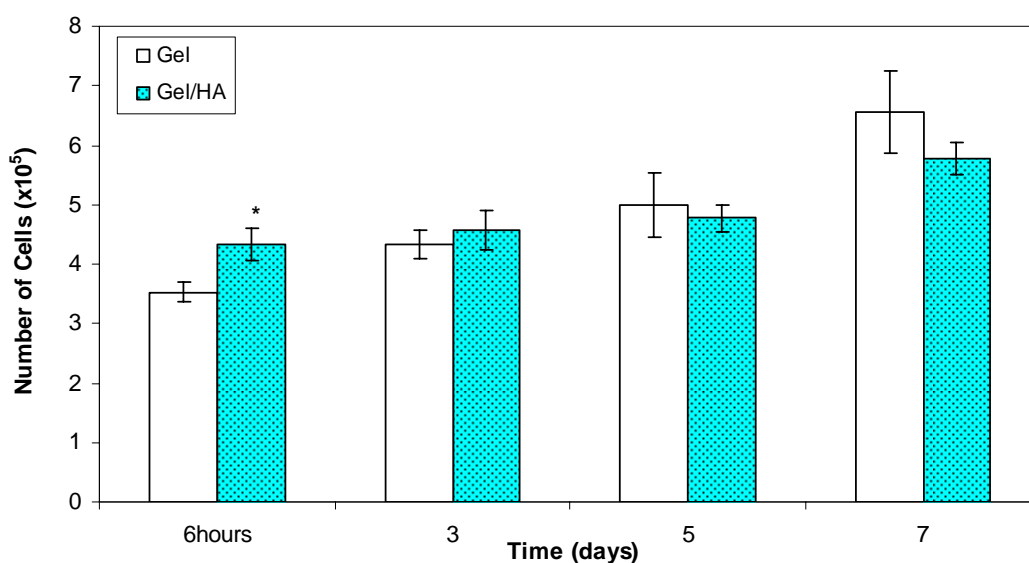


รูปที่ 4.10 เซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) (a) passage 2 และ (b) passage 3 ที่เจริญเติบโตบนจานเลี้ยงเซลล์ polystyrene ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Normal Medium และ Osteogenic Medium ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

4.3 สมบัติทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์

4.3.1 การทดสอบการยึดติดและเจริญเติบโตของเซลล์

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีววิทยาของ MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และ Gel/HA ทำโดยวัดจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์เลี้ยงในอาหารปกติ (α -MEM, 15% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin) โดยการวัดจำนวนเซลล์โดยใช้วิธี DNA assays การทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้บนโครงเลี้ยงทั้งสองชนิด โดย MSC สามารถยึดบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่มีพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขรุขระ ทำให้มีพื้นที่การยึดเกาะได้มากกว่าพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel ที่มีผิวเรียบ การเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 3, 5 และ 7 วัน พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT) ของโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีค่าเป็น 233.8 และ 250.8 ชั่วโมงตามลำดับ



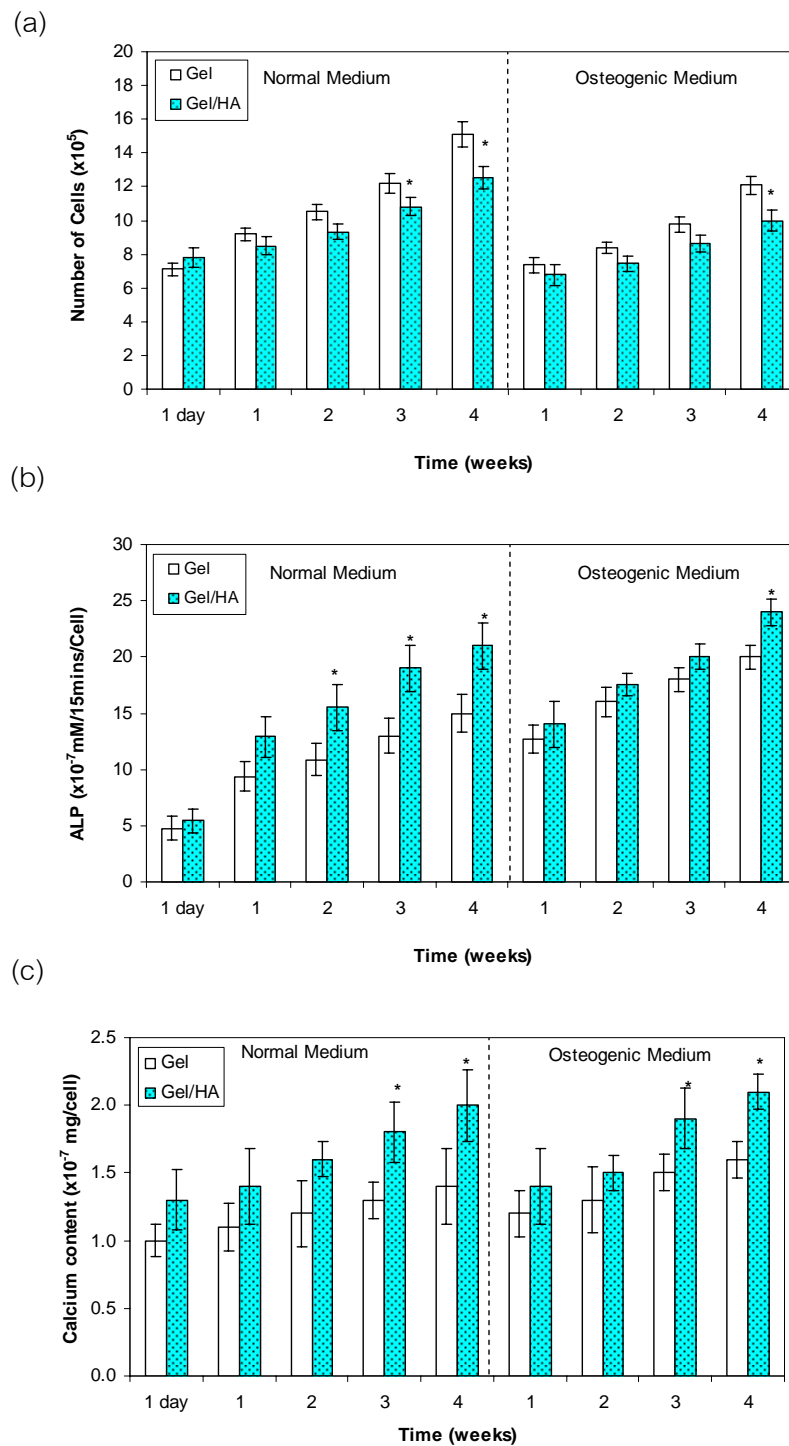
รูปที่ 4.11 การยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Normal Medium ที่สภาวะแบบสถิตย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน)

4.3.2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของ MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะการเลี้ยงแบบ สติติว

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของของเซลล์ MSC บนโครงเลี้ยง Gel และโครงเลี้ยง Gel/HA โดยนำมาเพาะเซลล์จำนวน 6×10^6 เซลล์ต่อชาม.³ ซึ่งมีรายงานว่าเหมาะสม ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เนื่องจากเซลล์มี cell-cell interaction เมื่อเลี้ยงในอาหาร NM และอาหาร OM [Ozawa และคณะ 1996] ในอาหาร NM พบว่าจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงใน สัปดาห์ที่ 3 และ 4 จำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยง Gel มีจำนวนสูงกว่าโครงเลี้ยง Gel/HA อย่างมี นัยสำคัญ ส่วนในอาหารที่เลี้ยงด้วย OM สัปดาห์ที่ 4 จำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยง Gel มีจำนวน มากกว่าโครงเลี้ยง Gel/HA อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.12 (a)) โดยจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร OM มีจำนวนเซลล์น้อยกว่าในอาหาร NM ตลอด 4 สัปดาห์ เนื่องจากมีเซลล์การเปลี่ยนแปลงไป เป็นกระดูกทำให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง [Belmonte และคณะ 2005]

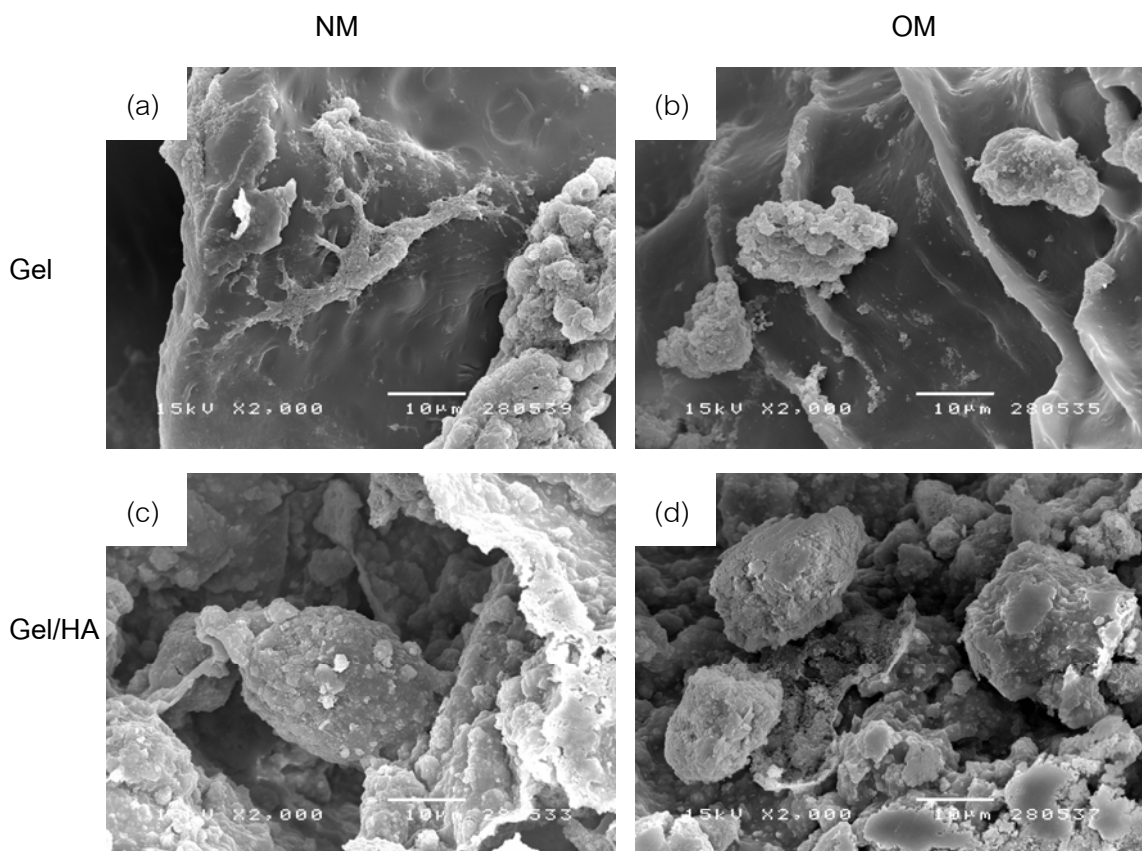
เซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในอาหาร NM บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALP สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 2-4 เซลล์สามารถสร้าง ALP บนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดใน OM มากกว่าในอาหาร NM เมื่อเทียบจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน แต่ในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มี ALP สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อ เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ Gel (รูปที่ 4.12 (b)) ปริมาณของแคลเซียมในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel อย่างมีนัยสำคัญในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่สัปดาห์ 3 และ 4 ดังรูป ที่ 4.12 (c) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการสร้างแคลเซียมขึ้นมา เนื่องจากเซลล์ถูกชักนำให้ เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า OM ทำให้เซลล์เจริญเติบโตช้า และมีผลกระตุ้นกิจกรรม ของเอนไซม์ ALP ในโครงเลี้ยงเซลล์ Gel แต่ไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมเพราะ 4 สัปดาห์อาจยังไม่เห็นการให้แคลเซียมสูงสุด ใน Osteogenic medium จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALP สูงสุดใน สัปดาห์ที่ 2 ซึ่งเป็น early marker และแคลเซียมจะเริ่มสูงในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป โดยเป็น late marker ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Porter R. 2004] จากรายงานการเลี้ยง MSC ในโครงเลี้ยงเซลล์โคโคซานและคอลลาเจนจะเริ่มปริมาณแคลเซียมสูง ที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 [Arpornmaeklong และคณะ 2007] แต่ OM ไม่มีผลต่อโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA เพราะมี ไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้อยู่แล้ว แต่ OM จะมีผลอย่างชัดเจนต่อเซลล์ต้นกำเนิดก็ต่อเมื่อเซลล์ไม่ได้รับการชักนำจากตัวโครงเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ (a), กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียม (c) จากเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู Wistar ที่เลี้ยงในอาหาร NM และ OM บน โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ Gel)

รูปร่างของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดในสัปดาห์ที่ 4 แสดงดังรูปที่ 4.13 เมื่อเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel ในอาหาร NM เซลล์ MSC มีรูปร่างแผ่ยาวเรียวยาวคล้ายกระสวย (spindle shape) แต่เมื่อใช้โครงเลี้ยงเซลล์ Gel เลี้ยงอาหาร OM หรือโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่เลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดจะมีรูปร่างกลม (round shape) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์จะเป็นตัวที่ชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิด (MSC) สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ [Shimaoka H. และคณะ 2006] ไม่ว่าจะอยู่ในอาหาร OM หรือ NM



รูปที่ 4.13 ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินในอาหารเลี้ยงเซลล์ Normal Medium (a), Osteogenic Medium (b) และ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Normal Medium (c) และ Osteogenic Medium (d) ที่เวลา 4 สัปดาห์ สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

4.4 การออกแบบ และทดสอบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านที่สร้างขึ้นโดยใช้อะคริลิกเป็นวัสดุในการผลิต ประกอบด้วยตัวให้โครงเลี้ยงเซลล์ และรังผึ้งเพื่อให้อาหารกระจายตัวได้ดีทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ ใช้ท่อซิลิโคนเป็นตัวขนส่งอาหาร สามารถประกอบและใช้งานได้ง่าย และสามารถฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอธิลีนได้ แสดงในภาคผนวก ข การทดสอบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพกับปั๊ม Peristaltic โดยให้ปั๊มหมุนที่ความเร็วรอบต่างๆ โดยหาอัตราการไหลผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ แสดงในภาคผนวก ค โดยความเร็วรอบของการหมุนสามารถควบคุมอัตราการไหลได้ หลังจากนั้นเลือกใช้ความเร็วรอบที่ 70 รอบต่อนาที ซึ่งทำให้ได้อัตราการไหลอยู่ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้อัตราการไหลนี้ทำการทดลองซึ่งอัตราไหลดังกล่าวที่เลือกใช้เป็นอัตราการไหลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านในช่วง 1-3 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเจริญเติบโต และชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดี [Hosseinkhani H. และคณะ 2006]

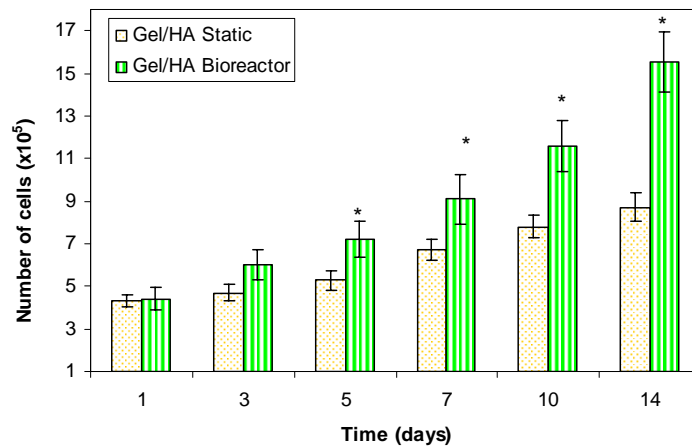
4.5 การทดสอบการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.5.1 การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) ที่เลี้ยงในอาหารปกติ (NM)

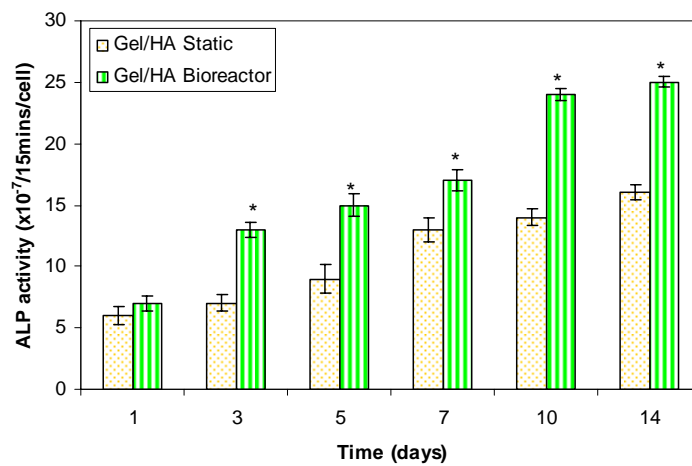
การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) เพาะเซลล์ 5×10^5 เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เปรียบเทียบกันระหว่างสภาวะสถิตย์ โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพาะได้ไปเลี้ยงใน 6-well plate และอีกสภาวะของการเลี้ยงนำไปเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่าน โดยมีการหมุนวนของอาหารผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที พบว่าการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีจำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่าในสภาวะแบบสถิตย์ ดังรูป 4.14 (a) โดยตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 14 ของการเลี้ยงมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยค่าเวลาการแบ่งตัวที่คูณของการเลี้ยงสภาวะสถิตย์และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีค่าเป็น 253.1 และ 192.9 ชั่วโมงตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านจะมีอาหารไหลผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ตลอดเวลา ไม่มีการสะสมของเสียไว้ในส่วนกลางของตัวโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากการเลี้ยงแบบนี้จะทำให้ไม่มีปัญหาเรื่องการถ่ายโอนมวลสาร (mass transfer) เซลล์สามารถเจริญและมีชีวิตรอดทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจะแตกต่างกับแบบสภาวะสถิตย์ที่เซลล์จะสามารถเจริญเติบโตได้มากเฉพาะที่ผิวของเซลล์ [Martin I. และคณะ 2004]

เซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในอาหารปกติ เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านมีกิจกรรมของ ALP สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะสถิตย์ 1.67 เท่าในวันที่ 14 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3-14 เมื่อเทียบจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน ดังรูปที่ 4.14 (b) ปริมาณของแคลเซียมดังรูปที่ 4.14 (c) ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสูงกว่าสภาวะสถิตย์ 2.3 เท่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญวันที่ 7-14 แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการสร้างแคลเซียม เนื่องจากเซลล์ถูกชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก โดยการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีการให้แรงทางกล เช่น แรงเฉือน (Shear force) จากการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้เกิดการชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Singh H. และคณะ 2005]

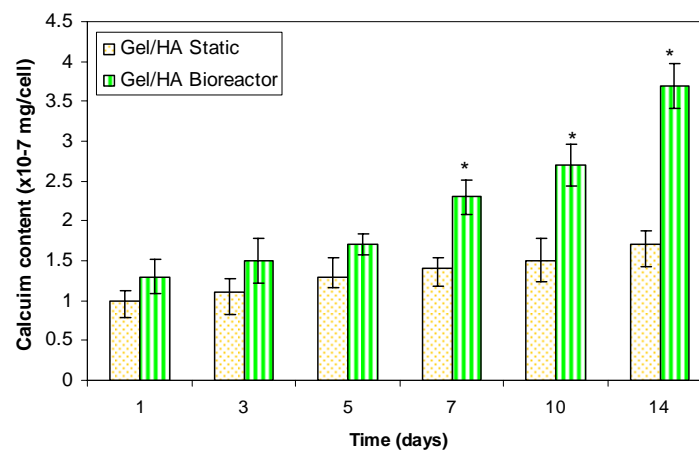
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ (a), กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียม (c) บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่เลี้ยงแบบสแตติก และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในอาหาร Normal Medium ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบสแตติก)

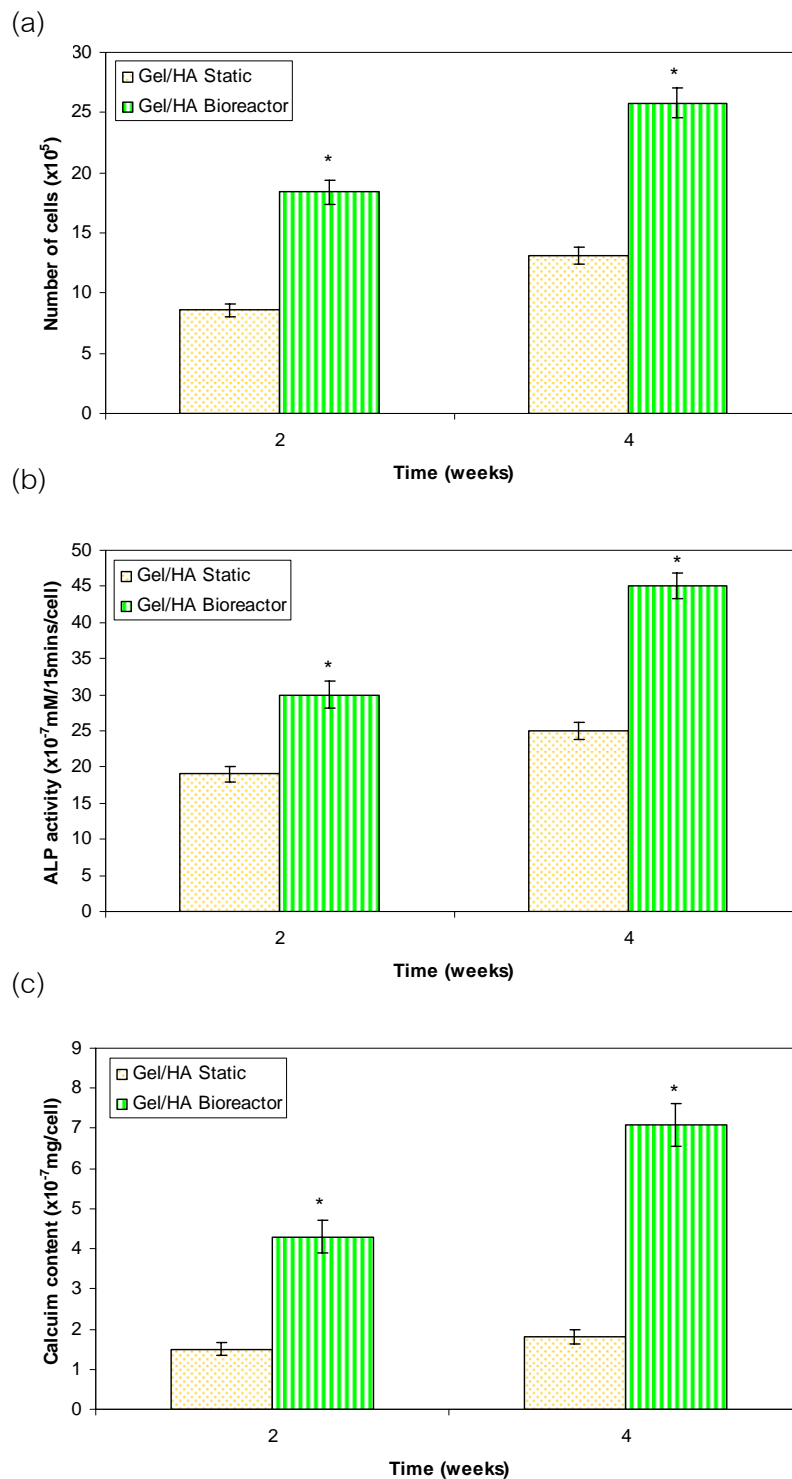
4.5.2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูกของหนู Wistar ที่เลี้ยงในอาหาร Osteogenic Medium

เซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในอาหาร Osteogenic Medium พบว่าการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีจำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่าในสภาวะแบบสถิตย์ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ดังรูป 4.15 (a) การเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านมีกิจกรรมของ ALP สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะสถิตย์ ดังรูปที่ 4.15 (b) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เมื่อเทียบจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน ปริมาณของแคลเซียมดังรูปที่ 4.15 (c) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสูงกว่าแบบสถิตย์อย่างมีนัยสำคัญสัปดาห์ที่ 2 และ 4 แสดงให้เห็นว่าเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกและมีการสร้างแคลเซียมขึ้นมา ปริมาณเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ในสัปดาห์ที่ 4 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีความหนาแน่นมากกว่าในสภาวะแบบสถิตย์ ดังรูปที่ 4.16 การตรวจสอบการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในอาหาร OM ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพให้ผลของ ALP และแคลเซียมสูงกว่า 1.2 และ 1.14 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะสถิตย์ เมื่อเปรียบเทียบกับผล 4.5.1 ในอาหารปกติในวันที่ 14 ซึ่งเป็นผลมาจากทั้ง 2 ปัจจัย คือ อาหารและสภาวะการเลี้ยงที่จะทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดี ผลของ EDS โดยมีลำอิเล็กตรอน (electron beam) รัศมีขนาด 5 ไมโครเมตร และเซลล์มีขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร ทำให้ลำอิเล็กตรอนยิงที่เซลล์โดยไม่ตกกระทบบริเวณข้างเคียง พบว่าเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic Medium แบบสภาวะสถิตย์ และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่เวลา 4 สัปดาห์แสดงในรูป 4.15 (c) ได้ค่า แคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca:P) เท่ากับ 1.55 และ 1.61 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส ของกระดูกมนุษย์จะอยู่ในช่วง 1.15 – 1.70 ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวขึ้นอยู่กับโครงสร้างของแคลเซียมและฟอสฟอรัส โดย 1.00 เป็น ไดแคลเซียมฟอสเฟต, 1.33 เป็น ออกตะแคลเซียมฟอสเฟต 1.50 เป็น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และ 1.67 เป็น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [Hwang Y.S. และคณะ 2009]

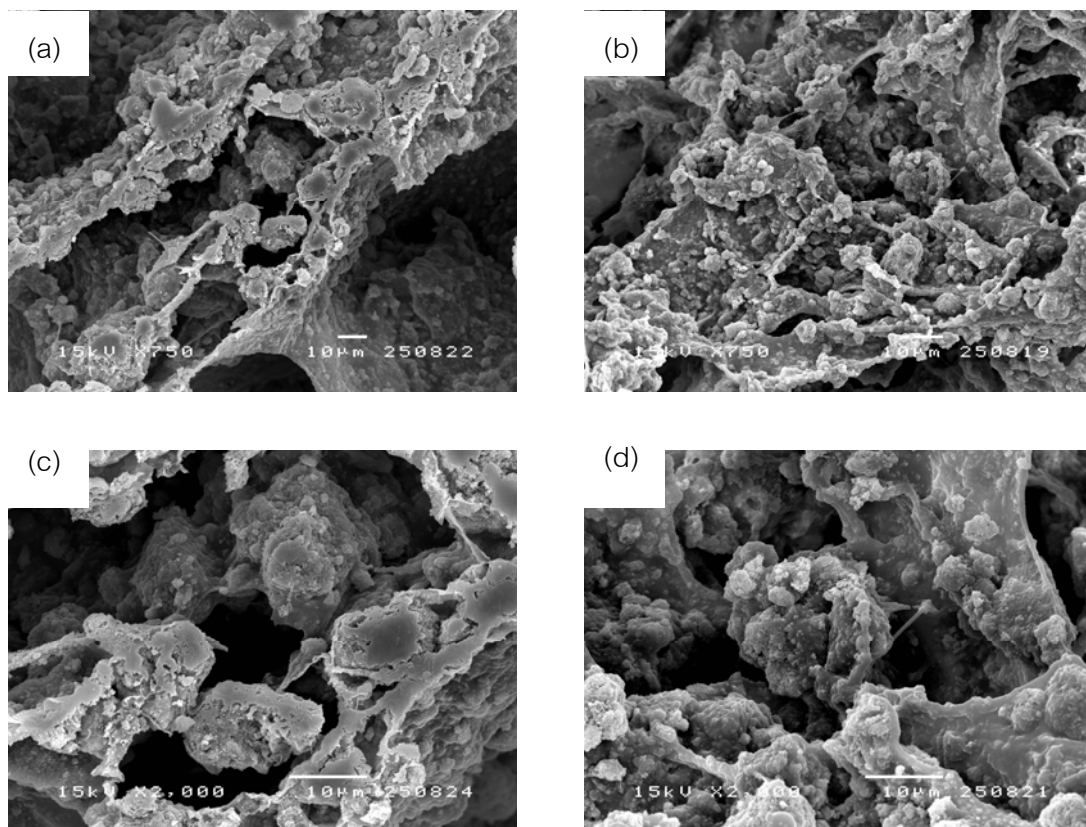
จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา Takashi Y. และคณะ (2004) ใช้ MSC เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินผสม β -tricalcium phosphate ที่อัตราส่วนร้อยละ 10 ต่อ 90 โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบปั่นกววนเปรียบเทียบกับสภาวะสถิตย์ เป็นเวลา 28 วัน พบว่าการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณเซลล์สูงกว่า 1.33 เท่า กิจกรรมของเอนไซม์ ALP สูงกว่า 7 เท่า และปริมาณ Osteocalcin สูงกว่า 1.1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะสถิต [Takashi Y. และคณะ 2004] และ Zhi-Yong และคณะ (2009) ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์บนโครงเลี้ยงเซลล์ polycaprolactone-tricalcium phosphate (PCL-TCP) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ

biaxial rotating เพื่อให้เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก พบว่าหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 28 วันในอาหาร osteogenic medium พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเซลล์เริ่มต้น และเซลล์มีชีวิตอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ลึกจากผิว 2 เซนติเมตร มีการสร้าง alkaline phosphatase และ แคลเซียม 1.5 เท่า และ 5.5 เท่า ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะสถิตย์ [Zhi-Yong และคณะ 2009]

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจะช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากมีการไหลของอาหารตลอดเวลา ทำให้เซลล์ในส่วนกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ได้รับอาหาร และออกซิเจนตลอดเวลา นอกจากนี้ยังช่วยในการขับของเสียออกจากโครงเลี้ยงเซลล์อย่างได้ดี และการใช้แรงเฉือนจากการไหลของอาหารยังช่วยทำให้เซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ด้วย ดังสรุปในตารางที่ 4.5 โดยข้อดีของการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านคือทำให้เซลล์เจริญเติบโต และชักนำเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหมุนที่มีการลอยแบบอิสระของโครงเลี้ยงเซลล์ ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ไปชนกับผนังของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเซลล์ได้รับความเสียหาย [Zhang Z.Y. และคณะ 2009]



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ (a), กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (b) และปริมาณแคลเซียม (c) บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่เลี้ยงแบบสแตติก (Static) และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ในอาหาร Osteogenic Medium ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบสแตติก)



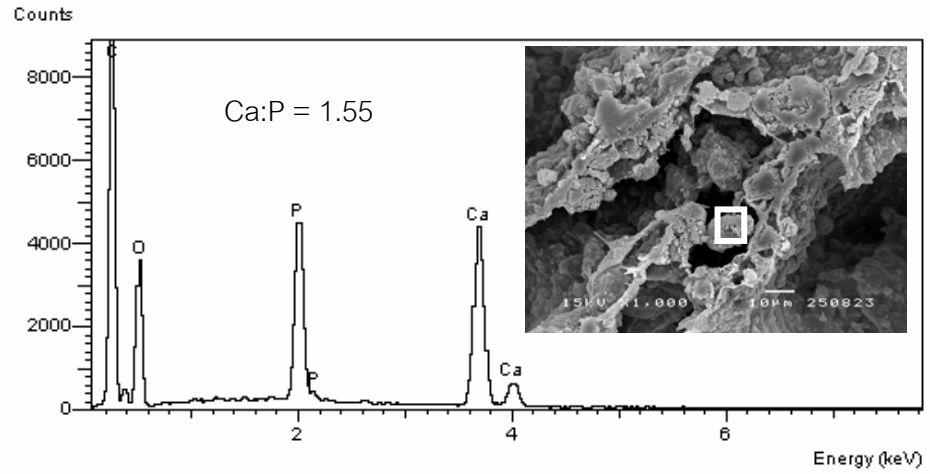
รูปที่ 4.16 ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) โค้งเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic Medium แบบสภาวะสถิตย์ (a-b) และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (c-d) ที่เวลา 4 สัปดาห์ สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

ตารางที่ 4.4 แสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic Medium แบบสภาวะสถิตย์ และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่เวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

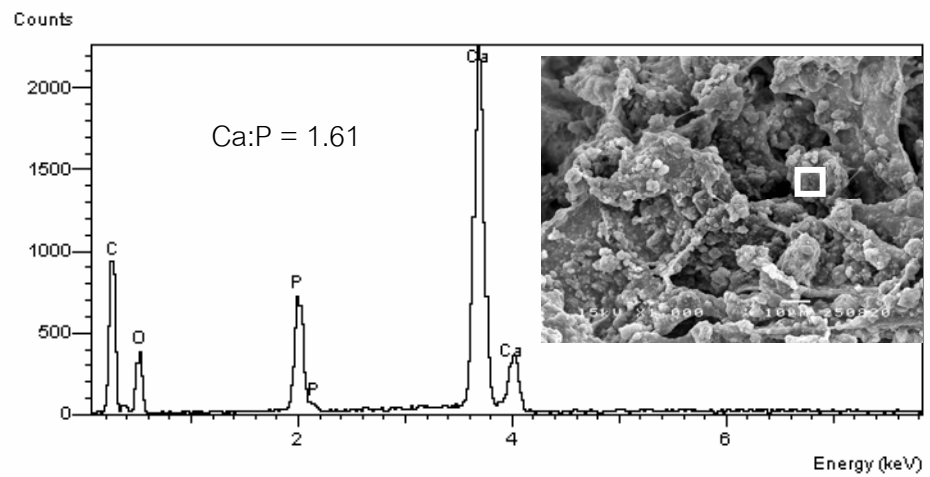
Element	Condition	
	Static	Bioreactor
O	64.36	66.80
P	13.93	12.73
Ca	21.72	20.47
Total	100	100
Ca:P	1.55	1.61

* หมายเหตุ Ca:P ในกระดูกมนุษย์ค่าจะอยู่ประมาณ 1.15-1.70 [Hwang Y.S. และคณะ 2009]

(a)



(b)



รูปที่ 4.17 กราฟเส้นแสดงผลจากการตรวจสอบด้วย EDS ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic Medium แบบสภาวะสถิตย์ (a) และแบบใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (b) ที่เวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

ตารางที่ 4.5 สรุปการเลี้ยง MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในสภาวะแบบสถิตย์ และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในอาหาร Normal Medium และ Osteogenic Medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

Condition of culture	Static		Bioreactor	
	NM	OM	NM	OM
Time (days)	14	14	14	14
Cells seeded (cells)	5x10 ⁵	1x10 ⁶	5x10 ⁵	1x10 ⁶
PDT (hrs)	253.08	261.13	233.80	242.23
Number of cells attached at 6 hrs (cells/mm ³)	5.2x10 ³ (91%)	13.5x10 ³ (93%)	5.2x10 ³ (91%)	13.5x10 ³ (93%)
Maximum cells density (cells/mm ³) at 14 days	1.0x10 ⁴	1.3x10 ⁴	1.5x10 ⁴	2.8 x10 ⁴
ALP (x10 ⁻⁷ mM/cell)	14.7	19.3	24.8	31.2
Calcium (x10 ⁻⁷ mg/cell)	1.6	1.8	3.7	4.3

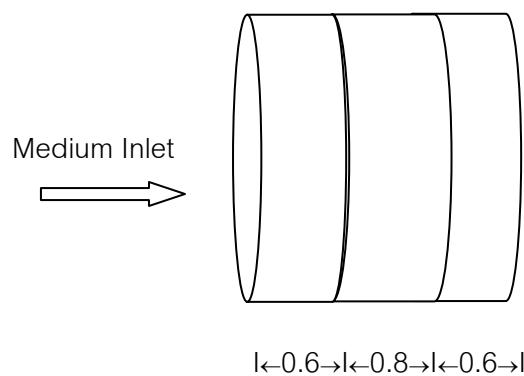
* งานเพาะเลี้ยงเซลล์พื้นที่ = 188.57 ตารางมิลลิเมตร

โครงเลี้ยงเซลล์ปริมาตร = 69±3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

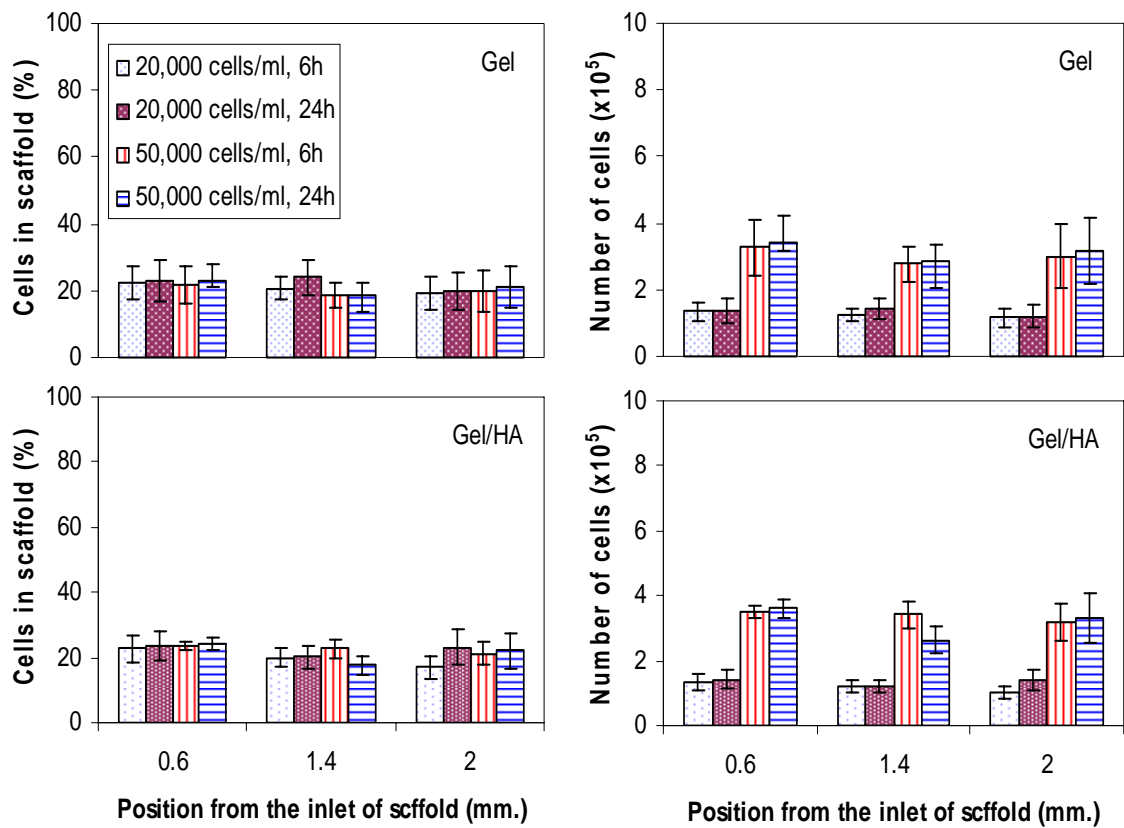
4.6 การเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

การเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีการติดตั้งเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพคล้ายกับการทดลองในส่วนของการทดลองที่ 3.4.10 แต่วางโครงเลี้ยงเซลล์เปล่าลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และใช้เซลล์แขวนลอยในอาหารอาหารปกติ (α -MEM, 15% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin) เข้มข้น 2x10⁴ และ 5x10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร ใส่ในขวดอาหารเลี้ยงเซลล์ และให้ให้เซลล์แขวนลอยหมุนอยู่ในระบบ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที และเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างชิ้นงานมาตัด 3 ตำแหน่ง คือ ช่วงที่เซลล์แขวนลอยไหลเข้าโครงเลี้ยงเซลล์ (0-0.6 มิลลิเมตร), ช่วงตรงกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ (0.6 –1.4 มิลลิเมตร) และช่วงท้ายของโครงเลี้ยงเซลล์ (1.4-2 มิลลิเมตร) ดังรูปที่ 4.18 เพื่อประเมินการยึดเกาะของเซลล์ตลอดทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 และ 24 ชั่วโมง เซลล์สามารถยึดเกาะในตำแหน่งต่างๆ ได้ประมาณร้อยละ 20 ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดแม้ว่าจะใช้เซลล์แขวนลอยที่ความเข้มข้นของเซลล์ต่างกัน โดยเมื่อใช้เซลล์แขวนลอยเจือจาง (2x10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร) จะได้ปริมาณ

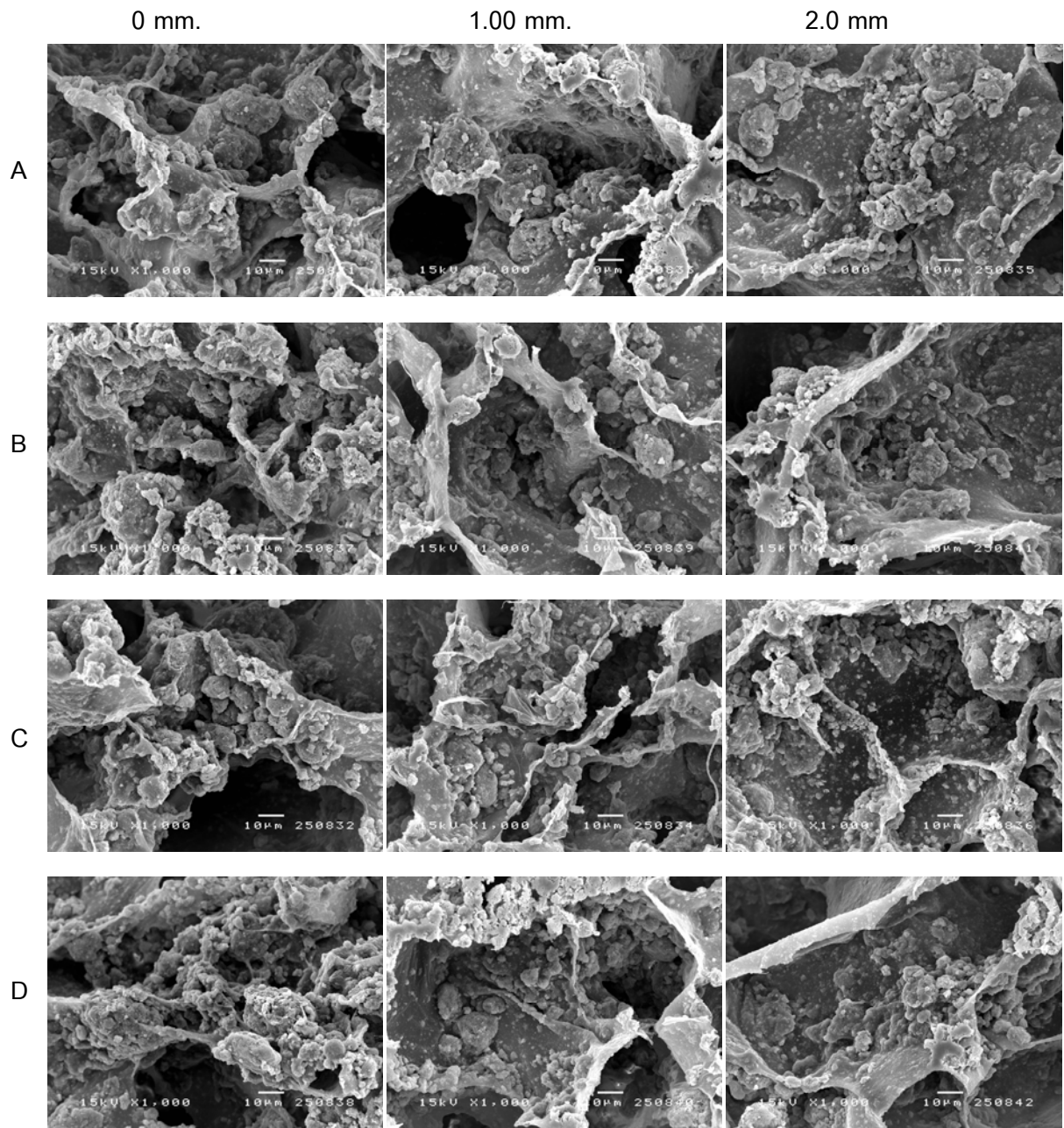
เซลล์ยึดเกาะรวม 3.5×10^5 เซลล์ (5.1×10^3 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเป็น 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะเพิ่มขึ้นเป็น 8.9×10^5 เซลล์ (1.3×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) เมื่อเพิ่มเวลาในการหมუნวนของเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับการเพาะเซลล์โดยใช้เวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 4.19) ปริมาณเซลล์ที่กระจายในโครงเลี้ยงเซลล์ขนาดนี้ค่อนข้างสม่ำเสมอ โดยที่ทางเข้าของสายป้อนมีปริมาณเซลล์สูงกว่าเล็กน้อย การกระจายตัวของเซลล์หลังการเพาะแสดงรูปที่ 4.20 ช่วงทางเข้า, กลาง และท้ายโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีร้อยละการยึดเกาะของเซลล์เท่ากับ 22.994, 20.332 และ 20.474 ตามลำดับ เซลล์สามารถยึดเกาะและกระจายตัวได้ดีทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ โดยดูได้จากภาพ SEM ที่ตำแหน่งต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ (ตารางที่ 4.6) จากรายงานการเพาะเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ โดยให้เซลล์แขวนลอยเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะกับโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีตลอดทั้งชิ้น ความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะได้ 2×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาณเซลล์ที่ใช้ทั้งหมด [Bueno M. และคณะ 2007] ปริมาณเซลล์ยึดเกาะได้บนโครงเลี้ยงเซลล์นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่นำมาผลิตโครงเลี้ยงเซลล์, พื้นผิวที่สัมผัสภายใน และความพรุน ทำให้ปริมาณเซลล์ที่เกาะได้สูงสุดจากรายงานการวิจัยต่างๆ ต่างกัน งานวิจัยนี้ถึงแม้จะใช้เจลาตินที่มีหมู่กรดอะมิโน RGD ซึ่งเซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี แต่โครงเลี้ยงเซลล์มีความพรุนค่อนข้างต่ำ คือประมาณ 50-60% เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ และมีความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ค่อนข้างสูงสืบเนื่องจากใช้วิธีการขึ้นรูป แต่ก็ได้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถใช้เซลล์แขวนลอยเจือจางเพาะให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงขึ้นบนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์สามารถกระจายตัวทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 4.18 แสดงตำแหน่งหน่วยมิลลิเมตรของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ตัดนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์



รูปที่ 4.19 ร้อยละของเซลล์หลังการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และ Gel/HA เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง โดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้เซลล์ความเข้มข้น 2×10^4 และ 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยมีเซลล์วนอยู่ในระบบ 30 มิลลิลิตรเพาะในอาหาร α -MEM+FBS 15% ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (*,# แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ความเข้มข้น 2×10^4 ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง)



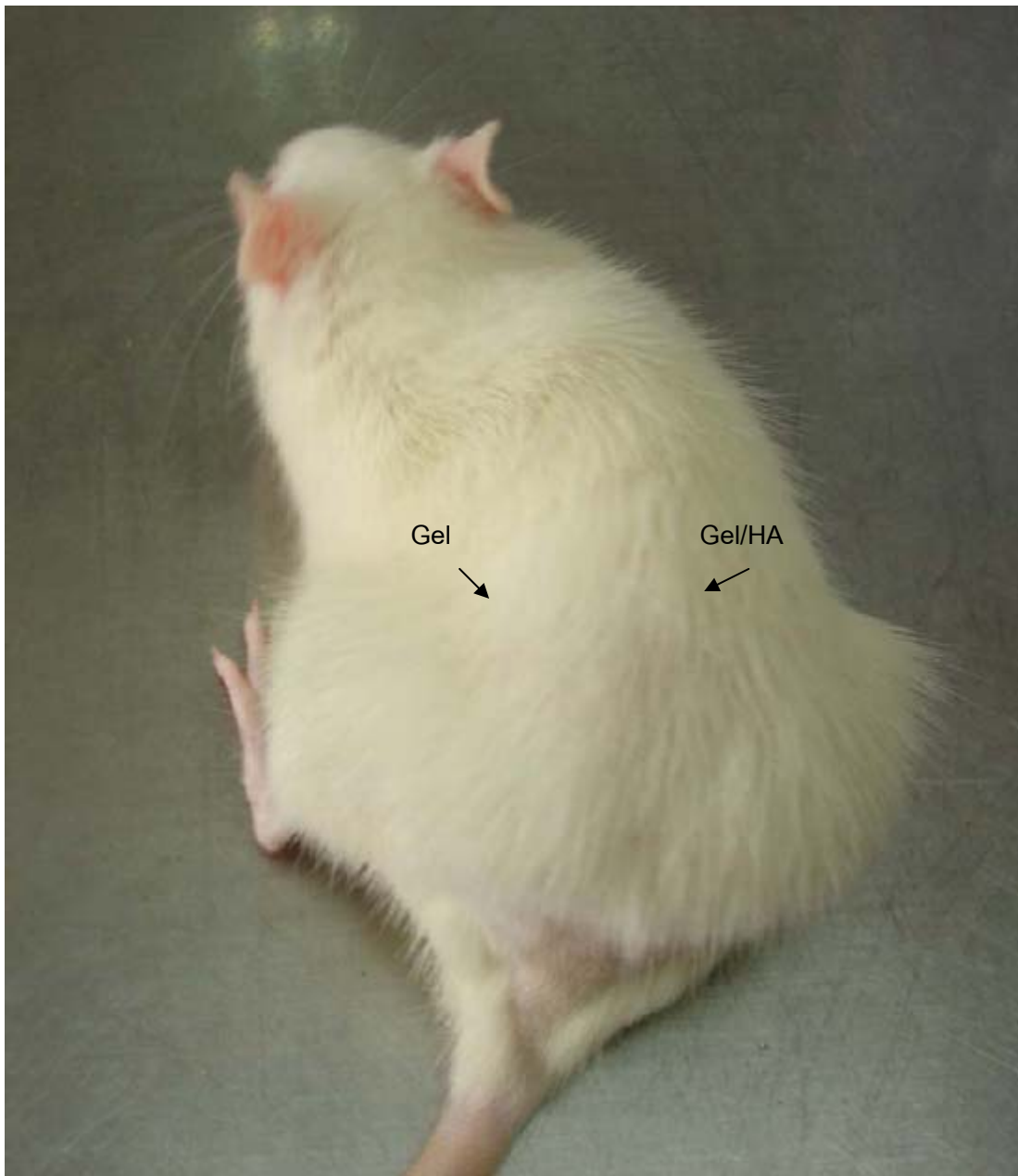
รูปที่ 4.20 การกระจายตัวของเซลล์หลังการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้เซลล์ความเข้มข้น 2×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง (A), 2×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง (B), 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง (C) และ 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง (D) รูปซ้ายมือเป็นตำแหน่งที่ 0 มิลลิเมตร รูปกลาง 1.0 มิลลิเมตร และรูปขวามือ 2.0 มิลลิเมตร จากทางเข้าของสายป้อน โดยมีเซลล์วนอยู่ในระบบ 30 ml เพาะในอาหาร α -MEM+FBS 15% ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ	เซลล์	โครงเลี้ยงเซลล์/ ขนาด (มิลลิเมตร)	ความหนาแน่น ของเซลล์ (เซลล์/ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	แหล่งอ้างอิง
spinner flask	chondrocytes	Alginate/ 7x5x2	7.1×10^5	Almarza และ Athanasiou (2004)
radial perfusion	NIH/3T3	PLLA/ 1x3x20	3.3×10^4	Kitagawa และ คณะ (2006)
oscillating perfusion	MSC	Hyaff 11 [®] D=5 , H=4	2.5×10^5	Wendt และคณะ (2003)
perfusion	MSC	PET D=1.6, H=1.2	3.1×10^5	Zhao และ Ma (2005)
static	MSC	β -Tricalcium phosphate 5x5x5	4×10^4	Wang และคณะ (2006)

4.7 การเข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกาย (*In vivo* biocompatibility)

การทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกาย โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA โดยผ่านก๊าซเอธิลีนออกไซด์ จากนั้นฝังใต้แผ่นหลังของ Wistar rat เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.21



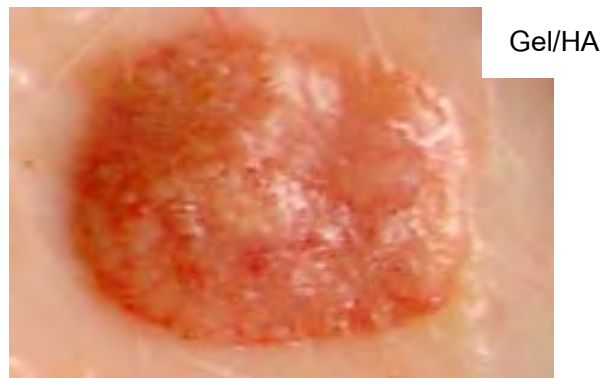
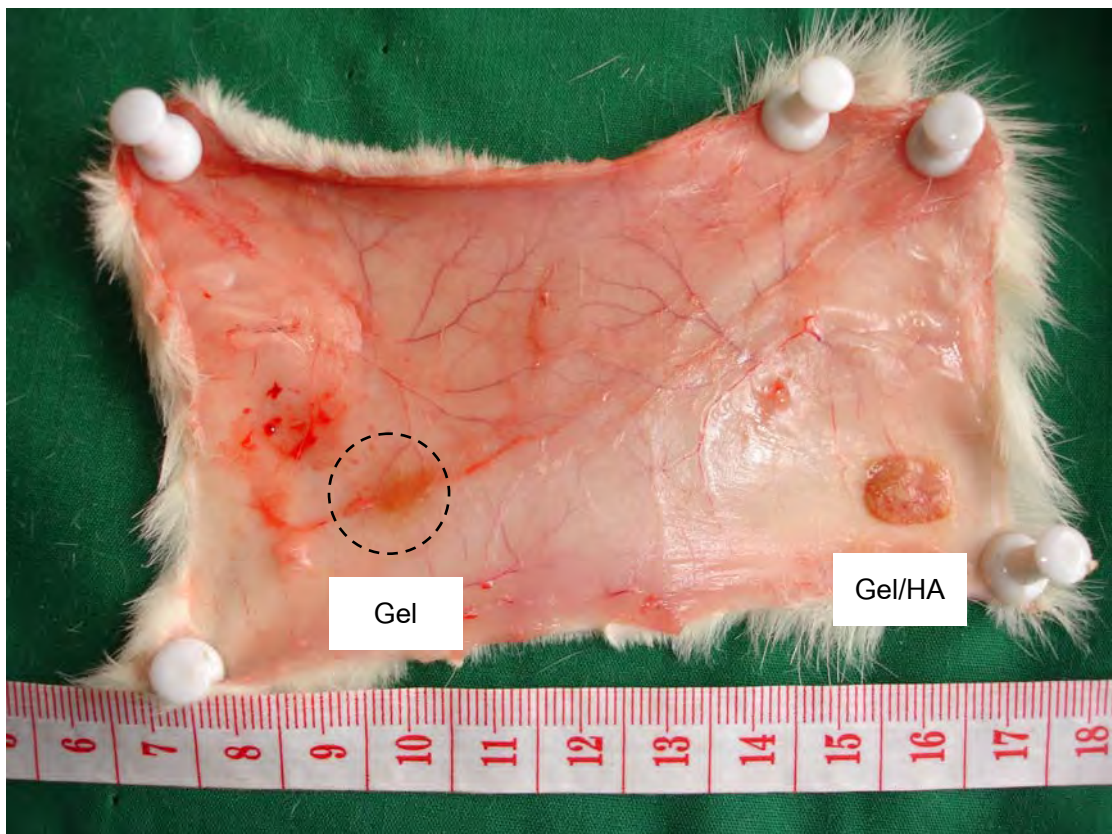
รูปที่ 4.21 แสดงโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (Gel) และ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) ที่ฝังใต้แผ่นหลังของหนู Wistar ในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากการฝัง

ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อฝังบริเวณใต้แผ่นหลังของหนูที่เวลา 4 สัปดาห์ ได้ผลดังรูปที่ 4.22 สุขภาพของหนูปกติตลอด 4 สัปดาห์ของการเลี้ยง โดยไม่พบผื่นแดงขึ้นที่ผิวหนัง ขนหนูไม่ร่วง และไม่เกิดการเป็นหนองบริเวณที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อพิจารณาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อระยะเวลาผ่านไปโครงเลี้ยงเซลล์เกิดการย่อยสลายมากขึ้น ขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์เล็กลง โดยที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ โครงเลี้ยงเซลล์ Gel เกิดการย่อยสลายหมด

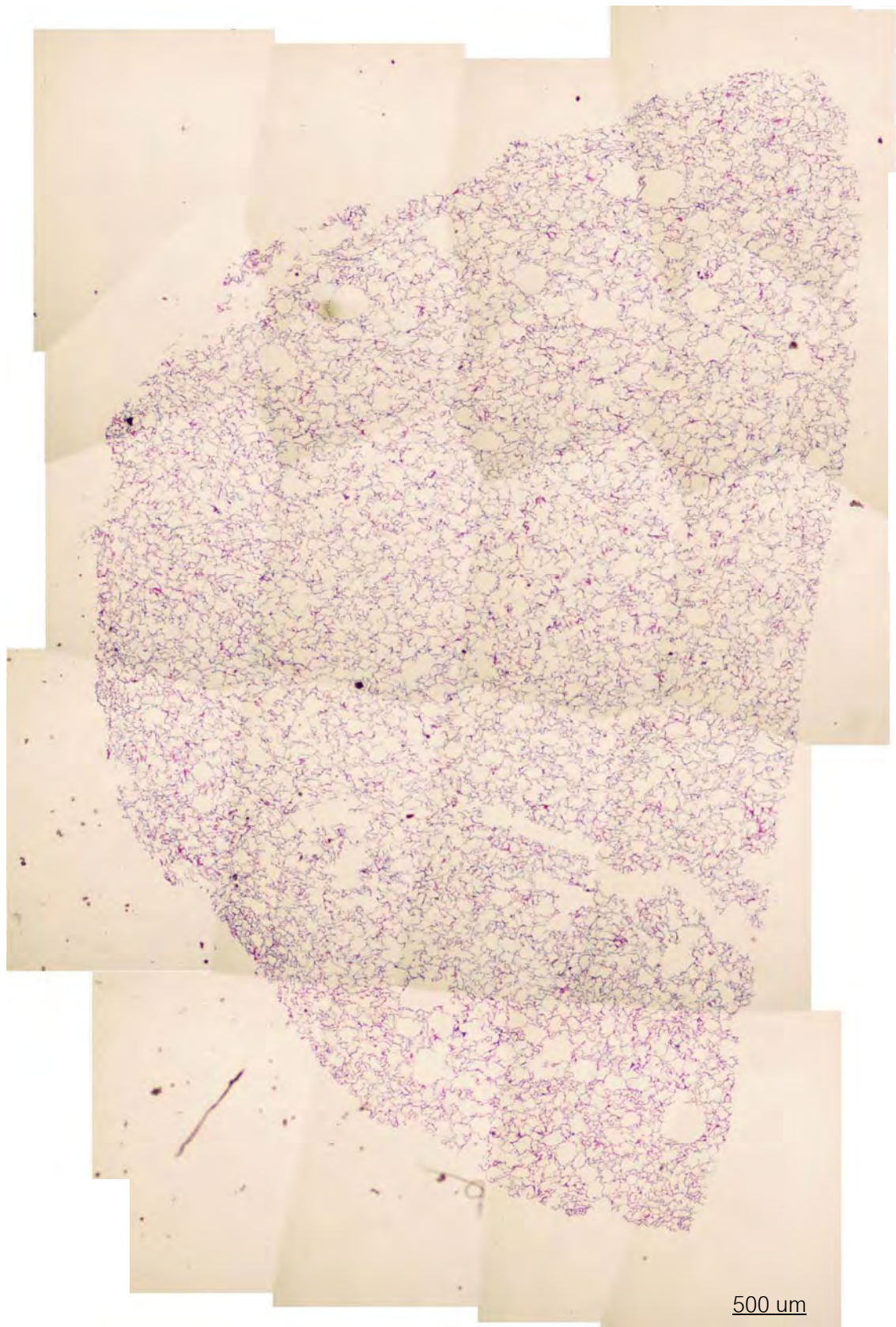
ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ยังคงเหลือชิ้นโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ พิจารณาพังผืดที่ห่อหุ้มบริเวณที่เคยฝังโครงเลี้ยงเซลล์ Gel ไว้ และที่โครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่เหลืออยู่ ซึ่งแสดงถึงการมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ทำให้มีเซลล์ที่มีหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมเข้ามากำจัดหรือย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์หมดก่อนเวลา 4 สัปดาห์

เมื่อทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคการย้อมสีแบบ H&E พิจารณา พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่สัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 4.25, 4.26) เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการนำไปฝังใต้ผิวหนังของหนู (รูปที่ 4.24) เซลล์ไฟโบรบลาสสามารถเข้ามาภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างทั่วถึง มีเส้นเลือดงอกใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงโครงเลี้ยงเซลล์และมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่ (สีชมพูอ่อน) ส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มน้อยลง (สีชมพูเข้ม) เนื่องจากเกิดการย่อยสลาย (รูปที่ 4.27) ส่วนการย้อมสีแบบ Von Kossa ซึ่งจะติดสีน้ำตาลบริเวณที่เป็นแคลเซียมพบว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ยังคงอยู่ทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ แต่ยังไม่มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่ (รูปที่ 4.29) เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการนำไปฝังใต้ผิวหนังของหนู (รูปที่ 4.28)

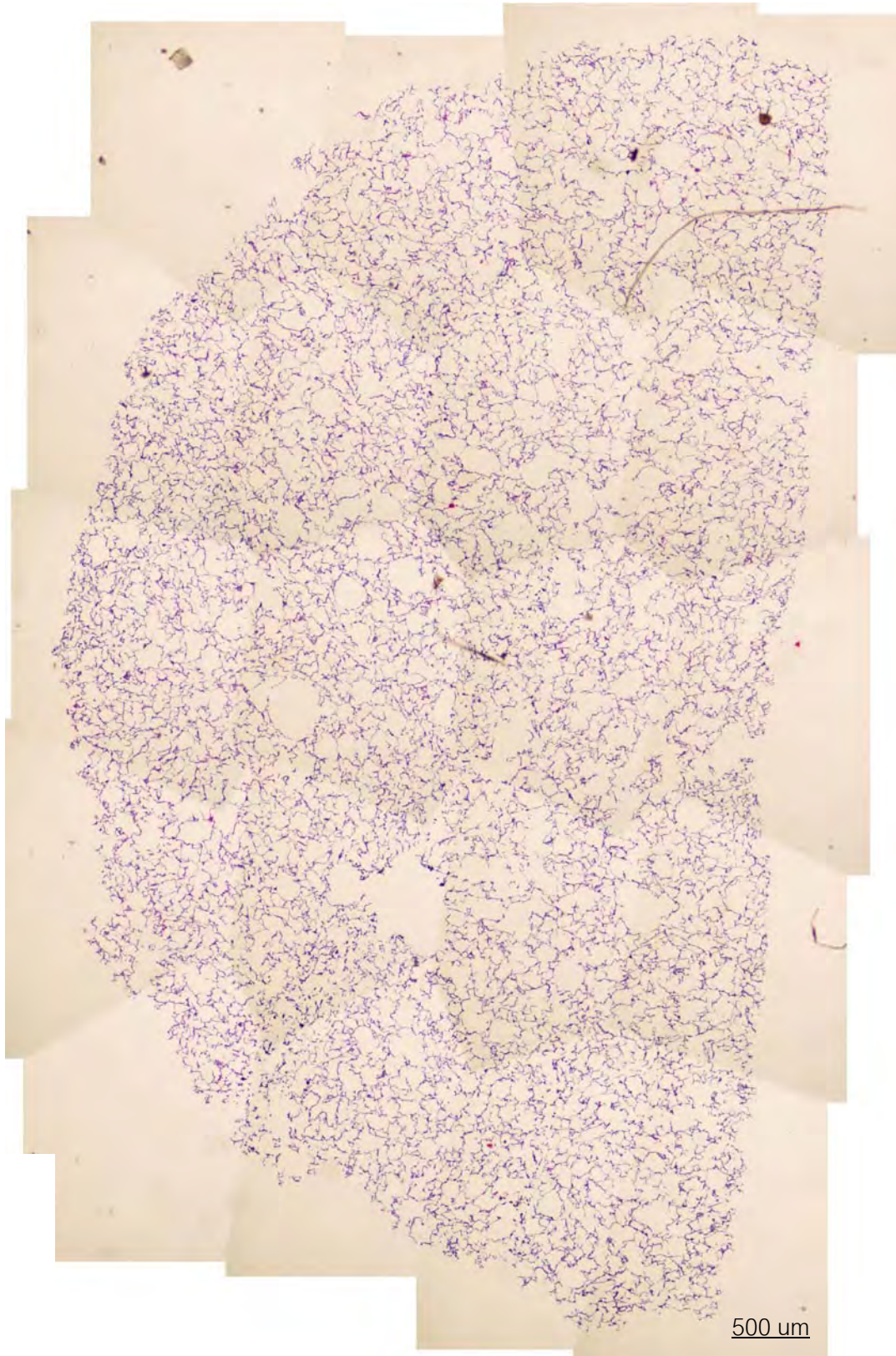
จากการตรวจสอบเนื้อเยื่อนี้แสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่โครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีสมบัติการเข้ากันได้กับเซลล์ภายในร่างกายได้ ไม่มีการอักเสบ มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนและมีอัตราการย่อยสลายช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel



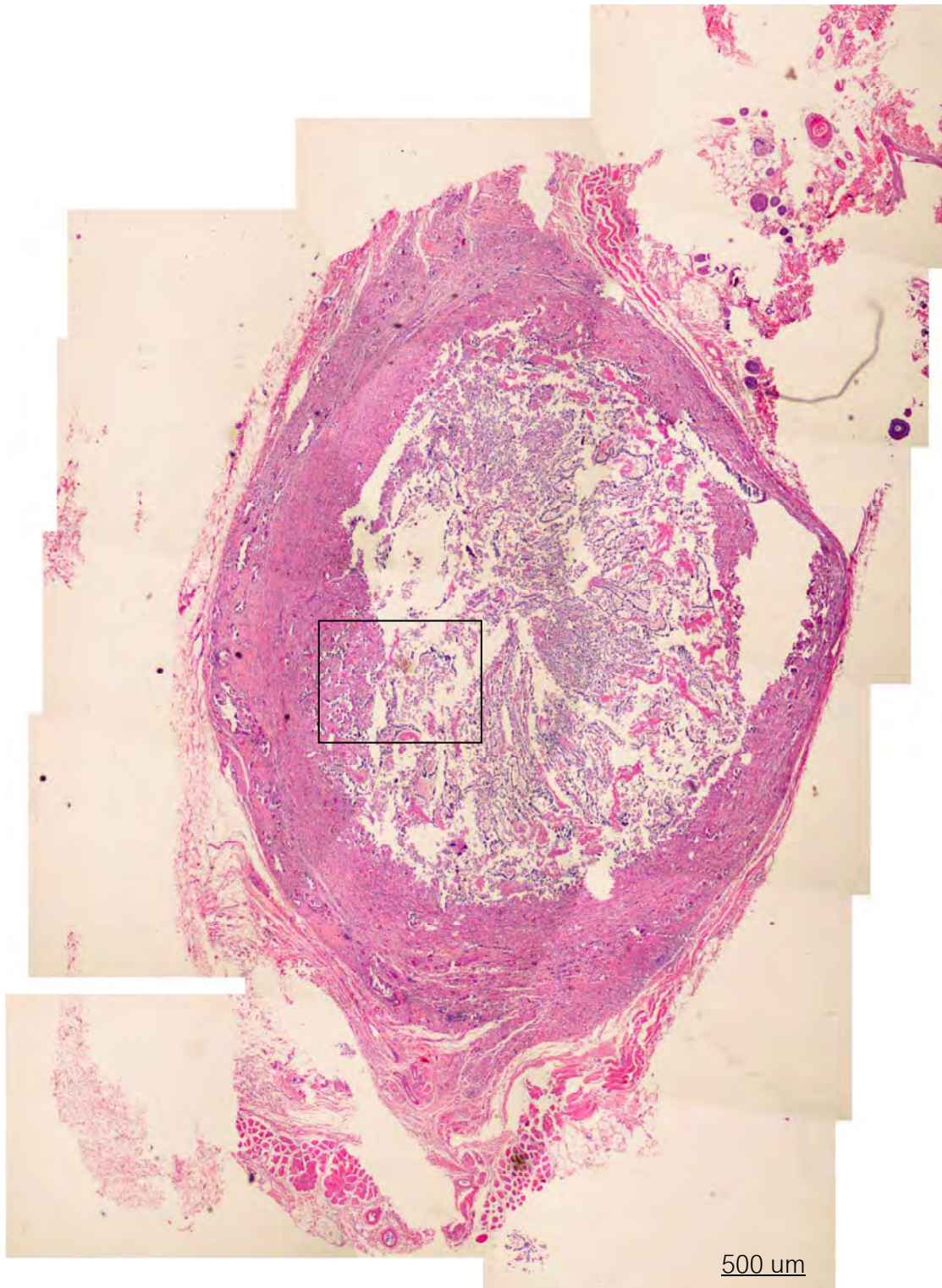
รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Gel/HA) หลังจากฝังได้
 แผลหลัง Wistar rat อายุ 8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์



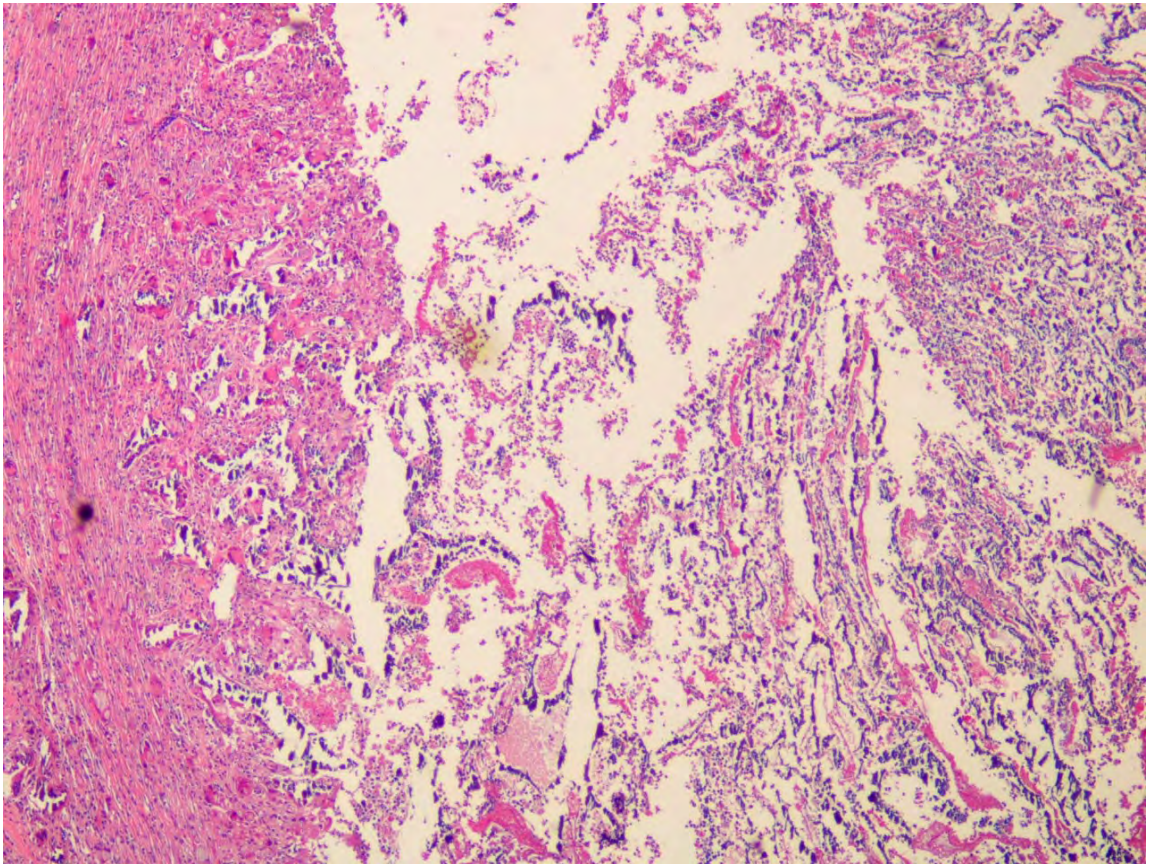
รูปที่ 4.23 โครงข่ายเซลล์เกลตาตินที่ยังไม่ได้ฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E



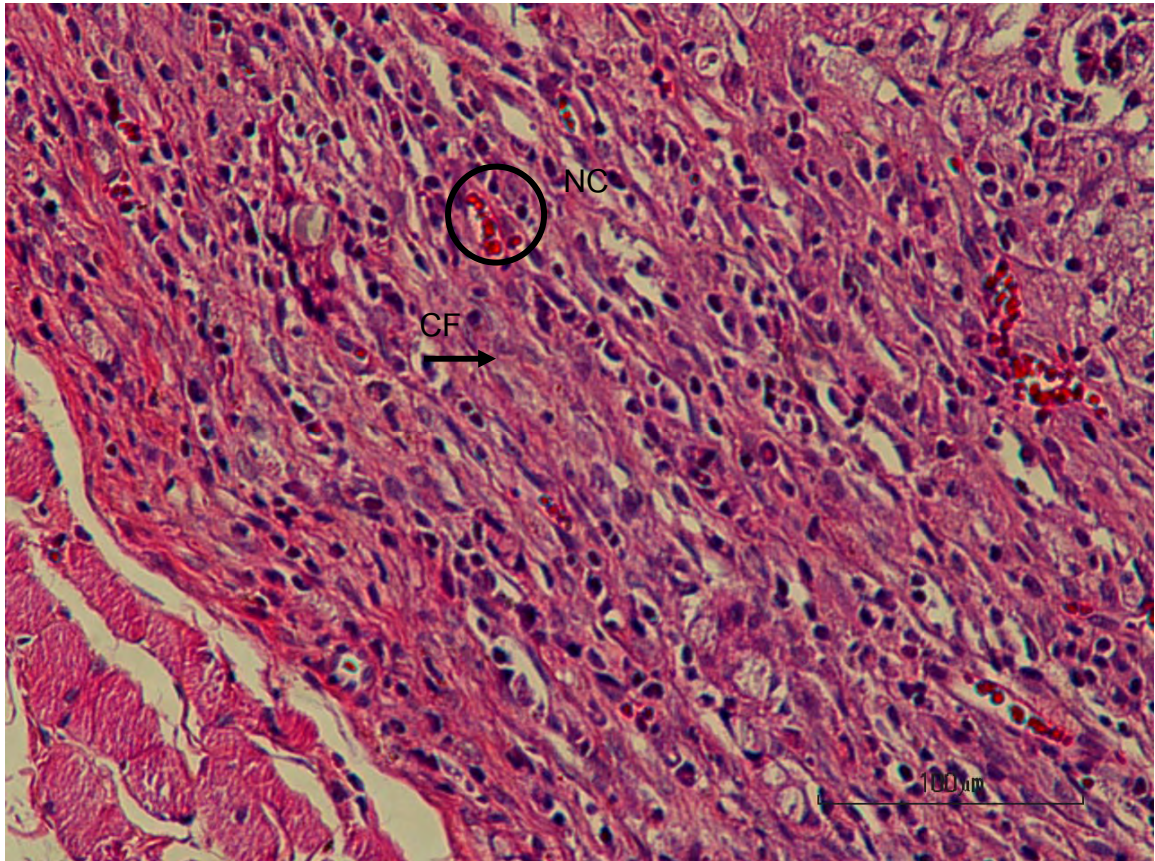
รูปที่ 4.24 โครงข่ายเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ยังไม่ได้ฝังได้ฉิวหนังบนหลังหนู โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E



รูปที่ 4.25 โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E ส่วนที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงภาพกำลังขยายสูงในรูปที่ 4.26



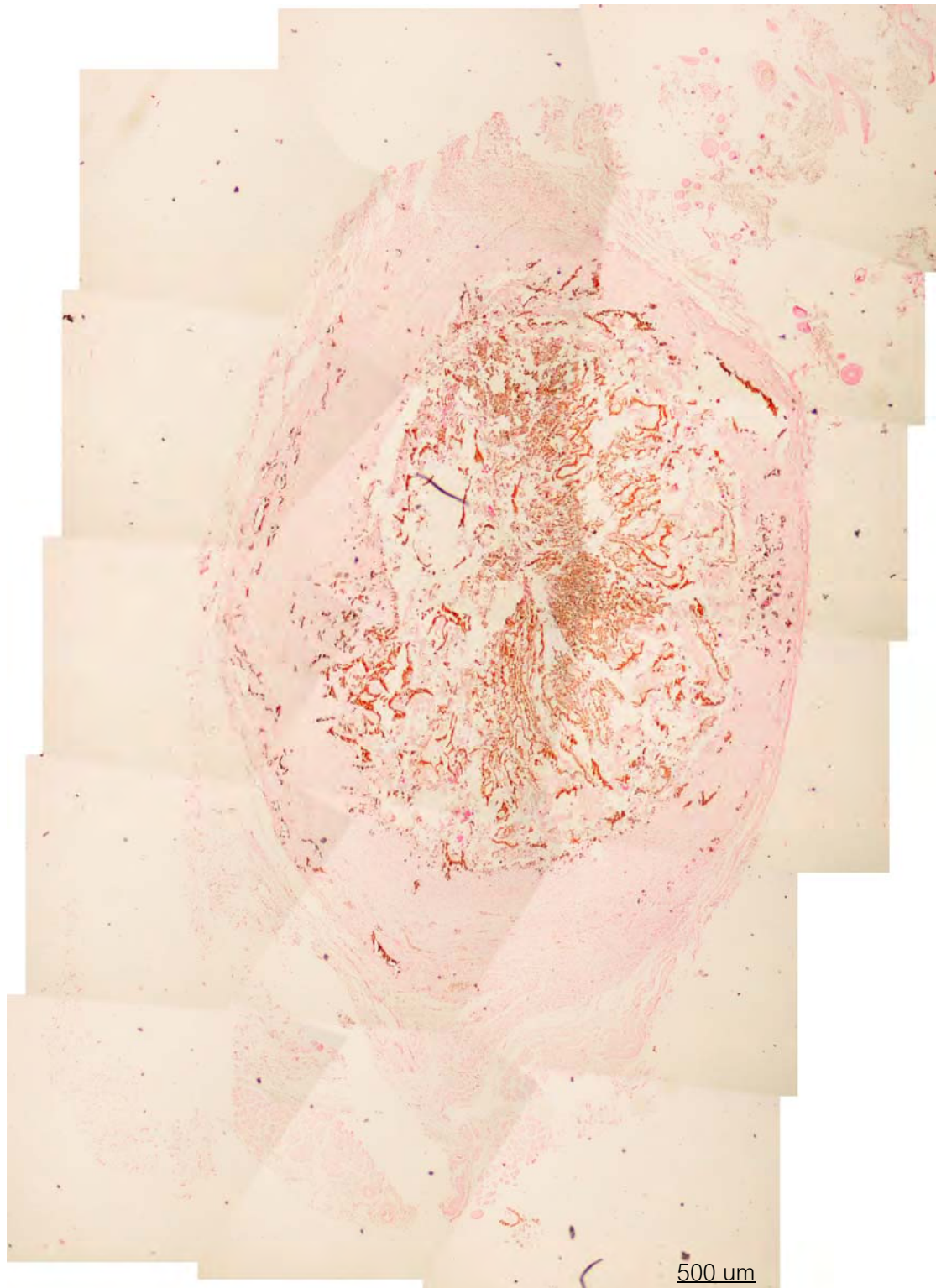
รูปที่ 4.26 โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังได้ผนังบนหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพจากส่วนที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมรูปที่ 4.25)



รูปที่ 4.27 โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค H&E กำลังขยาย 100 เท่า (โดย NC คือ เส้นเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ และ CF คือ คอลลาเจนที่สร้างขึ้น)



รูปที่ 4.28 โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ยังไม่ได้ฝังได้ผิวหนังบนหลังหนู โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค Von Kossa



รูปที่ 4.29 โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการตัดตามขวางและย้อมสีด้วยเทคนิค Von Kossa

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบการการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิด ในโครงเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด คือ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินชนิด B (Gel) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินชนิด B ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ อัตราส่วน 30/70 โดยน้ำหนัก (Gel/HA) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization) ใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 0.01 โดยน้ำหนักเพื่อการเชื่อมขวาง และใช้คอลโรฟอร์มเป็นสารทำให้คงรูป ตามด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-drying) และทำการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของรูพรุนพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel และโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีขนาดของรูพรุนประมาณ 120 ไมโครเมตร และความพรุนร้อยละ 50-60 ซึ่งขนาดของรูพรุนและความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้อาจยังน้อยเกินไป ต้องมีการปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความพรุนมากขึ้น เมื่อทดสอบสมบัติเชิงกลโดยวัดค่าความทนแรงกดที่สภาวะแห้ง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA มีค่าความทนแรงกดสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel ผลการทดสอบสมบัติการทางชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู Wistar (MSC) พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารปกติ โครงเลี้ยง Gel สามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่า 1.25 เท่า แต่โครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA สามารถทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่าโดยกิจกรรมของเอนไซม์ ALP สูงกว่า 1.33 เท่า และปริมาณแคลเซียมมากกว่า 1.29 เท่า และในอาหาร Osteogenic medium (OM) โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้

การเปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์โดยใช้สภาวะแบบสถิตย์ (Static) และการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) บนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในอาหารปกติ พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในระบบที่เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เนื่องจากเวลาที่เซลล์แบ่งตัวเป็น 2 เท่า (Population doubling time, PDT) น้อยกว่า 1.3 เท่าในระบบที่เลี้ยงในสภาวะแบบสถิตย์ และมีการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งพบได้จากปริมาณของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) และปริมาณของแคลเซียมที่เซลล์สร้างขึ้น อัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส (Ca:P) ที่ได้จากการวัดโดยใช้ Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) มีค่าเท่ากับ 1.61 ซึ่งใกล้เคียงกับกระดูกของมนุษย์

ผลของการเพาะเซลล์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยให้เซลล์แขวนลอยไหลผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด พบว่าที่ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยต่างกันมีไม่ผลต่อร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ แต่ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่า 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 2×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง มีผลไม่แตกต่างกันหากใช้เซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพได้เพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเซลล์ โดยเซลล์สามารถกระจายตัวทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ และเพาะเซลล์จากเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดี

โครงเลี้ยงเซลล์สองชนิดนำไปฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนูที่เวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ Gel มีการย่อยสลายไปหมด แต่ยังคงพบโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค H&E และ Von Kossa พบว่ามีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่ทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ และมีเส้นเลือดเกิดขึ้นใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA แสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถเข้ากันได้กับสัตว์ทดลองได้ดี โดยไม่เกิดการอักเสบรุนแรงผิดปกติ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงวิธีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องตีฟอง (foaming) และแช่แข็งที่อุณหภูมิ ต่ำลงเพื่อให้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดของรูพรุน และความพรุนสูงขึ้นตามที่ต้องการ
2. ใช้สารประกอบอนินทรีย์ตัวอื่นเข้ามาช่วยในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย เช่น β -tricalcium phosphate (β -TCP) ซึ่งสารอนินทรีย์ในกระดูกประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ และ β -TCP เป็นหลัก นอกจากนี้ยังช่วยการชักนำให้เซลล์เปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูก
3. ใช้โปรตีนบางชนิด เช่น Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) มาเติมในโครงเลี้ยงเซลล์ และทดสอบการปลดปล่อยเพื่อการชักนำให้เกิดกระดูกได้ดีขึ้น
4. มีการทดสอบอัตราการไหลของอาหารในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพว่ามีผลต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกหรือไม่
5. ทดสอบสัญญาณตัวอื่นๆ ของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกด้วย เช่น Osteocalcin ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก จะแสดงให้เห็นในสัปดาห์ที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์
6. มีการเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพก่อนเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต และนำไปฝังในสัตว์ทดลอง เพื่อดูความสามารถในการชักนำให้เกิดกระดูกได้เร็วขึ้นหรือไม่ในสัตว์ทดลอง

รายการอ้างอิง

- Aydin, H. Microporous scaffolds form poly(lactide-co-caprolactone) composites with hydroxyapatite and tricalcium phosphates using supercritical CO₂ for bone tissue engineering. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 19 (2004): 383-394.
- Belmonte, M.M., Lucarini, G., Virgili, L., Biagini, G., Detomaso, L., Favia, P., D' Agostino, R., Gristina, R., Gigante, A. and Bevilacqua, C. Mesenchymal stem cells on plasma-deposited acrylic acid coatings: An in vitro investigation to improve biomaterial performance in bone reconstruction. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 20 (2005): 343-360.
- Bryan, H.D. and Tortora, G.J. Principles of anatomy and physiology New York: Wiley, 2005.
- Buckley, C. and O'Kelly, K. Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering. Dublin: Centre for bioengineering, Department of mechanical and manufacturing engineering, Trinity College, Ireland. 2004.
- Chang, B.S., Lee, C.K., Hong, K.S., Youn, H.J., Ryu, H.S., Chung, S.S. and Park, K.W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. Biomaterials 21 (2002): 1291-1298.
- Chang, M.C., Ko, C.C. and Douglas, W.H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. Chemistry Letters 34 (2005): 1110.
- Chu, T.M.G., Orton, D.G., Hollister, S.J., Feinberg, S.E. and Halloran, J.W. Mechanical and in vivo performance of Hydroxyapatite implants with controlled architectures. Biomaterials 23 (2002): 1283-1293.
- Collins, P.C., Miller, W.M. and Papoutsakis, E.T. Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications. Biotechnol. Bioeng. 59 (1998), 534–543.
- Collins, P.C., Nielsen, L.K., Patel, S.D., Papoutsakis, E.T. and Miller, W.M. Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. Biotechnol. Prog. 14 (1998): 466–472.

- Curran, J.M., Chen, R. and Hunt, J.A. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. Biomaterials 27 (2006): 4783–4793.
- Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8 (2006): 315-317.
- Donzelli, E., Salvade, A., Mimo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M. and Tredici, G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. Archives of oral biology 52 (2007): 64-73.
- Duthie, R.B., Bentley, G. Mercer's Orthopaedic Surgery. 8th ed. London: Butler and Tanner, 27, 1983.
- Esmaili, J. Aqueous Based Hydrogel/Apatite Nanocomposite Scaffolds for Guided Bone Regeneration. Department of Chemical Eng. South Carolina University. 2005.
- Eugene, W.W. Prosthetic articles and methods for producing same, US Patent 5487933 Issued on January 30, 1996 Available at URL <http://www.patentstorm.us/patents/5487933-fulltext.html>
- Freed, L.E., Langer, R., Martin, I., Pellis, N.R., and Vunjak-Novakovic G., Tissue engineering of cartilage in space. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (1997): 13885–13890.
- Freed, L.E., Hollander, A.P., Martin, I., Barry, J.R., Langer, R. and Vunjak-Novakovic G. Chondrogenesis in a cell–polymer–bioreactor system. Exp Cell Res. 240 (1998): 58–65.
- Guang, C., Ping, Z., Na, M., Xin C., Zheng, Z.S., Luanfeng, P. and Chungeng W. Silk fibroin modified porous poly(ϵ -caprolactone) scaffold for human fibroblast culture in vitro. Journal of materials science. Material in medical (2004): 671-677.
- Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. . Biomaterials 21 (2000): 2529-2543

- Hofmann, S., Hagenmuller, H., Koch, A.M., Muller, R., Novakovic, G.V., Kaplan, D.L., Merkle, H.P. and Meinel, L. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. Biomaterials 28 (2007): 1152-1162.
- Holmbom, J, Sodergard, A, Ekholm E, *et al.* Long-term evaluation of porous poly(epsilon-caprolactone-co-L-lactide) as a bone-filling material. J Biomed Mater Res A. 75(2) (2005): 308-315.
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H. and Tabata, Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. Biomaterials 27 (2006): 5089–5098.
- Hwang, Y.S., Cho, J., Tay, F., Heng, J.Y.Y., Ho, R., Kazarian, S.G., Williams, D.R., Boccaccini, A.R., Polak, J.M. and Mantalaris, A. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. Biomaterials 30 (2009): 499-507.
- Ishaug, S.L., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G., Three dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. Biomaterials 15 (1998): 1405-1412.
- Isama, K. and Tsuchiya. K. Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. Biomaterials 24 (2003): 3303-3309.
- Katja, H. and Marieb, E.N. Human Anatomy & Physiology (7th Edition), San Francisco: Benjamin Cummings. 2006.
- Kim, H.W., Kim, H.E. and Salih, V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. Biomaterials 26 (2005): 5221–5230.
- Kim, H.J.; Kim, U.J.; Novakovic, G.V.; Min, B.H.; and Kaplan, D.L. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. Biomaterials 26 (2005): 4442-4452.
- Koller, M.R., Emerson, S.G. and Palsson, B.O. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. Blood 82 (1993): 378–384.

- Kong X.D. , Cui F.Z. , Wang X.M. ,Zhang M. and Zhang W. Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals. Journal of crystal growth (1994): 197-202.
- Langer, R. Tissue engineering. Molecular Therapy 1 (2000): 12-15.
- Lee, S.B., Jeon, H.W., Lee, Y.W., Lee, Y.M., Song, K.W., Park, M.H., Nam, Y.S. and Ahn, H.C. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6)- β -glucan. Biomaterials 24 (2003): 2503-2511.
- Lennon, D.P., et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. Experimental Cell Research 219 (1995): 211-222.
- Lien, S.M., Li, W.T. and Huang, T.J. Genipin-Crosslinked Gelatin Scaffolds for Articular Cartilage Tissue Engineering with a Novel Crosslinking Method. Mater. Sci. & Eng. C. (2008): 36-43.
- Li W., Nemoto, R. and Senna, M. Change in microstructure and physico-chemical properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite with varying silk fibroin content. Journal of the European Ceramic Society (2004): 2707-2715.
- Lucas, P.A. and Grande, D.A. Mesenchymal stem cells for cartilage repair, US Patent 6214369 Issued on April 10, 2001 Available at URL <http://www.patentstorm.us/patents/6214369-description.html>
- Marolt, D., Augst, A., Freed, L. E., Vepari, C., Fajardo, R., Patel, N., Gray, M., Farley M., Kaplan, D., and Vunjak-Novakovic, G., Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. Biomaterials 27 (2006): 6138–6149.
- Meissner, P., Schroder, B., Herfurth, C. and Biselli, M. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. Cytotechnology 30 (1999): 227–234.
- Moorehead, W.R.; and Biggs, H.G. 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. Clinical Chemistry 20 (1974):1458.

- Mygind, T., Stiehler, M., Baatrup A., Li H., Zou X., Flyvbjerg, A., Kassem, M., and Bunker, C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. Biomaterials 28 (2007): 1036–1047.
- Netter, Frank H. Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders. Summit, New Jersey: Ciba-Geigy Corporation. 1987.
- Oostra and Jaap. Bioreactor, EU Patent 1359214 Issued on May 11, 2003 Available at URL <http://www.freepatentsonline.com/EP1359214.html>
- Palsson, B. Principles and applications in engineering series: Tissue engineering. CRC Press LLC, 2003.
- Park, P.C., Selvarajah, S., Bayani, J., Zielenska, M. and Squire, J. A. Review: Stem cell enrichment approaches. Seminars in Cancer Biology 17 (2007): 257–264.
- Paul, K.C. and Xuanyang L. Biomaterials fabrication and processing handbook. Faylor&Fracis Group. USA. NW. 2008.
- Pei, M., Solchaga, L.A., Seidel, J., Zeng. L., Vunjak-Novakovic G., Caplan A. I., and Freed L.E. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds. FASEB J 16 (2002): 1691–1694.
- Peter, X.M. Scaffolds for tissue fabrication. Materialstoday (2004): 30-40.
- Pörtner, R., Nagel-Heyer S., Goepfert, C., Adamietz, P., and Meenen, N.M. Bioreactor Design for Tissue Engineering. J. Biosci. Bioeng. 100 (2005): 235-245.
- Sajc, L., Grubisic, D., Vunjak-Novakovic, G., Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochemical Engineering Journal 4 (2002): 89–99.
- Sang, B.L., Yong, H.K., Moo, S.C., Seung, H.H. and Young, M.L. Novel porous gelatin scaffolds by overrun/particle leaching process for tissue engineering applications. Biomaterials 26 (2005): 1961-1968.
- Sang, B.L., Hyun, W.J., Young, W.L., Young, M.L., Kang, W.S., Moon, H.P., Young, S.N. and Hee C.A. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6)- β -glucan. Biomaterials 24 (2003): 2503–2511.
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., and Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. Biomaterials 26 (2005): 3587–3596.

- Teng, M. Bioreactor for cell culture, US 6943008 Issued on September 13, 2005
Available at URL <http://www.patentstorm.us/patents/6943008-fulltext.html>
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., and Xub, Y.X. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. Biomaterials 24 (2003): 3213–3220.
- Xuenong, Z., Li H. and Bungler, C. Bone Tissue Engineering by Ex Vivo Stem Cells Ongoing into Three-dimensional Trabecular Metal. US Patent 20080033548
Issued on February 7, 2008 Available at URL
<http://www.freepatentsonline.com/20080033548.html>
- U.S. Patent and Trademark Office. Resorbable polymer composition, implant and method of making implant. Available at URL
http://www.pharmcast.com/Patents100/Yr2005/Aug2005/080905/6926903_Implant080905.htm. Access date : Oct 30, 2006.
- Zhang, Z.Y., Teoh, S.H., Chong, W.S., Foo T.T., Chng, Y.C., Choolani, M. and Chan J. A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. Biomaterials 30 (2009): 2694-2704.

ภาคผนวก

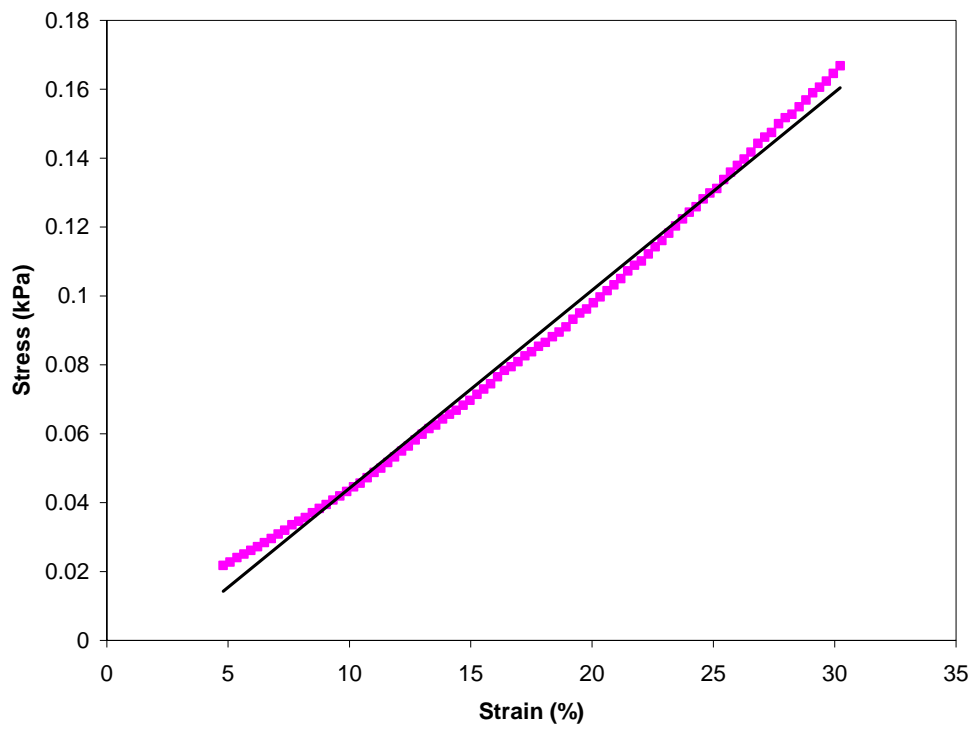
ภาคผนวก ก การวัดความทนต่อแรงกด

การทดสอบความทนทานต่อแรงดึงโดยใช้เครื่อง Universal Testing Machine ตามมาตรฐาน ASTM D-638 โดยใช้อัตราการกด 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที เพื่อดำเนินการหาค่า young modulus โดยหาได้จากค่าความชันระหว่างกราฟของความเค้น (compression stress) และความเครียด (compression strain) ที่ initial stress-strain ในช่วง 5-30% แรกของแรงกด แบบแห้งสามารถใช้โครงเลี้ยงเซลล์นำทดสอบได้เลย ส่วนในแบบเปียกนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในสารละลาย PBS ก่อน 3 ชั่วโมง และซับน้ำส่วนเกินออก แล้วจึงนำไปทดสอบ

การหาค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถหาได้จากค่าความชัน (Compressive modulus) ที่ constant tensile deformation rate 0.5 มิลลิเมตร/นาที ในสภาพแห้งที่ 25 องศาเซลเซียส จากสูตร

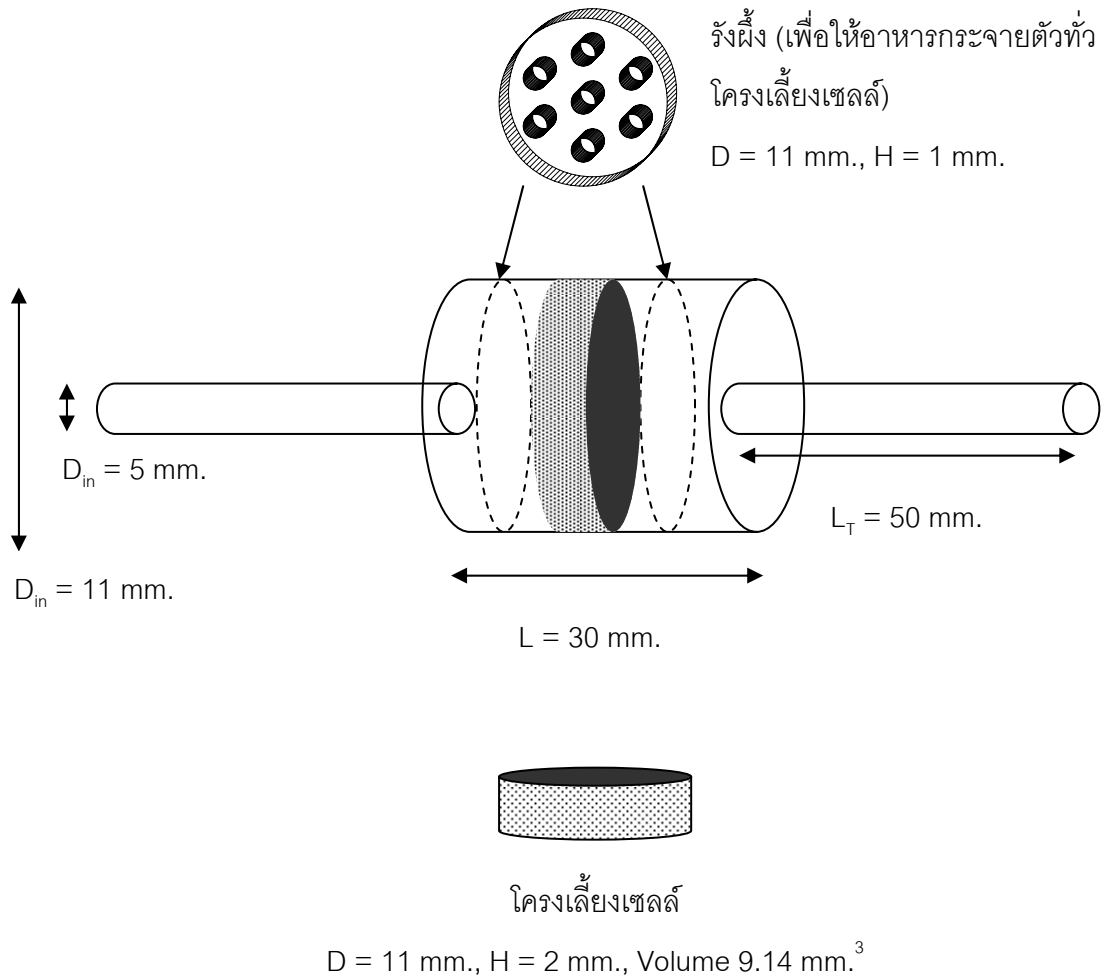
$$\text{Compressive modulus} = \frac{\text{stress}(kPa)}{\text{strain}(\%)} \times 100$$

การวิเคราะห์ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ทำโดยการหาค่าความชัน (Compressive modulus) ในตอนเริ่มต้นจากกราฟที่ถูก plot ระหว่าง strain (%) และ stress (kPa) โดยเลือกค่า strain (%) ที่ 5 ถึง 30 จากข้อมูล ซึ่งจะได้ค่า Young Modulus = 521 kPa เป็นค่าแสดงความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ Gel/HA ที่สภาวะแห้ง แสดงดังรูปที่ ก.1



รูปที่ ก.1 กราฟแสดงค่า Young Modulus ซึ่งหาได้จากค่าความชันระหว่าง stress กับ strain ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ Gel/HA ที่สภาวะแห้ง

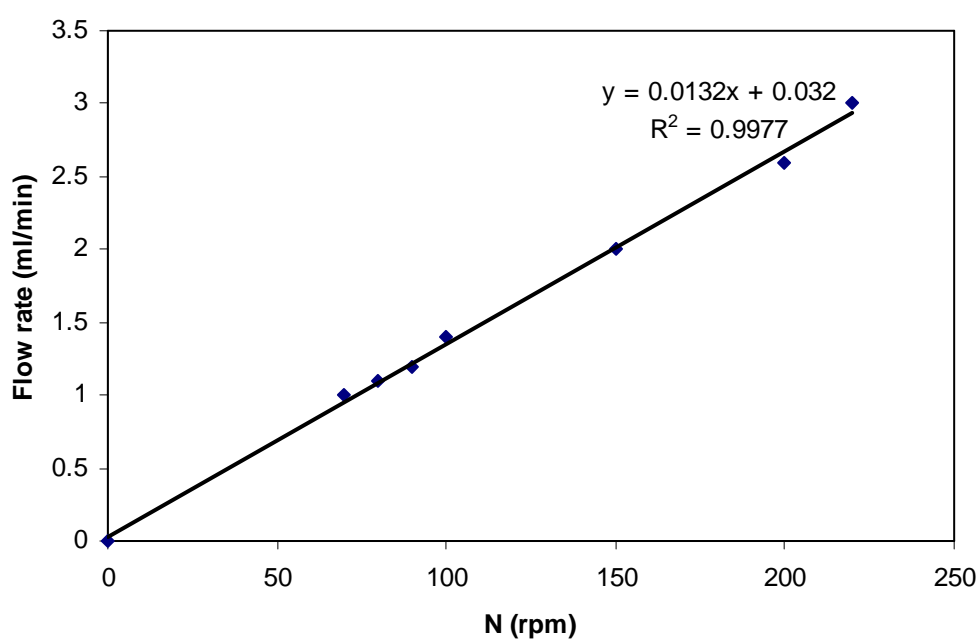
ภาคผนวก ข
การออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ



รูปที่ ข.1 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ภาคผนวก ค
อัตราการไหลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

การทดลองเปลี่ยนความเร็วรอบการหมุนของปั๊ม Peristaltic Pump Pump (MCP V5.21 15M 726B-0773, Watson-Marlow, USA) และวัดปริมาตรของน้ำและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไหลผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ในเวลา 1 นาที พบว่าไม่ว่าจะใช้น้ำหรืออาหารอัตราไหลจะเท่ากัน เมื่อใช้ความเร็วรอบของปั๊มเท่ากัน ทดสอบได้กราฟดังนี้



รูปที่ ค.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเร็วรอบในการหมุนของปั๊มต่ออัตราการไหล

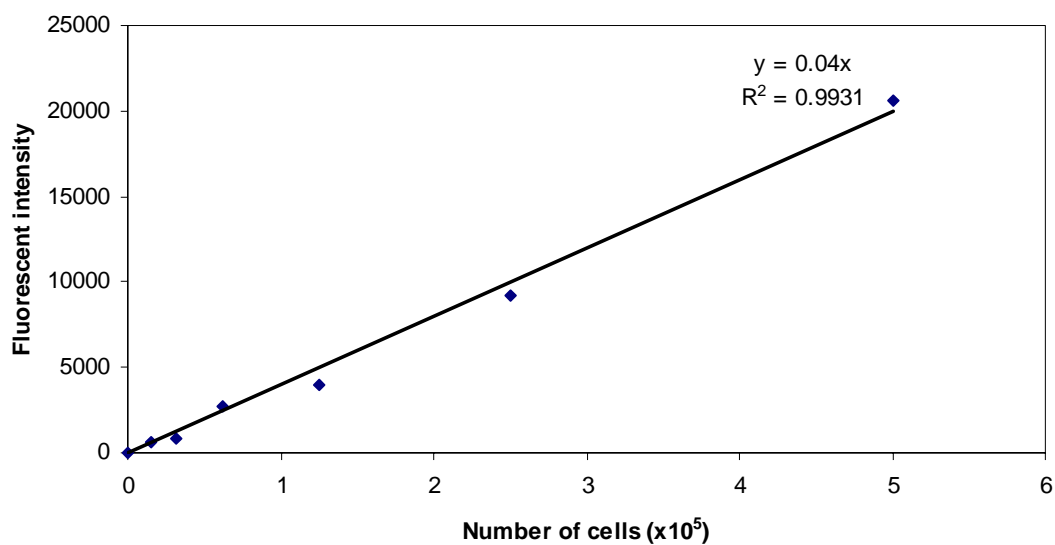
ภาคผนวก ง
การวัดจำนวนเซลล์โดยวิธี DNA

สารเคมี

- A. SSC solution (20X)
17.999 g NaCl + 8.823 g Na₃Citrate. 2H₂O upto 100 ml
- B. SDS lysis buffer
SDS 20 mg + (5ml of 20X SSC (A.)) + 95 ml DDW)
- C. Hoechst 33258 solution = Bisbenzimidazole H33258 Fluorochrome Trihydrochloride
DMSO solution (1mg/ml), C₂₅H₂₄N₆O₃.3HCl, FW= 533.88), store at -20 °C [Hoechst
(20 µl) + DDW (19 ml) + SSC (1 ml)]
- D. DDW

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้เซลล์แขวนลอยในอาหาร 5x10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน vial แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วเติมสาร B. 1 มิลลิลิตรลงใน vial ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เจือจางเซลล์มาตรฐานโดยใช้สาร B. ให้ เป็นความเข้มข้น
5x10⁵ → 2.5x10⁵ → 1.25x10⁵ → 6.25x10⁴ → 3.125x10⁴ → 1.5625x10⁴ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
2. สำหรับตัวอย่างเติมสาร B. 1 มิลลิลิตรลงในโครงเลี้ยงเซลล์และตัดให้เป็นชิ้นละเยียด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมา ก่อนการวัดนำมาละลายที่ 37 องศาเซลเซียส
3. ใช้สาร B. เป็น Blank และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเซลล์เป็นตัวควบคุม
4. ปิเปตสารจากข้อ 1-3 มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well black plate เติมสีย้อม Hoechst ลงไป 100 ไมโครลิตร เพื่อย้อม DNA แล้วนำไปวัด fluorescence intensity ที่ 355 นาโนเมตร (Excitation) and 460 นาโนเมตร (Emission)



รูปที่ ๑.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์โดยวิธี DNA

ตัวอย่างการคำนวณ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ Gel/HA เลี้ยงที่สามารถสะสมอยู่ในอาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน นำตัวอย่างไปวัดค่า Fluorescent intensity ได้ 39,285

จำนวนเซลล์ = (Fluorescent intensity ของตัวอย่าง-ตัวควบคุม)/ความชัน

∴ จำนวนเซลล์ = $(39,285 - 2,314) / 0.04 = 924,275$ เซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ Gel/HA

ภาคผนวก จ

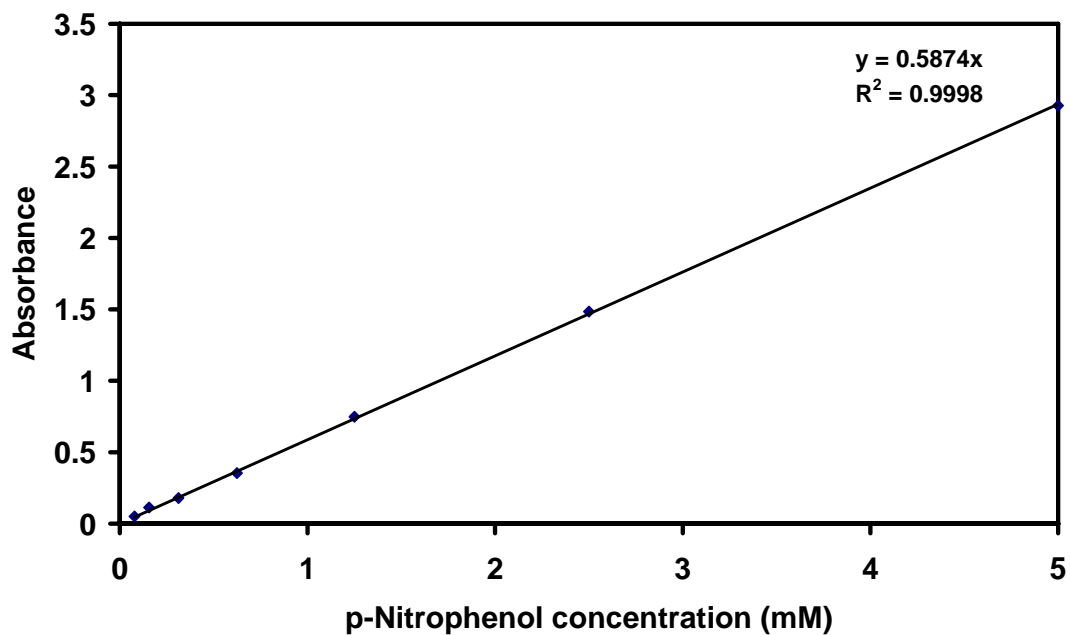
การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)

สารเคมี

- A. p-Nitrophenol standard solution (10mM, Sigma, store at 4°C)
- B. p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (pNPP, Sigma, store at -20°C)
- C. 0.02 N NaOH
- D. SDS lysis buffer

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ p-nitrophenol เจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น
10 → 5 → 2.5 → 1.25 → 0.625 → 0.3125 → 0.15625 → 0.078125 mM
2. สำหรับตัวอย่างเติมสาร D. 1 มิลลิลิตรลงในโครงเลี้ยงเซลล์และตัดให้เป็นชิ้นละเยียด บ่ม
ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
3. ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเซลล์เป็นตัวควบคุม
4. ปิเปตสารในข้อ 1-3 มา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate แล้วเติมสาร B. 100
ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม C.
80 ไมโครลิตร เอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) จะเปลี่ยน pNPP ให้เป็น p-
Nitrophenol ได้สารสีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร



รูปที่ ๑.1 กราฟมาตรฐานของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)

ตัวอย่างการคำนวณ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ Gel/HA เลี้ยงที่สภาวะสถิตยในอาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรได้ 0.137

กิจกรรมของเอนไซม์ ALP = (OD ของตัวอย่าง-ตัวควบคุม)/ความชัน

∴ กิจกรรมของเอนไซม์ ALP = (0.137-0.002)/0.5874 = 0.3 mM/15 mins

จำนวนเซลล์ = 924,275 เซลล์

∴ กิจกรรมของเอนไซม์ ALP ต่อจำนวนเซลล์ = 0.135/0.5874/924,275

= 24.8×10^{-7} mM/15 mins/cell

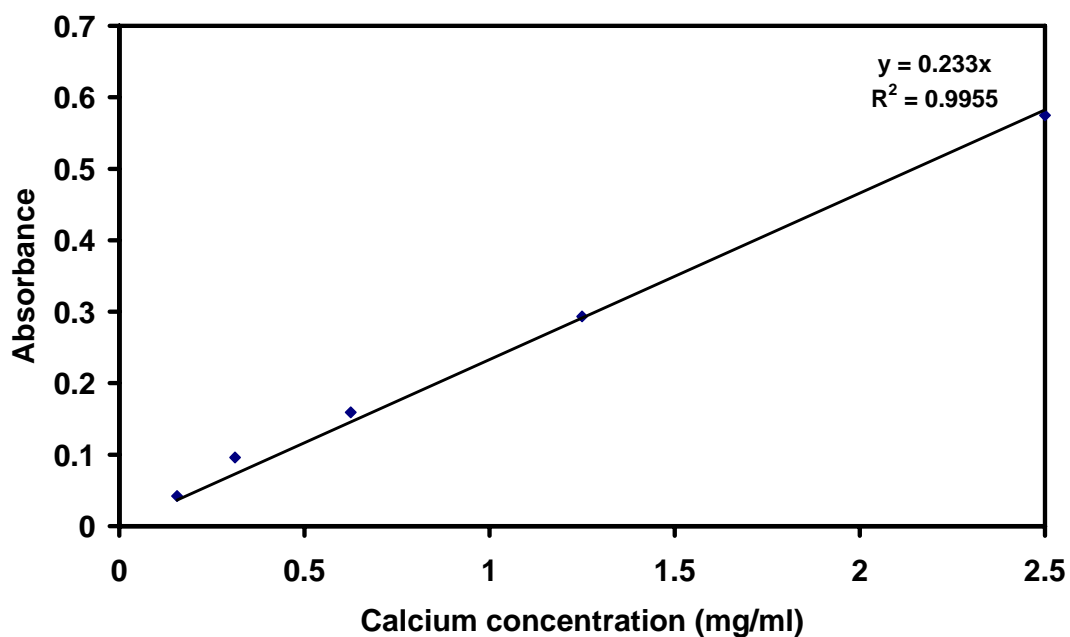
ภาคผนวก จ
การวัดปริมาณแคลเซียม

สารเคมี

- A. SDS lysis buffer
- B. 1 M HCl
- C. CaCO₃
- D. O-cresolphthalein complex substrate (OCPC, MW 636.62) (2 mg in 1M HCl 5 ml)
- E. Ethanolamine buffer (0.88 mol/l, pH 11)

วิธีการ

1. เตรียม CaCO₃ มาตรฐานโดยละลาย C. 5 กรัม ใน B.100 มิลลิลิตร ได้เป็น CaCO₃ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (แคลเซียม 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
2. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารจากข้อ 1. นำมาเจือจางในสาร B. ให้เป็น 20 → 10 → 5 → 2.5 → 1.25 → 0.625 → 0.3125 → 0.15625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สำหรับตัวอย่างเติมสาร A. 1 มิลลิลิตรลงในโครงเลี้ยงเซลล์และตัดให้เป็นชิ้นละเอียด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิดมา 100 ไมโครลิตรผสมกับสาร B. 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง
4. ใช้สาร B. เป็น Blank และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเซลล์เป็นตัวควบคุม
5. เปิดสารในข้อ 2-4 มา 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน 48-well plates แล้วเติมสาร E. 1 มิลลิลิตร และสาร D. 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน แคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สารสีม่วง จากนั้นเปิด 300 ไมโครลิตรใส่ใน 96-well plate และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร



รูปที่ ๑.1 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม

ตัวอย่างการคำนวณ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ Gel/HA เลี้ยงที่สภาวะสถิตยในอาหาร OM เป็นเวลา 28 วัน นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรได้ 0.042

$$\text{ปริมาณแคลเซียม} = (\text{OD ของตัวอย่าง} - \text{ตัวควบคุม}) / \text{ความชัน}$$

$$\therefore \text{ปริมาณแคลเซียม} = (0.042 - 0.001) / 0.233 = 0.3 \text{ มิลลิกรัม}$$

$$\text{จำนวนเซลล์} = 924,275 \text{ เซลล์}$$

$$\begin{aligned} \therefore \text{ปริมาณแคลเซียมต่อจำนวนเซลล์} &= 0.041 / 0.233 / 924,275 \\ &= 1.9 \times 10^{-7} \text{ มิลลิกรัมต่อเซลล์} \end{aligned}$$

ภาคผนวก จ

การคำนวณอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ทวีคูณ (Population doubling time, PDT)

เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT) คำนวณจาก

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

เมื่อ อัตราการแบ่งตัว (multiplication rate, r) คำนวณจาก

$$\begin{aligned} \text{อัตราการแบ่งตัว } r &= \text{จำนวนชั้นอายุต่อหนึ่งหน่วยเวลา} \\ &= 3.32 (\log N_H - \log N_t) / (t_2 - t_1) \quad (\text{ฐานต่อชั่วโมง}) \end{aligned}$$

โดย N_t เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้น ที่เวลา t_1

N_H คือจำนวนเซลล์ทั้งหมด ที่เวลา t_2

เช่น การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในอาหารปกติโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเลือกเวลาที่อยู่ในช่วง log phase

ที่เวลา 7 วัน มีเซลล์ 10×10^5 เซลล์

ที่เวลา 14 วัน มีเซลล์ 15×10^5 เซลล์

$$\begin{aligned} \text{อัตราการแบ่งตัว } r &= 3.32 [\log (15 \times 10^5) - \log (10 \times 10^5)] / (336 - 240) \\ &= 5.18 \times 10^{-3} \quad \text{ฐานต่อชั่วโมง} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{เวลาแบ่งตัวทวีคูณ PDT} &= 1/r \\ &= 1 / 5.18 \times 10^{-3} \\ &= 192.9 \quad \text{ชั่วโมง} \end{aligned}$$

ภาคผนวก ข จรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง

ตามมาตรฐานการดูแลและใช้สัตว์ทดลองแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การจัดการสภาพแวดล้อมของสถานที่เลี้ยงสัตว์

การจัดการสภาพแวดล้อมของสถานที่เลี้ยงสัตว์ สามารถป้องกันการติดเชื้อ มีการควบคุมอุณหภูมิที่ $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 90\%$ มีการระบายอากาศ แสง และเสียงให้คงที่และเหมาะสมกับความต้องการของสัตว์ทดลอง ไม่สร้างความเครียดให้แก่สัตว์

2. วัสดุอุปกรณ์เลี้ยงสัตว์ทดลอง

กรงหรือคอกเลี้ยงสัตว์

กรงหรือคอกที่ใช้เลี้ยงสัตว์ มีความแข็งแรงมั่นคงเพียงพอที่จะป้องกันสัตว์หลบหนีได้ และถูกต้องตามมาตรฐานสากลที่กำหนดไว้สำหรับชนิด ขนาด และจำนวนสัตว์ ไม่มีส่วนประกอบที่จะทำให้สัตว์บาดเจ็บและทำด้วยวัสดุที่คงทนต่อสารเคมีหรือความร้อนที่ใช้ป้องกันการติดเชื้อ

วัสดุรองนอน

วัสดุที่ใช้รองนอนมีความเหมาะสมกับสัตว์ทดลอง ไม่แหลมคม มีคุณสมบัติที่ซึมซับน้ำแล้วไม่เปื่อยยุ่ย และปลอดจากสารพิษและเชื้อโรค

การให้อาหารสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองได้รับอาหารและน้ำที่สะอาดปราศจากเชื้อโรค สารพิษและสารก่อมะเร็ง ได้รับอาหารและน้ำกินในปริมาณที่เพียงพอตามความต้องการตามระยะเวลา ส่วนประกอบของอาหารจะมีโปรตีน ไขมัน แป้ง วิตามิน แร่ธาตุและกาก อย่างครบถ้วนเหมาะสมกับความต้องการของสัตว์ทดลอง

3. การจัดการ

สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในห้องควบคุมเชื้อที่ภาควิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ การเลี้ยงสัตว์จะเลี้ยงตามระบบการเลี้ยงแบบ Strict hygienic conventional อย่างต่อเนื่องและเข้มงวดในการป้องกันการติดเชื้อ โดยดำเนินการตามระบบดังกล่าวข้างต้นอย่างเคร่งครัด

หน่วยงานเลี้ยงสัตว์ มีสัตวแพทย์หรือนักวิชาการที่มีพื้นฐานความรู้และประสบการณ์ด้านสัตว์ทดลอง และมีพนักงานเลี้ยงสัตว์ที่ผ่านการอบรมการเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ได้มาตรฐาน

หน่วยงานเลี้ยงสัตว์ มีข้อมูลแหล่งที่มาของวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ การป้องกันการติดเชื้อ การควบคุมการตรวจสอบสภาพแวดล้อม และการช่วยให้สัตว์ตายอย่างสงบในกรณีที่จำเป็น เพื่อให้สามารถจัดหาวัสดุอุปกรณ์ดังกล่าวได้อย่างต่อเนื่อง และถูกต้องตามความต้องการ พร้อมทั้งมีอุปกรณ์สำรอง และหน่วยซ่อมบำรุงที่มีประสิทธิภาพ โดยได้รับงบประมาณในการดำเนินการดังกล่าวอย่างเพียงพอและต่อเนื่อง

หน่วยงานเลี้ยงสัตว์ มีการกำจัดซากสัตว์ทดลองด้วยวิธีการเผาเท่านั้น ไม่ใช่วิธีอื่น และมีการกำจัดขยะปฏิกลอย่างถูกต้องและเหมาะสม

4. เทคนิคในการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลอง

ผู้เลี้ยงสัตว์ทดลอง มีการกำหนดแผนงานและวิธีการปฏิบัติต่อสัตว์อย่างถูกต้อง สอดคล้องกับมาตรฐานสากลไว้ในโครงการอย่างชัดเจน

ผู้เลี้ยงสัตว์และพนักงานเลี้ยงสัตว์ มีการปฏิบัติต่อสัตว์ด้วยความเมตตา ไม่ทำให้สัตว์ได้รับความเจ็บปวดหรือเกิดความเครียดในกรณีที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ จะมีการแสดงเหตุผลทางวิชาการที่ชัดเจนว่าไม่มีทางเลือกอื่นแล้ว

ผู้เลี้ยงสัตว์ มีการเรียนรู้เทคนิคพื้นฐานการปฏิบัติต่อสัตว์และมีความชำนาญพร้อมในเรื่องต่างๆดังต่อไปนี้

1. การจับและควบคุมสัตว์
2. การทำเครื่องหมายบนตัวสัตว์
3. การแยกเพศ
4. การให้สารทางปาก ผิวหนัง กล้ามเนื้อ เส้นเลือด
5. การเก็บตัวอย่างเลือด อุจจาระ ปัสสาวะ ชี้น้ำ
6. การทำให้สัตว์สลบ
7. การทำให้ตายอย่างสงบ
8. การชันสูตรซากศพ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐพล วชิรโรจน์ เกิดที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในวันที่ 19 กันยายน 2526 สำเร็จการศึกษา ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในปี พ.ศ.2544 จากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) 2 กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ศิลปศาสตรบัณฑิต สาขารัฐศาสตร์ คณะรัฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา 2547 และปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2548 หลังจากจบการศึกษาในระดับปริญญาบัณฑิตได้เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเป็นผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัยบูรณาการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนากระดูกเทียม

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Nuttapon Vachiraroj, Juthamas Ratanavaraporn, Siriporn Damrongsakkul, Rath Pichyangkura, Tanom Banaprasert and Sorada Kanokpanont, A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on *in vitro* biocompatibility for bone substitutes *International Journal of Biological Macromolecules*. (Accepted 29 July 2009, inpress)

ผลงานในการประชุมวิชาการ

- Nuttapon Vachiraroj, Siriporn Damrongsakkul, and Sorada Kanokpanont, Growth and Distribution of Mesenchymal Stem Cells on Gelatin/Hydroxyapatite Scaffold in an Infusion Bioreactor, Poster Presentation, The 2nd Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON 2009), Club Andaman Group, Phuket, Thailand, 13-14 August 2009
- Nuttapon Vachiraroj, Siriporn Damrongsakkul, and Sorada Kanokpanont, Growth and Distribution of Mesenchymal Stem Cells on Gelatin/Hydroxyapatite Scaffold in an Infusion Bioreactor, Poster Presentation, The 2nd Thailand International Conference on Oral Biology (TICOB) "Biology of Mineralized Tissues", Faculty of Dentistry Chulalongkorn University Bangkok Thailand, 7 May 2009
- Nuttapon Vachiraroj, Siriporn Damrongsakkul, and Sorada Kanokpanont, Gelatin/Hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering: An *In Vitro* Testing for MSC Proliferation and Differentiation, Oral Presentation, The 4th World Congress on Regenerative Medicine (WCRM) "Current Regenerative Medicine 2009", Centara Grand Hotel at Central World, Bangkok, Thailand, 12-14 March 2009

รางวัลที่ได้รับ

- The 1st Prize Poster Presentation Award in Material Sciences in The 2nd Thailand International Conference on Oral Biology (TICOB) "Biology of Mineralized Tissues", Faculty of Dentistry Chulalongkorn University Bangkok Thailand, 7 May 2009