

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส  
เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2561  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF SCAFFOLDS FROM THAI SILK FIBROIN AND BIOACTIVE GLASS  
FOR BONE TISSUE ENGINEERING



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

Common Course

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมโครงสร้างเซลล์จากไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก
โดย	น.ส.พิมพ์นารา วัฒนะชัย
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร.พีรพัฒน์ ทองนีก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สุพรรณษา ยอดเมือง

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร.พีรพัฒน์ ทองนีก)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.สุพรรณษา ยอดเมือง)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ปาริชาติ นฤพนธ์จิรกุล)	

พิมพ์นารา วัฒนชะชัย : การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟ  
 พลาสติกเพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก . ( PREPARATION OF SCAFFOLDS FROM  
 THAI SILK FIBROIN AND BIOACTIVE GLASSFOR BONE TISSUE ENGINEERING)  
 อ.ที่ปรึกษาหลัก : ดร.พิรพัฒน์ ทองนีก, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สุพรรณษา ยอดเมือง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก  
 โดยใช้ไฟโบรอินไหมไทย (SF) และไบโอแอคทีฟพลาสติก (BG) เชื่อมขวางด้วย 3-ไกลซิโดอกซีโพรพิล  
 ไตรเอทอกซีไซเลน ((3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane; GPTMS) และขึ้นรูปด้วยวิธีโฟมมิง  
 (Foaming) ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR ยืนยันการเชื่อมขวางระหว่าง SF  
 และ BG เมื่อทดสอบการรับแรงกด พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ผสม SF-BG มีมอดูลัสการกดเพิ่มขึ้นจาก  
 โครงเลี้ยงเซลล์ SF ถึง 11 เท่า และไม่มากเกินไปมอดูลัสของกระดูกจริงดังเช่นโครงเลี้ยงเซลล์ BG  
 ทั้งนี้เสถียรภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่เชื่อมขวางทั้งสภาวะในน้ำหรือในสารละลายเอนไซม์โปรตี  
 เอส XIV ดีกว่าเสถียรภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ SF และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง  
 เมื่อทดสอบความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตาม ISO 10993 part 5 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไม่มีความ  
 เป็นพิษ และผลการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์กระดูก (SaOS-2 cell line)  
 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ผสมมีความสามารถในการส่งเสริมการสร้างกระดูก เมื่อพิจารณาจากผลการ  
 ยึดเกาะ การเจริญเติบโต ระดับกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณแคลเซียมที่  
 สะสมภายในเซลล์ และปริมาณแคลเซียมที่ตกตะกอนลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์  
 ผสมชนิดใหม่จาก SF และ BG มีศักยภาพในการใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมทาง  
 เนื้อเยื่อต่อไปในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช  
 ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5970268621 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORD: Silk fibroin, Bioactive glass, Scaffolds, Bone tissue engineering

Pimnara Wattanachai : PREPARATION OF SCAFFOLDS FROM THAI SILK FIBROIN AND BIOACTIVE GLASS FOR BONE TISSUE ENGINEERING. Advisor: Peerapat Thongnuek, Ph.D. Co-advisor: Supansa Yodmuang, Ph.D.

The aim of this research is to prepare scaffolds for bone tissue engineering by using silk fibroin (SF) and bioactive glass (BG) cross-linked with (3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GPTMS), and fabricate through a foaming method. The FTIR result confirmed that SF and BG were successfully cross-linked. Compressive testing showed that the SF-BG scaffolds had the compressive modulus 11 times greater than that of SF scaffold. Unlike BG scaffold, the modulus of the SF-BG scaffolds did not exceed that of human bones. It was also found that the stability of cross-linked composite scaffolds is greater than that of SF scaffolds or non-cross-linked composite scaffolds when dissolved in water or proteinase XIV solution. Cytotoxicity testing following the ISO 10993-part 5 revealed that the composite scaffolds showed no cytotoxicity. *In vitro* bioactivity test with SaOS-2 cells demonstrated the scaffold's capability of promoting bone formation, as evaluated from cell attachment, proliferation, activities of alkaline phosphatase (ALP), the amount of intracellular calcium, and the amount of calcium precipitation on the scaffolds. Therefore, the SF-BG composite scaffolds have potential to be used for bone tissue engineering.

Field of Study: Biomedical Engineering

Student's Signature .....

Academic Year: 2018

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายท่าน ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.พีรพัฒน์ ทองนีก อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ ดร.สุพรรณษา ยอดเมือง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย แนวทางการวางแผนงานวิจัย และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณะกรรมการสอบ ซึ่งได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ และอาจารย์ ดร.ปาริชาติ นฤพนธ์จิรกุล กรรมการ ที่สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ที่ให้คำแนะนำ และการช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พิมพ์นารา วัฒนชะชัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย .....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและทบทวนวรรณกรรม.....	6
2.1 กระดูกของมนุษย์ (Bone).....	6
2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering).....	10
2.3 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold).....	11
2.4 ชีววัสดุ (Biomaterials).....	13
2.4.1 ไหม (Silk).....	13
2.4.2 ไบโอแอคทีฟกลาส (Bioactive glass).....	20
2.5 กระบวนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์.....	26
2.6 การเชื่อมขวาง (Crosslinking).....	29
2.6.1 การเชื่อมขวางด้วยสารเคมี (Crosslinking by chemical agents).....	29

2.6.2 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพ (Crosslinking by physical means).....	32
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....	40
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	40
3.2 อุปกรณ์.....	41
3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย .....	43
3.3.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส .....	44
3.3.1.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย .....	44
3.3.1.2 การเตรียมโซลของไบโอแอคทีฟกลาส .....	45
3.3.2 การขึ้นรูปและการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์.....	46
3.3.2.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและ สารละลายไบโอแอคทีฟกลาสต่อการขึ้นรูป.....	46
3.3.2.2 การศึกษาการขึ้นรูปและการเชื่อมขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	46
3.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยง เซลล์ .....	47
3.3.3.1 การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) .....	47
3.3.3.2 การวิเคราะห์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity) .....	47
3.3.3.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)..	48
3.3.3.4 การศึกษาสัดส่วนของเจลที่ไม่ละลายน้ำ (gel fraction) ของโครงเลี้ยงเซลล์	48
3.3.3.5 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro biodegradation) ของโครงเลี้ยงเซลล์.....	49
3.3.3.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียม (Calcium Assay) ของ โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ (Simulated body fluid; SBF) .....	50



3.3.3.8 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์ (Cytotoxicity) .....	50
3.3.3.9 การยึดเกาะของเซลล์ (Attachment) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) บนโครงเลี้ยงเซลล์ .....	52
3.3.3.10 ทดสอบความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก (Osteoblasts cell line: SaOS-2) .....	55
3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	57
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	58
4.1 การขึ้นรูปและการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ .....	58
4.1.1 ผลของอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายไปโอแอคทีฟกลาส ต่อการขึ้นรูป .....	58
4.1.2 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไปโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS โดยวิธีโฟมมิ่ง (Foaming).....	60
4.2 สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	64
4.2.1. โครงสร้างสัณฐานภายในของโครงเลี้ยงเซลล์.....	64
4.2.2. ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity).....	68
4.2.3. โครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	69
4.2.4. สัดส่วนของเจลที่ไม่ละลายน้ำ (gel fraction) ของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	75
4.2.5. ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพระดับห้องปฏิบัติการของโครงเลี้ยงเซลล์..	77
4.2.6 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (Compression test).....	80
4.2.7. ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลอง ไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ .....	85
4.2.8. ความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์.....	90
4.2.9. การยึดเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ .....	92
4.2.10. การทดสอบความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก (Osteoblast cell line: SaOS-2) .....	96

บรรณานุกรม..... 106

ภาคผนวก ก การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและไบโอแอคทีฟกลาส (กลุ่มควบคุม)... 115

ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ ..... 116

ภาคผนวก ค ร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่น้ำปราศจากประจุ 118

ภาคผนวก ง ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ ..... 119

ภาคผนวก จ ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่ในสารละลาย เอนไซม์โปรติเอส XIV ..... 120

ภาคผนวก ฉ กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณแคลเซียมของความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ ..... 121

ภาคผนวก ช กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line โดยวิธี DNA ..... 122

ภาคผนวก ซ กราฟมาตรฐานของการวัดค่าระดับกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส..... 123

ภาคผนวก ฌ กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียมที่สะสมภายในเซลล์ ..... 124

ภาคผนวก ญ การวิเคราะห์ธาตุของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากโครงเลี้ยงเซลล์ Si70Ca30 และ Si63.64Ca36.36 ด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) ..... 125

ประวัติผู้เขียน..... 127

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงโปรตีนในเนื้อกระดูก .....	6
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของเส้นใยไหม .....	14
ตารางที่ 3 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไฟโบรอินและเซรีซินของ <i>Bombyx mori</i> .....	16
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบสมบัติทางกลของเนื้อเยื่อกระดูก เอ็น และพอลิเมอร์ .....	18
ตารางที่ 5 การย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีวิธีการขึ้นรูปที่ต่างกัน .....	19
ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของไบโอแอคทีฟกลาส .....	21
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบสมบัติทางกลของไบโอแอคทีฟกลาสชนิดต่างๆ กับกระดูกมนุษย์ .....	26
ตารางที่ 8 วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ .....	27
ตารางที่ 9 งานวิจัยที่ศึกษาการขึ้นรูป Scaffolds ด้วยกระบวนการทำให้เกิดฟอง (Sol-gel foaming) .....	34
ตารางที่ 10 งานวิจัยที่ศึกษาการเชื่อมขวางด้วย GPTMS .....	37
ตารางที่ 11 ชนิดของตัวอย่างและสัญลักษณ์ของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	62
ตารางที่ 12 ขนาดรูพรุนเฉลี่ยและลักษณะผนังของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย, โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส .....	67
ตารางที่ 13 ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย, โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส .....	68
ตารางที่ 14 มอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	83
ตารางที่ 15 ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG เมื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ต่างกัน (ร้อยละ 0, 12.5, 22.2, 30 และ 36.36% โดยโมล ในโซลของ BG ที่ใช้) .....	87
ตารางที่ 16 ค่าการยึดเกาะของเซลล์ SaOS-2 cell line เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ บนโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางแบบผสมด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt .....	95

ตารางที่ 17 ร้อยละโดยน้ำหนักของเหล็กของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่น้ำปราศจากประจุที่  
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 118

ตารางที่ 18 ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลอง  
ไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ..... 119

ตารางที่ 19 ร้อยละน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์ โป  
รติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการแช่ต่างๆ  
..... 120



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพตัดขวางของกระดูกแสดงกระดูกแข็งที่บและโปรง .....	8
รูปที่ 2 Intramembranous ossification .....	9
รูปที่ 3 Endochondral ossification .....	10
รูปที่ 4 ริงไหมและหนอนไหม .....	13
รูปที่ 5 โครงสร้างของเส้นใยไหมจากหนอนไหม .....	14
รูปที่ 6 โครงสร้างของไฟโบรอิน; การเรียงตัวของหมู่อะมิโนและลักษณะแผ่นเบต้า ( $\beta$ -sheet) .....	17
รูปที่ 7 โครงสร้างของเซริซิน (Sericin) .....	17
รูปที่ 8 กลไกการย่อยสลายไฟโบรอินไหม .....	19
รูปที่ 9 โครงสร้างของเตตระเอทอกซีไซเลน (Tetraethoxysilanes ;TEOS) .....	22
รูปที่ 10 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาควบนั่นของเตตระเอทอกซีไซเลน .....	22
รูปที่ 11 ไบโอแอคทีฟกลาส .....	23
รูปที่ 12 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อไบโอแอคทีฟกลาสสัมผัสกับของเหลวในร่างกาย .....	24
รูปที่ 13 การทำให้เกิดฟอง .....	28
รูปที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มอีพอกซี .....	30
รูปที่ 15 การเชื่อมขวางของวงออกซิเรนกับหมู่เอมีน .....	31
รูปที่ 16 การเกิด Si-O-Si bond โดยผ่านปฏิกิริยาควบนั่น (condensation reaction) .....	31
รูปที่ 17 การเกิด Polysiloxane network โดยปฏิกิริยา Polycondensation .....	31
รูปที่ 18 แผนการดำเนินงานวิจัย .....	43
รูปที่ 19 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย .....	45
รูปที่ 20 ลักษณะของสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่อัตราส่วน โดยน้ำหนัก (a) 90/10, (b) 80/20, (c) 70/30, (d) 60/40, (e) 50/50, (f) 40/60, (g) 30/70, (h) 20/80 และ (i) 10/90 เมื่อขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง .....	59

รูปที่ 21 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นจากการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟ กลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS.....	61
รูปที่ 22 โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0%wt, (b) 10%wt, (c) 20%wt, (d) 30%wt และ (e) 40%wt.....	63
รูปที่ 23 โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ (SEM )กำลังขยาย 50 เท่า (สเกลบาร์ : 1 mm) และ 100 เท่า (สเกลบาร์ : 500 $\mu$ m).....	66
รูปที่ 24 สเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดโดยดูการเชื่อมขวางระหว่างไฟโบรอินไหมไทยกับ 3-ไกล ซิดอกซีโพรพิลไดเรทอทอกซีไซเลน ด้วยเทคนิค FTIR.....	71
รูปที่ 25 โครงสร้างทางเคมีของ GPTMS .....	71
รูปที่ 26 การเติมหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) SF ด้วย GPTMS .....	72
รูปที่ 27 สเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมของไฟโบรอินไหมไทยและไบโอ แอคทีฟกลาส ด้วยเทคนิค FTIR .....	74
รูปที่ 28 โครงสร้างทางเคมีไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS .....	74
รูปที่ 29 ร้อยละโดยน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่ในน้ำปราศจากประจุ ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	76
รูปที่ 30 ร้อยละของน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟ กลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%,30% และ 40%wt ภายหลังการแช่ใน สารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	78
รูปที่ 31 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบ โอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวาง ด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) .....	82
รูปที่ 32 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟ กลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) ที่สภาวะแห้งและสภาวะเปียก .....	83
รูปที่ 33 ลักษณะ (a) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), (b) โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟ กลาส (BG) และ (c) โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) ภายหลังแช่ในสารละลาย PBS 24 ชั่วโมง.....	84

- รูปที่ 34 ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทย และไบโอแอคทีฟกลาสที่ขึ้นรูปจากโซลของไบโอแอคทีฟกลาสที่มีสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ต่างกัน และเชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงชั่วโมงที่ 1, 2, 4, 6, 8 และวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14 ..... 86
- รูปที่ 35 ลักษณะผลึกสีขาวเกิดขึ้นหลังแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF ในวันที่ 9, 10 และ 14 ..... 88
- รูปที่ 36 รูปร่างผลึกและปริมาณธาตุองค์ประกอบที่พบบนโครงเลี้ยงเซลล์ Si70Ca30 และ Si63.64Ca36.36 ภายหลังจากแช่ในสารละลาย SBF 14 วัน ..... 89
- รูปที่ 37 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางแบบผสมด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt ที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 91
- รูปที่ 38 จำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line ที่ยึดเกาะ (6 ชม.) และเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  และ  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์.. 94
- รูปที่ 39 จำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line ที่เจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF) โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ..... 97
- รูปที่ 40 กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ..... 99
- รูปที่ 41 ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$

เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 .....	101
รูปที่ 42 การติดสีย้อม Alizarin Red (Calcium secretion) ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF) , โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 .....	103
รูปที่ 43 ความเข้มของสีแดงของ Alizarin Red บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 .....	104
รูปที่ 44 ลักษณะเซลล์ SaOS-2 cell line ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) เป็นเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 .....	105
รูปที่ 45 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม .....	121
รูปที่ 46 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line .....	122
รูปที่ 47 กราฟมาตรฐานของการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) .....	123
รูปที่ 48 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม .....	124
รูปที่ 49 ผลึกที่เกิดจากโครงเลี้ยงเซลล์ Si70Ca30.....	125
รูปที่ 50 ผลึกที่เกิดจากโครงเลี้ยงเซลล์ Si63.64Ca36.36.....	126



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกกำลังก้าวเข้าสู่การเป็นสังคมผู้สูงอายุ รวมถึงประเทศไทยด้วยที่กำลังเผชิญกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางประชากร ซึ่งมีการคาดการณ์ว่า ประเทศไทยจะเป็นสังคมผู้สูงอายุอย่างสมบูรณ์ (Aged Society) ในปี พ.ศ.2567-2568 และจะเป็นสังคมสูงอายุระดับสุดยอดในปี พ.ศ.2578 ตามรายงานของสำนักงานสถิติแห่งชาติ (ปี 2015) องค์การสหประชาชาติ ได้นิยาม “ผู้สูงอายุ” คือ บุคคลที่มีอายุตั้งแต่ 60 หรือ 65 ปีขึ้นไป และการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ คือ ปรากฏการณ์ที่ผู้สูงอายุมีสัดส่วนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด นอกจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในอนาคตและมีผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์แล้ว ภาวะร่างกายหรือสุขภาพเสื่อมถอยตามธรรมชาติก็ยังคงเป็นผลที่ตามมา เช่น ข้อเข่าเสื่อม กระดูกเปราะแตกหักง่าย เป็นต้น โดยกระดูกเปราะแตกหักง่าย เป็นหนึ่งในปัญหาของผู้สูงอายุที่สำคัญ ซึ่งการรักษาสามารถรักษาได้หลายวิธี เช่น การซ่อมแซมภายในร่างกายตามธรรมชาติ การปลูกถ่ายทดแทนด้วยวัสดุ เป็นต้น แต่ละวิธีการรักษาต่างมีข้อจำกัด วิธีการรักษาโดยการซ่อมแซมภายในร่างกายตามธรรมชาติเกิดขึ้นได้ช้า ขณะเดียวกันวิธีการรักษาแบบใช้วัสดุปลูกถ่าย ซึ่งเป็นการนำวัสดุมาเพื่อทำหน้าที่เป็นโครงสร้างกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกขึ้นใหม่โดยรอบบริเวณที่วางวัสดุปลูกถ่าย หรือมีการงอกเข้าไปแทนที่ในชั้นวัสดุปลูกถ่าย

ชนิดของวัสดุปลูกถ่ายทดแทนนั้นมี 3 ประเภท คือ 1. ปลูกถ่ายด้วยกระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง (Autografts) 2. ปลูกถ่ายด้วยกระดูกที่รับบริจาคมาจากผู้อื่น (Allografts) 3. การใช้วัสดุเลียนแบบธรรมชาติทดแทน (Biomimetic materials) [1] ซึ่งวัสดุปลูกถ่ายแต่ละชนิดต่างมีความเสี่ยง โดยการปลูกถ่ายด้วยกระดูกจากตัวผู้ป่วยเองมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมากกว่าวิธีอื่น เนื่องจากต้องผ่าตัดถึง 2 บริเวณนั่นคือ การผ่าตัดเก็บเกี่ยวกระดูกจากอวัยวะส่วนอื่น เพื่อนำไปใช้ปลูกและการผ่าตัดเพื่อปลูกถ่ายทดแทน ณ ส่วนที่แตกหัก ส่วนการปลูกถ่ายแบบรับกระดูกจากผู้อื่นมีความเสี่ยง คือ การปฏิเสธเนื้อเยื่อและการถ่ายเทโรคภัย [2] ดังนั้นการใช้วัสดุเลียนแบบธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษาการบาดเจ็บ [3] นอกจากนี้วิธีนี้จะช่วยลดปัญหาการขาดแคลนกระดูกที่นำมาปลูก

ถ่ายทดแทน เพราะฉะนั้นการวิจัยและพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตเป็นวัสดุเลียนแบบธรรมชาติทดแทนกระดูกจึงมีความจำเป็นในปัจจุบัน

โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffolds) คือ โครงสร้างทรงสามมิติมีรูพรุนที่สร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เป็นโครงให้เซลล์ยึดเกาะ เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างตามต้องการ [4] นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์บางชนิดยังมีหน้าที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างกระดูกขึ้นใหม่ในเนื้อเยื่อ โดยรอบบริเวณที่วางโครงเลี้ยงเซลล์และกระดูกใหม่อาจเติบโตเข้าไปภายในชั้นโครงเลี้ยงเซลล์ กระบวนการนี้จะเลียนแบบสรีรวิทยาของกระดูกปกติที่มีการละลายกระดูกจากผิวในกระดูกและมีการสร้างกระดูกใหม่ที่ผิวภายนอก ซึ่งเป็นการทำให้กระดูกเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้นจนสามารถเชื่อมสนิทกันจนไม่มีรอยแผลตรงส่วนที่แตกหัก [5]

ชีววัสดุมีหลายประเภทที่สามารถนำมาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ได้ เช่น พอลิเมอร์ธรรมชาติ พอลิเมอร์สังเคราะห์ หรือเซรามิก เป็นต้น ทั้งนี้การเลือกชนิดชีววัสดุที่นำมาขึ้นรูป เป็นปัจจัยสำคัญที่นำมาสู่สมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ขนาดรูพรุนและความพรุนที่ต่อเนื่อง ความแข็งแรง ความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย และความสามารถในการย่อยสลายภายในร่างกาย [6] จากปัญหาข้างต้นที่กล่าวถึงความเปราะและแตกหักง่ายของกระดูกในวัยสูงอายุ นำมาสู่การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตเป็นวัสดุเลียนแบบธรรมชาติทดแทนกระดูก ซึ่งการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้ทดแทนนั้นต้องคำนึงถึงสรีรวิทยาของกระดูก เช่น กระดูกของมนุษย์ เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษที่มีหลอดเลือดมาเลี้ยง ประกอบด้วยเซลล์กระดูกและเนื้อกระดูกที่มีสารอินทรีย์ (Organic matrix หรือ Osteoid) ประมาณ 35% และสารอนินทรีย์ (Inorganic matrix) ประมาณ 65 % โดยเนื้อกระดูกที่เป็นสารอินทรีย์ ประกอบด้วยสารพันที่มีส่วนประกอบเป็นโปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) กับส่วนที่เป็นโปรตีน และเนื้อกระดูกที่เป็นสารอนินทรีย์ จะทำให้กระดูกมีความแข็งแรงทนทานและคงรูปอยู่ได้ ประกอบด้วย แคลเซียมและฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของผลึกแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (calcium hydroxyapatite) และสารอนินทรีย์อื่นๆ [7], [8] เพราะฉะนั้นงานวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้จึงอาศัยหลักการไบโอมิเมติกส์ (Biomimetics) มาใช้ในการเลือกวัสดุสำหรับพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเลียนแบบธรรมชาติกระดูกที่มีเส้นใยพอลิเมอร์คอลลาเจนอยู่ในเมทริกซ์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

ไหม เป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่นำมาประยุกต์ใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยงานวิจัยนี้ นำโปรตีนไฟโบรอินจากไหมมาศึกษา เนื่องจากสมบัติเชิงกลที่ดีเมื่อเทียบเท่ากับพอลิเมอร์ธรรมชาติ

ชนิดอื่นๆ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ [9] อย่างไรก็ตาม ไฟโบรอินมีความเฉื่อยต่อการเชื่อมกับเนื้อเยื่อใหม่ [10] ดังนั้นจึงมีการผสมไบโอแอคทีฟกลาส ที่เป็นวัสดุอินทรีย์ที่มีความอ่อนไหวในการเกิดปฏิกิริยาที่พื้นผิวได้รวดเร็วเมื่อเข้าสู่ร่างกาย มีสมบัติส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ร่วมด้วยเพื่อให้สมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ดีขึ้น ทั้งการเชื่อมของกระดูกกับเนื้อเยื่อใหม่ [11] และการยึดเกาะของเซลล์บนวัสดุ [6]

อย่างไรก็ตาม การนำวัสดุที่มีสมบัติเฉพาะตัวต่างกันมาผสมกันและขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบคอมโพสิต (composite) อาจทำให้เกิดการขาดเสถียรภาพขององค์ประกอบในวัสดุคอมโพสิต [12] ดังนั้นการเชื่อมขวางโมเลกุลองค์ประกอบในวัสดุคอมโพสิตเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มความเสถียรของโครงเลี้ยงเซลล์ประเภทนี้ได้ การเชื่อมขวางสามารถทำได้ทั้งทางกายภาพและทางเคมี มีงานวิจัยที่นำ 3-ไกลซิดอกซีโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน ((3-Glycidyoxypropyl) trimethoxysilane; GPTMS) มาใช้เป็นตัวเชื่อมขวางระหว่างโครงข่ายซิลิเกตและพอลิเมอร์โปรตีน เช่น เจลาติน [13] อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีงานวิจัยใดเชื่อมขวางไบโอแอคทีฟกลาสกับไฟโบรอินมาก่อน เพราะฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงจะเป็นการทดลองแรกที่ใช้ GPTMS เป็นตัวเชื่อมขวางระหว่างไฟโบรอินไหมไทยกับโครงข่ายซิลิเกตของไบโอแอคทีฟกลาสเพื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน แล้วจึงศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ผสม เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

## 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

1.2.2 เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ผสม

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

### 1.3.1 การศึกษาอัตราส่วนที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

1.3.1.1 เตรียมสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย (SF) พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 และสารละลายไบโอแอคทีฟกลาส (BG) โดยสารละลาย BG จะถูกเตรียมที่อัตราส่วนซิลิกาต่อแคลเซียมออกไซด์เป็น 70%โมล ต่อ 30%โมล

### 1.3.1.2 ตัวแปรที่ศึกษาในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่

1. อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของ SF/BG ; 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 10/90 เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมไปศึกษาขั้นต่อไป
2. ปริมาณ GPTMS ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง; 0%wt, 10%wt, 20%wt, 30%wt และ 40%wt

### 1.3.2 วิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

1.3.2.1 โครงสร้างพื้นฐานและขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

1.3.2.2 ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity)

1.3.2.3 โครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย Attenuated Total Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

1.3.2.4 สัดส่วนของเจลที่ไม่ละลายน้ำ (Gel fraction)

1.3.2.5 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro* biodegradation) ของโครงเลี้ยงเซลล์

1.3.2.6 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (Compression test)

1.3.2.7 ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียม (Calcium Assay)

1.3.2.8 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์ (Cytotoxicity)

1.3.2.9 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์

1.3.2.10 ความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก (Osteoblast cell line: SaOS-2)

1. จำนวนเซลล์โดยวิธีการวัดปริมาณ DNA
2. กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase activity, ALP)
3. ปริมาณแคลเซียม (Calcium content) ที่สะสมภายในเซลล์
4. ปริมาณแคลเซียมที่ตกตะกอน (Calcium deposition) โดยการย้อมสี Alizarin Red

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ต้นแบบโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่ถูกเชื่อมขวางด้วย GPTMS ในปริมาณที่เหมาะสม มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการส่งเสริมการสร้างกระดูกในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อพัฒนาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมทางเนื้อเยื่อกระดูกต่อไปในอนาคต



## บทที่ 2

### ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 กระดูกของมนุษย์ (Bone)

กระดูก (Bone) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษที่มีหลอดเลือดมาเลี้ยง ประกอบด้วยเซลล์กระดูกและเนื้อกระดูกที่มีสารอินทรีย์ (Organic matrix หรือ Osteoid) ประมาณ 35% และสารอินทรีย์ (Inorganic matrix) ประมาณ 65 %

เนื้อกระดูกที่เป็นสารอินทรีย์ ประกอบด้วยสารพืที่มีส่วนประกอบเป็น proteoglycans เช่น chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate และ keratin 6-sulfate กับส่วนที่เป็นโปรตีนพวกเส้นใย คือ เส้นใยคอลลาเจน type I จำนวนมากถึง 90% ทำให้เนื้อกระดูกติดสี acidophilic และส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่เส้นใยคอลลาเจนประมาณ 5% เช่น osteocalcin สร้างโดย osteoblast, osteopontin สร้างโดย preosteoblast เป็นต้น

เนื้อกระดูกที่เป็นสารอนินทรีย์ ทำให้กระดูกมีความแข็งแรงทนทาน และคงรูปอยู่ได้ ประกอบด้วย แคลเซียมและฟอสฟอรัส อยู่ในรูปของผลึก calcium hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) และสารอนินทรีย์อื่นๆ เช่น bicarbonate, citrate, magnesium, potassium และ sodium กระจายอยู่ตามสารพื และเกาะบนเส้นใยคอลลาเจน

ตารางที่ 1 แสดงโปรตีนในเนื้อกระดูก

กลุ่มโปรตีน	แหล่งที่มา	อ้างอิง
เส้นใยคอลลาเจน type I	Osteoblast	[14]
โปรตีนที่มีหน้าที่เชื่อมเซลล์ : osteopontin, fibronectin, thrombospondin		
โปรตีนที่มีหน้าที่จับกับแคลเซียม : osteonectin, sialoprotein		
โปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการสะสมเกลือแร่ : osteocalcin		
เอนไซม์ : collagenase, alkaline phosphatase		

### เซลล์กระดูก [7], [8], [14]

เซลล์กระดูก มีปริมาณเป็น 10 % ของปริมาณกระดูกทั้งหมด โดยเซลล์กระดูกประกอบด้วย เซลล์ที่มาจากแหล่งกำเนิด 2 แหล่ง คือ

1. Mesenchymal stem cell line ประกอบด้วย undifferentiated cells หรือ osteoprogenitor cells, osteoblasts และ osteocytes
2. Hematopoietic stem cell line ประกอบด้วย circulating หรือ marrow monocytes และ osteoclasts

**Undifferentiated mesenchymal cells หรือ Osteoprogenitor cells** เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน มีนิวเคลียสเดี่ยว มีไซโทพลาสซึมและจำนวนออร์แกเนลล์น้อย โดยเซลล์อยู่ในสภาพเช่นนี้จนกว่าถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblasts) เซลล์ชนิดนี้อาศัยอยู่ที่ bone canals, endosteum, periosteum และ marrow

**ออสติโอเบลาสต์ (Osteoblast)** เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด เซลล์กระดูก (Osteoprogenitor cells) เซลล์นี้จะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติอยด์ (Osteoid) ซึ่งโปรตีนนี้จะมีสารอินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก นอกจากนี้ ออสติโอเบลาสต์ยังสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) เซลล์ออสติโอเบลาสต์ เมื่อหมดหน้าที่แล้วมีทางเลือกได้ 3 ทาง คือ 1. Osteoblasts lining bone 2. ออสติโอไซต์ (Osteocyte) 3. กลับไปเป็น Osteoprogenitor cells

**ออสติโอไซต์ (Osteocyte)** เป็นเซลล์ที่มีจำนวนเป็น 90 % ของเซลล์กระดูกทั้งหมด เซลล์ออสติโอไซต์เจริญต่อมาจากออสติโอเบลาสต์และถูกล้อมรอบโดยเนื้อกระดูก (เป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่แล้ว) โดยเซลล์นี้จะอยู่ในลากูนา (lacuna) และมีแขนงเซลล์ที่ยาว ภายในแขนงเซลล์จะประกอบด้วยท่อเล็กๆ (microfilaments) จำนวนมาก ซึ่งแต่ละแขนงของเซลล์มาสัมผัสกัน เชื่อมกัน และสานกันเป็นตาข่าย เรียก คานาลิคูล (canaliculi) กระจายอยู่ทั่วกระดูก ซึ่งทำให้ออสติโอไซต์มีการติดต่อสื่อสารกันได้ และยังถ่ายทอดสัญญาณกำหนดให้มีการสร้างและการสลายของกระดูกได้ อีกทั้งควบคุมการไหลของแร่ธาตุระหว่างเนื้อกระดูกและของเหลวนอกเซลล์ของกระดูก

**ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast)** หรือเซลล์สลายกระดูก เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจาก hematopoietic stem cell precursor ในกลุ่มของโมโนไซต์ (monocyte) โดยออสติโอคลาสต์ มีขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส ประมาณ 3-20 นิวเคลียส เซลล์ออสติโอคลาสต์มีหน้าที่ในกระบวนการ

ก่อรูปกระดูก (bone remodeling) โดยจะผลิตเอนไซม์ acid phosphatase เข้ามาในการสลายกระดูก เพื่อให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม

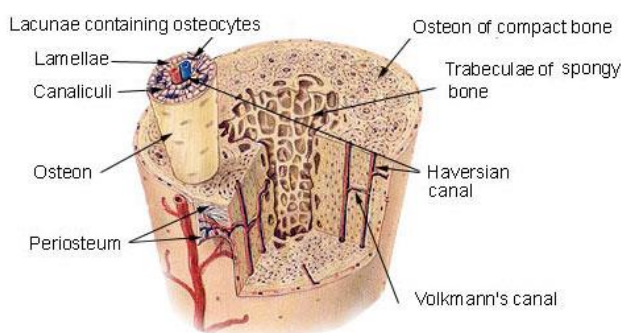
### การแบ่งชนิดของกระดูกแข็ง แบ่งได้ 2 ชนิดตามความหนาแน่นของเนื้อกระดูก

1. **กระดูกแข็งทึบ (Compact bone)** ประกอบด้วยเนื้อกระดูกที่มีการจัดเรียงตัวแบบ haversian system หรือเรียกว่า osteon เป็นการจัดเรียงตัวเป็นชั้นๆ ซ้อนกันคล้ายหัวหอม เรียกว่า lamellae ล้อมรอบ haversian canal ซึ่งเป็นช่องว่างยาว วางอยู่ศูนย์กลาง haversian system ภายในบรรจุหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง และเส้นประสาท แสดงดังภาพที่ 1 กระจกแข็งทึบจัดเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่แข็งแรงที่สุด พบที่ส่วนแกนของกระดูกแข็งยาว

2. **กระดูกแข็งโปร่ง (Spongy bone)** มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ประกอบด้วยกระดูกแข็งชิ้นเล็กๆ ต่อกันคล้ายร่างแห แสดงดังรูปที่ 1 โดยช่องว่างระหว่างกระดูกชิ้นเล็กๆ เต็มไปด้วยไขกระดูกแดง

กระดูกแข็งโปร่งแตกต่างจากกระดูกแข็งทึบ 2 อย่าง คือ กระจกแข็งโปร่งเบาและเป็นที่อยู่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาว จึงเป็นแหล่งผลิตเม็ดเลือดขาวที่โตเต็มวัยไหลเวียนในหลอดเลือดทั่วร่างกาย ตำแหน่งที่พบกระดูกแข็งโปร่ง ได้แก่ กระจกแข็งสัน กระจกแข็งแผ่น กระจกแข็งรูปร่างไม่แน่นอนและส่วนปลายของกระดูกแข็งยาว

#### Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)



รูปที่ 1 ภาพตัดขวางของกระดูกแสดงกระดูกแข็งทึบและโปร่ง  
(<https://th.wikipedia.org/wiki/กระดูกเนื้อแน่น>)



## การสร้างกระดูก (Bone formation) [7], [8], [14]

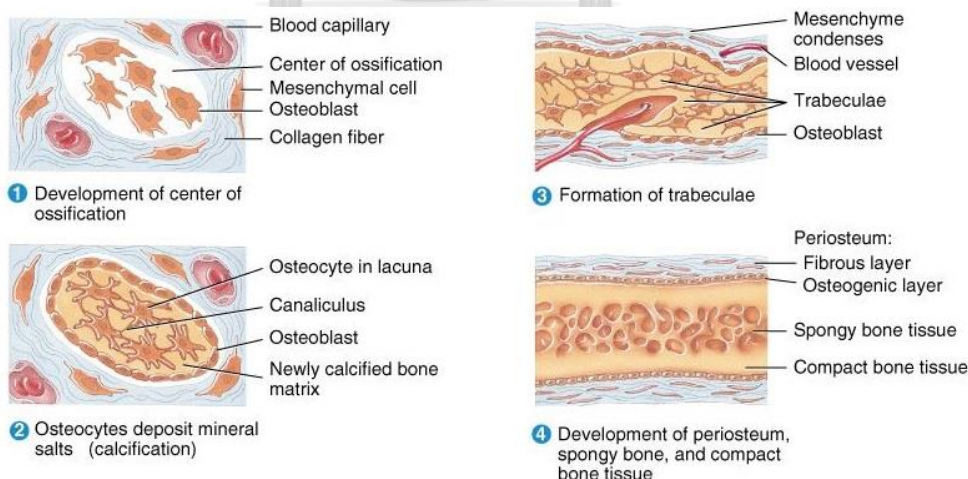
1. **Intramembranous ossification** เป็นขบวนการสร้างเนื้อกระดูกแข็งจากการแทนที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เจริญมาจากตัวอ่อนโดยตรง การสร้างกระดูกลักษณะนี้พบที่กระดูกแข็งแผ่น เช่น กะโหลกศีรษะ กระดูกสะบัก และกระดูกทรวงอก แบ่งกระบวนการเป็น 4 ขั้นตอน แสดงดังรูปที่ 2

1) *Development of center of ossification* เริ่มมีการพัฒนาของการสร้างกระดูกแข็งตรงกลาง โดย mesenchymal cell มาอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและเปลี่ยนตัวเองเป็น osteoprogenitor cell และ osteoblast ตามลำดับ

2) *Calcification* เป็นตำแหน่งเนื้อกระดูกเริ่มมีแคลเซียมและสารอนินทรีย์อื่นๆมาสะสม

3) *Formation of trabeculae* เป็นการสร้างกระดูกแข็งชิ้นเล็กๆ ที่เชื่อมกันเป็นกระดูกแข็งโปร่ง ต่อมากระดูกหนาขึ้น หลอดเลือดแทรกเข้าไปในช่องว่างระหว่างกระดูกแข็งชิ้นเล็กๆ โดยที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดกับหลอดเลือดเปลี่ยนแปลงไปเป็นไขกระดูกแดง

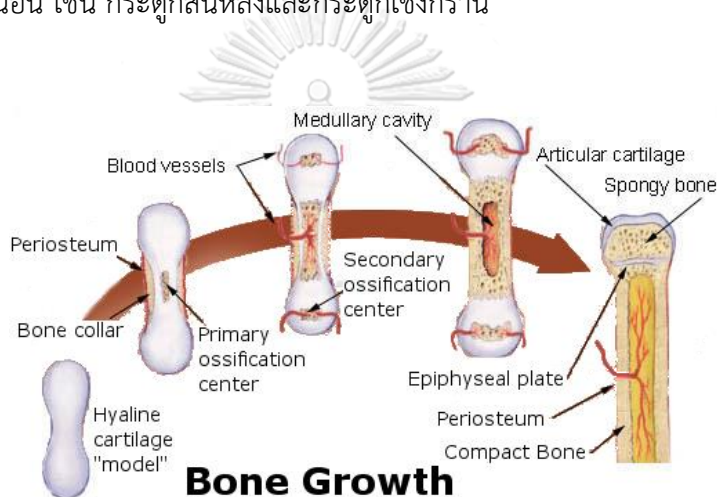
4) *Development of the periosteum* เป็นกระบวนการสร้างเยื่อหุ้มกระดูกแข็งที่เกิดขึ้นพร้อมการสร้างกระดูกแข็งชิ้นเล็กๆ โดย mesenchymal cell รวมกลุ่มล้อมรอบกระดูกแข็งแล้วพัฒนาไปเป็นเยื่อหุ้มกระดูกแข็ง และผิวบนของกระดูกแข็งโปร่งเปลี่ยนเป็นกระดูกแข็งทึบ ขณะที่กระดูกแข็งโปร่งยังคงอยู่ตรงกลาง



รูปที่ 2 Intramembranous ossification

(<http://slideplayer.com/slide/8030344/>)

2. **Endochondral ossification** เป็นขบวนการสร้างกระดูกแข็งแทนที่กระดูกอ่อน ไฮยาลินที่มีการเจริญมาก่อนแล้ว โดยกลุ่มเซลล์ mesenchyme จะเข้าไปแทนที่กระดูกอ่อนไฮยาลินผ่านทางหลอดเลือด เริ่มจากส่วนกลางของกระดูกซึ่งเป็นจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ (primary ossification center) เมื่อเซลล์ mesenchyme พัฒนาเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูกจะทำให้มีการสะสมเนื้อกระดูกมากขึ้น และมีจุดการสร้างกระดูกทุติยภูมิ (secondary ossification center) การสร้างกระดูกดำเนินไปจนจุดการสร้างมาบรรจบกัน การสร้างกระดูกลักษณะนี้พบที่กระดูกเชิงยาว แสดงดังรูปที่ 3 เช่น กระดูกแขนและขา กระดูกเชิงสัน เช่น กระดูกข้อมือและข้อเท้า กระดูกแข็งรูปร่างไม่แน่นอน เช่น กระดูกสันหลังและกระดูกเชิงกราน



รูปที่ 3 Endochondral ossification

(<http://boneandspine.com/endochondral-ossification-and-intramembranous-ossification/>)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นศาสตร์ที่นำความรู้ทางวิศวกรรมและวิทยาศาสตร์เข้ามาประยุกต์ร่วมกัน ในกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อ เพื่อพัฒนา ซ่อมแซม ฟื้นฟู ทดแทน หรือปรับปรุงการทำงานของอวัยวะที่ได้รับการบาดเจ็บหรือสูญเสีย [15] ซึ่งวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญ 3 ส่วน คือ 1. โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) 2. สารชักนำชีวภาพ (Growth factors) 3. เซลล์ (Cells) ซึ่งงานทางด้านการพัฒนาชีววัสดุ เพื่อทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์หรือโครงค้ำจุนให้เซลล์ยึดเกาะ เพื่อเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลง (Differentiate) ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างตามต้องการ [4] มีความสำคัญต่อการรักษาและซ่อมแซมอย่างมาก ในปัจจุบันวิศวกรรมเนื้อเยื่อถูกนำมาใช้กับเนื้อเยื่อ

และอวัยวะที่หลากหลาย เช่น กระดูก กระดูกอ่อน ผิวหนัง และหลอดเลือด เป็นต้น [15] การสร้างและออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์จะมีการใช้วัสดุในการขึ้นรูปที่หลากหลายทั้งพอลิเมอร์ธรรมชาติ พอลิเมอร์สังเคราะห์ หรือเซรามิก เป็นต้น การเลือกชนิดของวัสดุเพื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญต่อการกำหนดสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยมากจะมีการเลือกชนิดของวัสดุให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับธรรมชาติและสภาวะของเนื้อเยื่อและอวัยวะนั้นๆ หรือให้ตรงตามวัตถุประสงค์ เช่น กระดูก มีส่วนประกอบทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์จะมีการเลียนแบบให้คล้ายกับธรรมชาติของกระดูก เช่น โครงเลี้ยงเซลล์ไหม-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [16] โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไบโกลาส [17] เป็นต้น ส่วนของสารชักนำชีวภาพ เช่น Growth factor เป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงในร่างกายและเป็นสารที่เซลล์ใช้สื่อสารระหว่างกัน เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตซ่อมแซม และชักนำให้เซลล์เปลี่ยนไปเป็นเซลล์เฉพาะ โดยที่สารชักนำชีวภาพแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อเซลล์หรืออวัยวะนั้นๆ เช่น Bone morphogenetic protein (BMP-2) เป็นโปรตีนในกลุ่มที่ชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลง (Growth and differentiation factor) ในกระดูกและกระดูกอ่อน เป็นต้น [18] และในส่วนสุดท้ายทางด้านเซลล์ เซลล์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีหลายประเภท เช่น เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells/progenitor cells) หรือจะเป็นเซลล์ที่จำเพาะ (Specialized cells) แยกมาจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่ต้องการซ่อมแซม [19] โดยทั้ง 3 ส่วนที่กล่าวข้างต้นทำงานร่วมกันเพื่อให้วิศวกรรมเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จและสามารถนำมาใช้งานในผู้ป่วยได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 2.3 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold)

โครงเลี้ยงเซลล์ เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเป็นโครงสร้างทรงสามมิติที่สร้างขึ้นชั่วคราว ทำหน้าที่เป็นโครงให้เซลล์ยึดเกาะ เพื่อเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างตามต้องการ [4] และในขณะเดียวกันโครงเลี้ยงเซลล์ก็ยังช่วยค้ำจุนเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหายในขณะที่กระบวนการซ่อมแซมกำลังดำเนินไป ดังนั้นหลักการในการออกแบบและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จะต้องสนับสนุนหน้าที่ดังกล่าว ซึ่งมีดังนี้ [5], [6], [15]

1. โครงสร้างเป็นสามมิติมีรูพรุน (pore) ซึ่งขนาดรูพรุน 200-350 ไมโครเมตร พบว่า มีความเหมาะสมกับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก และรูพรุนเหล่านั้นควรต้องเชื่อมต่อกันด้วยช่องหรือรูขนาดเล็ก

ขนาดรูที่ใช้เชื่อมต่อควรมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อย 100 ไมโครเมตร เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารอาหารและออกซิเจนให้แก่เซลล์ภายในโครงสร้างอย่างทั่วถึง

2. มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และไม่เป็นพิษต่อเซลล์
3. สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradable) โดยมีอัตราการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ และสารที่เกิดจากการที่สลายตัวไม่เป็นพิษต่อร่างกาย สามารถดูดซึมหรือขับออกจากร่างกายได้
4. องค์ประกอบทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ ควรมีความใกล้เคียงหรือเลียนแบบขององค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูก เพื่อส่งสัญญาณเชื่อมโยงกับเนื้อเยื่อและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะใหม่ตามต้องการได้
5. สมบัติทางกลหรือทางกายภาพ ควรมีการออกแบบให้ใกล้เคียงกับลักษณะเนื้อเยื่อกระดูก เพื่อคำนึงถึงความแข็งแรง การยึดเกาะของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์

ในปี 2009 งานวิจัยของ Murphy C และคณะ [20] ทำการศึกษาขนาดของรูพรุนที่มีผลต่อการเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไกลโคสะมิโนไกลแคน สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยศึกษาขนาดรูพรุนที่ 85, 120, 164, 190 และ 325 ไมโครเมตร และใช้เซลล์ pre-osteoblastic cell line (MC3T3-E1) พบว่า ที่ขนาดรูพรุน 325 ไมโครเมตร เซลล์มีการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์สูงสุด ทั้งในวันที่ 1, 2 และ 7 ของการเพาะเลี้ยง และมีประสิทธิภาพในการเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์สูงสุด ทั้งในวันที่ 1 และ 2 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zhang Q และคณะ ในปี 2014 [21] ทำการศึกษามลของขนาดรูพรุนบนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน ที่ขนาดรูพรุน 150-250, 250-355, 355-425 และ 425-500 ไมโครเมตร พบว่า ที่ขนาดรูพรุน 250-355 ไมโครเมตร เซลล์มีการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

ในปี 2015 งานวิจัยของ Luo Z และคณะ [22] ทำการศึกษามลขนาดของรูพรุนบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินต่ออัตราการย่อยสลาย โดยผู้วิจัยทดลองใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุน 190, 130, 80 และ 40  $\mu\text{m}$  ทำการย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส IA ที่ความเข้มข้น 1 U/ml บ่มที่ 37 °C พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ยังมีขนาดรูพรุนมาก การย่อยสลายเกิดขึ้นมากตามไปด้วย

## 2.4 ชีววัสดุ (Biomaterials)

### 2.4.1 ไหม (Silk)

ไหม จัดเป็นเส้นใยพอลิเมอร์ธรรมชาติและจัดเป็นโปรตีนที่มีแหล่งผลิตมาจากแมลงในไฟลัม Arthropoda เช่น หนอนไหม แมงมุม แมงป่อง แมลงหูกา และผึ้ง ซึ่งไหมที่ผลิตโดยหนอนไหม เป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นชีววัสดุ หนอนไหมสามารถจำแนกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ไหมป่า (Wild silkworm หรือ Non-mulberry silkworm); ไหมที่กินพืชอื่นที่ไม่ใช่ใบหม่อนเป็นอาหาร และไหมกินใบหม่อน (Mulberry silkworms); ไหมที่เพาะเลี้ยงโดยกินใบหม่อนสด ซึ่งไหมชนิดนี้ถูกนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องด้วยปริมาณผลผลิตที่มีต่อเนื่อง โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* [23]

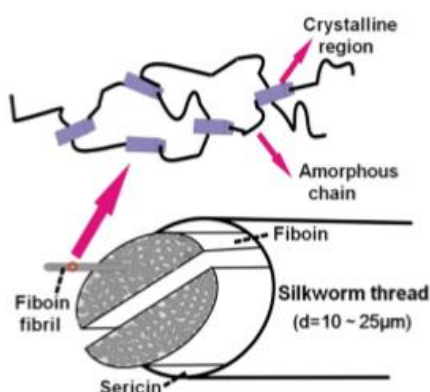


รูปที่ 4 รังไหมและหนอนไหม

([www.silkbimaterials.com](http://www.silkbimaterials.com))

### โครงสร้างและองค์ประกอบของเส้นใยไหม [24]

เส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม *Bombyx mori* เป็นโครงสร้างพอลิเมอร์ประเภทโปรตีน ซึ่งเกิดจากการสังเคราะห์ในต่อมที่ทำหน้าที่พิเศษ 2 ต่อมที่อยู่ที่หัวของหนอนไหม โดยหลังจากการสังเคราะห์แล้วโปรตีนจะถูกส่งไปเก็บที่ช่องว่าง (Lumen) ของต่อมก่อนถูกพ่นมาเป็นเส้นใย เส้นใยไหมมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด ได้แก่ เส้นใยไฟโบรอิน (Fibroin) และเซรีซิน (Sericin) ดังรูปที่ 5 นอกจากนี้เส้นใยไหมยังมีส่วนประกอบอื่นๆอีก ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 5 โครงสร้างของเส้นใยไหมจากหนอนไหม

[25]

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของเส้นใยไหม

องค์ประกอบ	%	อ้างอิง
ไฟโบรอิน (Fibroin)	70-80	[26]
เซรีซิน (Sericin)	20-30	
แว็กซ์ (Wax matter)	0.4-0.8	
คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)	1.2-1.6	
สารอินออร์แกนิก (Inorganic matter)	0.7	
สารสี (Pigment)	0.2	
<b>รวม</b>	<b>100</b>	

### 1. ไฟโบรอิน (Silk fibroin) [23], [24], [27], [28]

ไฟโบรอิน (Silk fibroin) เป็นโปรตีนเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำและเป็นองค์ประกอบหลักของเส้นใยไหม (70-80% โดยน้ำหนัก) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 ไมโครเมตร ไฟโบรอินมีกรดอะมิโน 18 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ดังตารางที่ 3 โดยไฟโบรอินมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine; Gly), อะลานีน (Alanine; Ala), เซรีน (Serine; Ser) และไทโรซีน (Tyrosine; Tyr) ไฟโบรอินมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ 3 ส่วน ได้แก่ สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy chain; H-chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นหน่วยที่ใหญ่ที่สุด โดยทำหน้าที่เป็นตัวยึดกับสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light chain; L-chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) และส่วนที่สาม คือ ไกลโคโปรตีน

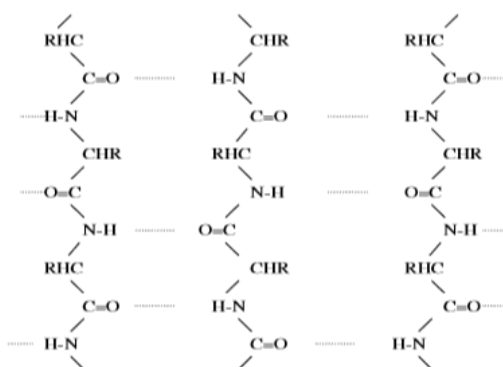
P25 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน โดย P25 เชื่อมด้วยอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) กับ H-L complex และอัตราส่วนของ H-chain : L-chain : P25 คือ 6 : 6 : 1 โดยสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ซึ่งจะมีการเรียงตัวสลับกัน ส่วนที่ไม่ชอบน้ำมีหมู่อะมิโนเรียงตัวซ้ำกัน คือ  $(\text{Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser})_n$  มีปริมาณ 2 ใน 3 ของสายโซ่ ซึ่งมีการจัดโครงสร้างการเรียงตัวเบตาชีท ( $\beta$ -sheet) แบบไม่ขนาน (antiparallel) ดังรูปที่ 6 ขณะบริเวณที่สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความชอบน้ำ (hydrophilic) มากกว่าสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีความยืดหยุ่นสูง



ตารางที่ 3 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไฟโบรอินและเซรีซินของ *Bombyx mori*

กรดอะมิโน	ไฟโบรอิน (g/100 g protein)	เซรีซิน (g/100 g protein)	อ้างอิง
Glycine	42.8	8.8	[24]
Alanine	32.4	4.0	
Leucine	0.7	0.9	
Isoleucine	0.9	0.6	
Valine	3.0	3.1	
Arginine	0.9	4.2	
Histidine	0.3	1.4	
Lysine	0.5	5.5	
Aspartic acid	1.9	16.8	
Glutamic acid	1.7	10.1	
Serine	14.7	30.1	
Threonine	1.2	8.5	
Phenylalanine	1.2	0.6	
Tyrosine	11.8	4.9	
Proline	0.6	0.5	
Methionine	0.2	0.1	
Tryptophan	0.5	0.5	
Cystine	0.1	0.3	



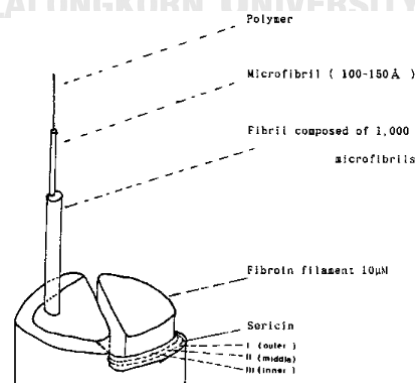


รูปที่ 6 โครงสร้างของไฟโบรอิน; การเรียงตัวของหมู่อะมิโนและลักษณะแผ่นเบต้า ( $\beta$ -sheet)

[26]

## 2. เซริซิน (Sericin) [26], [29]

เซริซิน (Sericin) หรือกาวไหม เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ พบในปริมาณ 20-30% ของ น้ำหนักรังไหม โดยเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มและเคลือบ ยึดเส้นใยไหมไฟโบรอิน 2 เส้นให้ติดกัน มีกรดอะมิโน 18 ชนิดเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับโปรตีนไฟโบรอิน ดังตารางที่ 3 ข้างต้น แต่มีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด คือ ซีรีน (Serine), ทรีโอนิน (Threonine), กรดแอสพาทิก (Aspartic acid) และ กรดกลูตามิก (Glutamic acid) โครงสร้างของเซริซิน แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังรูปที่ 7 ได้แก่ Sericin I ; เซริซินชั้นนอกสุด ละลายน้ำออกง่ายสุด มีประมาณ 40%, Sericin II ; เซริซินชั้นกลางมีประมาณ 40%, และ Sericin III เซริซินชั้นใน มีประมาณ 20% โดย Sericin II และ Sericin III ละลายน้ำได้ยาก



รูปที่ 7 โครงสร้างของเซริซิน (Sericin)

(<http://www.fao.org>)

## สมบัติของไหม [28]

ไหม *Bombyx mori* มีสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่

1. **สมบัติทางกล (mechanical property);** เนื่องจากธรรมชาติของไหมมีโครงสร้างการจัดโครงสร้างการเรียงตัวเบตาชีท ( $\beta$ -sheet) ที่ประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจนภายในโครงสร้างจำนวนมาก [23] จึงทำให้มีสมบัติทางกลที่ดี มีความเหนียวและยืดหยุ่นได้สูง สามารถทนแรงดึงได้ดีเมื่อเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น [28] ดังตารางที่ 4

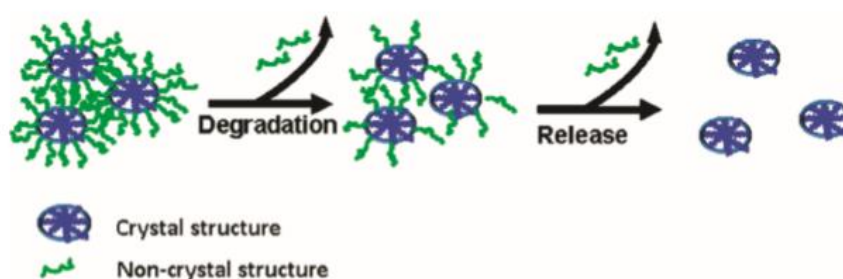
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบสมบัติทางกลของเนื้อเยื่อกระดูก เอ็น และพอลิเมอร์

Material	Modulus (GPa)	Ultimate Tensile strength (MPa)	% Strain at break	อ้างอิง
Bone tissue	20	160	3	[28]
Tendon	1.5	150	12	
<i>B. mori</i> silk	5-17	500-740	4-20	
Spider silk ( <i>N. clavipes</i> )	11-13	875-972	17-18	
Collagen fibers (crosslinked)	0.4-0.8	47-72	12-16	
Polylactid acid (PLA)	1.2-4.0	28-50	2-6	
Poly(methyl methacrylate) (PMMA)	2.4-3.1	55-76	2-5	

2. **การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation);** ไหมสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ แต่อัตราการย่อยสลายของไหมในร่างกายค่อนข้างช้า เนื่องจากโครงสร้างทุติยภูมิของไหมที่เป็นแบบเบตาชีท ( $\beta$ -sheet) ซึ่งมีพันธะไฮโดรเจนภายในโครงสร้างจำนวนมาก และร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์จำเพาะในการย่อยโปรตีนไฟโบรอิน แต่อย่างไรก็ตามมีการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราการ

ย่อยสลายของไหมสามารถควบคุมได้จากปริมาณของเบตาชีท ( $\beta$ -sheet) [9] และอัตราการย่อยสลายของไหมสามารถควบคุมให้เกิดการย่อยสลายได้ตั้งแต่ 1 สัปดาห์จนถึง 1 ปี [30]

งานวิจัยของ Lu Q และคณะในปี 2011 [31] ได้อธิบายกลไกการย่อยสลายของฟิล์มไฟโบรอินไหม ดังรูปที่ 8 คณะวิจัยของเขาทำการย่อยสลายฟิล์มไฟโบรอินไหม ในสารละลายเอนไซม์ protease XIV ที่ความเข้มข้น 0.23 U/ml และพบว่าส่วน Hydrophilic blocks ของไหมจะถูกย่อยสลายเป็นส่วนแรก จากนั้นส่วน Hydrophobic crystal blocks จะเริ่มถูกสารละลายเอนไซม์ไปล้อมรอบ ทำให้เป็น free particles และถูกย่อยสลายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ



รูปที่ 8 กลไกการย่อยสลายไฟโบรอินไหม

[31]

การทดลองของ Zhou J และคณะ ในปี 2010 [32] ที่ทำการย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ขึ้นรูปด้วยวิธี electro spinning ในสารละลาย Phosphate-buffered saline (PBS) และเอนไซม์ protease XIV ความเข้มข้น 1 U/ml พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินสามารถย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ protease XIV และมีการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ถึงร้อยละ 65 ของน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น ในวันที่ 24 ของการทดลอง ขณะที่การย่อยสลายในสารละลาย PBS เกิดการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เพียงร้อยละ 4 ของน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น

นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีวิธีการขึ้นรูปที่ต่างกัน ในสารละลายเอนไซม์ protease XIV ความเข้มข้น 1 U/ml แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีวิธีการขึ้นรูปที่ต่างกัน

โครงเลี้ยงเซลล์	ระยะเวลาในการย่อยสลาย (วัน)	ร้อยละน้ำหนักคงเหลือ	อ้างอิง
Porous SF sheets	15	30	[33]
Biospun silk fibers	28	46	[34]

**3. ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility);** ไหม เป็นโปรตีนที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีการนำไหมมาใช้ทำไหมเย็บแผลมานาน ทำให้เป็นที่รู้ว่าไหมเป็นชีววัสดุที่มีความเข้ากันได้กับร่างกาย ไม่ทำปฏิกิริยากับร่างกาย นอกจากนี้ยังมีผลการทดสอบระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และระดับภายในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ยืนยันว่าไหมมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ [9]

การทดลองของ Correia C และคณะ ในปี 2012 [35] ได้นำ human adipose-derived stem cells มาใช้กับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ขึ้นรูปด้วยการชะล้างเกลือและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay พบว่าไฟโบรอินไม่เป็นที่พิษต่อเซลล์ และเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็น 1.6 เท่าของจำนวนเริ่มต้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Varkey A และคณะ ในปี 2015 [36] ได้นำ human osteoblast-like cell (MG63) มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay กับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ขึ้นรูปในลักษณะ Sponge, Fiber และ Film พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ไม่เป็นที่พิษต่อเซลล์

#### 2.4.2 ไบโอแอคทีฟกลาส (Bioactive glass)

ไบโอแอคทีฟกลาส (Bioactive glass) หรือแก้วที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นหนึ่งในวัสดุอนินทรีย์ที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาที่พื้นผิวได้รวดเร็วเมื่อเข้าสู่ร่างกาย จึงนำมาใช้ในการทดแทน ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของกระดูกที่อาจเกิดจากอุบัติเหตุหรือภาวะเสื่อมถอยของกระดูก ด้วยเหตุนี้ทำให้ไบโอแอคทีฟกลาสแตกต่างจากเซรามิกทั่วไป โดยไบโอแอคทีฟกลาสสามารถควบคุมสมบัติทางเคมี และอัตราการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อให้เหมาะสมเพื่อประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้ [6]

ในปัจจุบันการสังเคราะห์ไบโอแอคทีฟกลาส มีการเติมธาตุต่างๆ เข้าไปเพื่อศึกษาผลของการละลาย อีออนต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก จึงทำให้เกิดไบโอแอคทีฟกลาสชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของไบโอแอคทีฟฟอสซิล

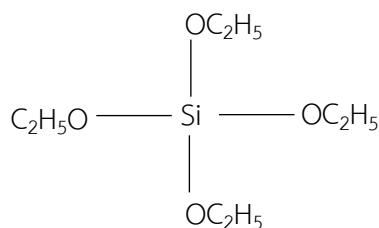
องค์ประกอบทางเคมี (%wt)	สูตรต่างๆของ Bioactive glass [37]							
	45S5	13-93	6P53B	58S	70S30C	13-93B1	13-93B3	P50C35N15
Na <sub>2</sub> O	24.5	6.0	10.3	0	0	5.8	5.5	9.3
K <sub>2</sub> O	0	12.0	2.8	0	0	11.7	11.1	0
MgO	0	5.0	10.2	0	0	4.9	4.6	0
CaO	24.5	20.0	18.0	32.6	28.6	19.5	18.5	19.7
SiO <sub>2</sub>	45.0	53.0	52.7	58.2	71.4	34.4	0	0
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6.0	4.0	6.0	9.2	0	3.8	3.7	71.0
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	19.9	56.6	0

#### การสังเคราะห์ไบโอแอคทีฟฟอสซิลชนิด 70S30C [38], [39], [40]

ไบโอแอคทีฟฟอสซิลชนิด 70S30C ถูกเลือกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้เนื่องจากอึดทนจากกลาสชนิดนี้ส่งเสริมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ อีกทั้งมีความสามารถในการยึดกับกระดูกที่มีชีวิตได้ [41] และที่สำคัญไบโอแอคทีฟฟอสซิลชนิด 70S30C มีสารองค์ประกอบเพียงแค่ 2 ชนิดนั่นคือ SiO<sub>2</sub> และ CaO จึงง่ายต่อการเตรียมสารโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อกระบวนการผลิตถูกปรับเป็นสเกลใหญ่ การสังเคราะห์ไบโอแอคทีฟฟอสซิลชนิด 70S30C สามารถทำได้ดังนี้

#### การสังเคราะห์ส่วนที่เป็นซิลิเกต [40]

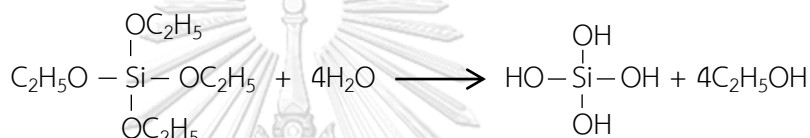
การสังเคราะห์ไฮดรอกซีซิลิเกต (Tetraethoxysilanes ; TEOS, รูปที่ 9) เป็นสารตั้งต้นสำหรับโครงข่ายซิลิเกต การสังเคราะห์จะเริ่มด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ TEOS โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิล (silanol groups; Si-OH) จากนั้นหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่หรือมากกว่าจะเกิดปฏิกิริยาควบน้ำ (condensation reaction) ส่งผลให้เกิดการเชื่อมขวางกันของซิลิกอนผ่านอะตอมของออกซิเจน (Si-O-Si bond ; siloxane bonds) และเกิดเป็นโครงข่ายซิลิเกต ดังรูปที่ 10



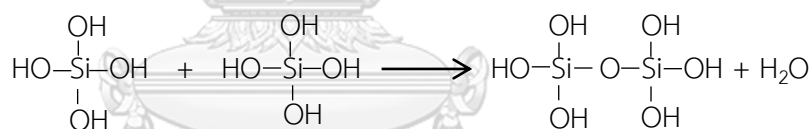
รูปที่ 9 โครงสร้างของเตตระเอทอกซีไซเลน (Tetraethoxysilanes ;TEOS)

[40]

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ;



ปฏิกิริยาควบแน่น ;



รูปที่ 10 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาควบแน่นของเตตระเอทอกซีไซเลน

[40]

การสังเคราะห์ส่วนที่เป็นแคลเซียมออกไซด์ [42]

แคลเซียม เป็นอีกองค์ประกอบสำคัญในไบโอแอคทีฟกลาส ทำหน้าที่เป็น network modifier โดยที่แคลเซียมจะเข้าไปอยู่ในโครงข่ายซิลิเกต ดังรูปที่ 11 โดยแคลเซียมที่นิยมใช้เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ แคลเซียมไนเตรต ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) และแคลเซียมเมทอกซีเอทอกไซด์ ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{CaO}_4$ ) เป็นต้น นอกจากนี้แคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ยังทำหน้าที่เป็นไอออนที่กระตุ้นการสร้างกระดูกเมื่อถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงข่าย แคลเซียมไอออนส่งเสริมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เร่งการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และผลึกของแคลเซียมสามารถรวมตัวเข้ากับกระดูกได้ ทำให้เกิดการยึดกันระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์และเนื้อกระดูก การศึกษา

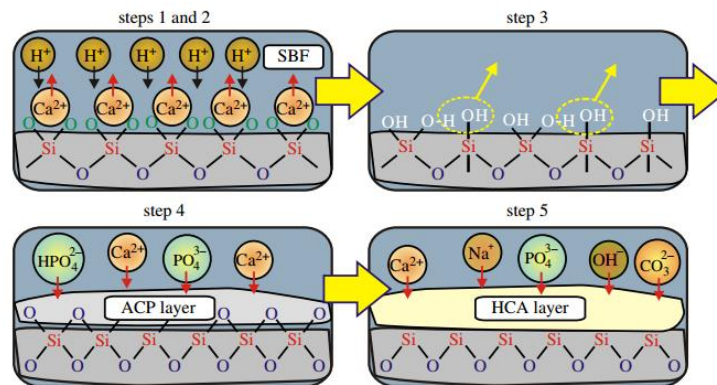
ในปี 1991 ของ Li R และคณะ [43] พบว่าการแทรกเข้าไปของแคลเซียมไอออนในโครงข่ายของซิลิเกต ทำให้ความยาวของโครงข่ายลดลง จึงส่งผลให้การละลายดีขึ้น

ไบโอแอคทีฟกลาสชนิด 70S30C จะถูกเตรียมจากเตตระเอทอกซีไซเลน (Tetraethoxysilanes ;TEOS) และแคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) เมื่อเตตระเอทอกซีไซเลนผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาควบแน่นจนพอร์มตัวเป็นโครงข่ายซิลิเกต จากนั้นจึงใส่แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) ลงไป โดยแคลเซียมไอออนจะเข้าไปอยู่ในโครงข่ายซิลิเกต และทำหน้าที่เป็น network modifier แสดงดังรูปที่ 11



ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อไบโอแอคทีฟกลาสสัมผัสกับของเหลวในร่างกาย [44]

เมื่อไบโอแอคทีฟกลาสสัมผัสกับของเหลวในร่างกาย จะเกิดการย่อยสลายของโครงข่ายไบโอแอคทีฟกลาส โดยมีการแตกตัวของพันธะ ทำให้ไอออนต่างๆถูกปลดปล่อยออกมา มีผลทำให้เกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์รวมตัวได้ดีกับกระดูก ดังแสดงในรูปที่ 12 มีกลไกดังนี้



รูปที่ 12 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเมื่อไบโอแอคทีฟกลาสสัมผัสกับของเหลวในร่างกาย

[44]

**ขั้นที่ 1 ;** เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่าง  $Ca^{2+}$  ที่ผิวของไบโอแอคทีฟกลาสกับ  $H^+$  ในสารละลาย

**ขั้นที่ 2 ;** โครงข่ายซิลิเกตถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะซิลิโคน (silixone bond) เป็นผลให้เกิดการย่อยสลายของไบโอแอคทีฟกลาสและการละลายของอนุพันธ์จากการย่อยสลาย เกิดการฟอร์มตัวเป็น silicic acid;  $Si(OH)_4$  ในสารละลาย และทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลบนผิวไบโอแอคทีฟกลาส



**ขั้นที่ 3 ;** เกิดปฏิกิริยา repolymerization ของชั้นซิลิกา (amorphous  $SiO_2$ -rich layer)



**ขั้นที่ 4 ;** เกิดการละลายของไบโอแอคทีฟกลาส ทำให้ไอออน  $Ca^{2+}$  และ  $(PO_4)^{3-}$  ละลายออกจากไบโอแอคทีฟกลาส ทำให้เกิดชั้นของแคลเซียมฟอสเฟต (amorphous calcium phosphate ; ACP)

**ขั้นที่ 5 ;** ไบโอแอคทีฟกลาสละลายอย่างต่อเนื่อง ชั้นของแคลเซียมฟอสเฟต (amorphous calcium phosphate ; ACP) ร่วมกับ  $(OH)^-$  และ  $(CO_3)^{2-}$  ในสารละลาย เกิดเป็นชั้นไฮดรอกซีคาร์บอเนตอะพาไทต์ (HCA)

ดังนั้น ไฮดรอกซีคาร์บอเนตอะพาไทต์บนพื้นผิว จะช่วยให้ไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมกับกระดูกเกิดการเกาะและเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เกิดการยึดเกาะของเนื้อเยื่อกระดูกตามมา [45]



งานวิจัยของ Jones J.R. และคณะ ปี 2006 [46] ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟฟกลาสชนิด 70S30C ที่มีการเผาผนึกที่อุณหภูมิ 600, 700, 800 และ 1000 °C และศึกษาการละลายและการปลดปล่อยอิออน ของไบโอแอคทีฟฟกลาสในสารละลาย Simulated body fluid (SBF) โดยพบว่าเวลาที่เพิ่มขึ้นอัตราการละลายของซิลิกอนและแคลเซียมจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องมาจากโครงข่ายซิลิเกตถูกทำลาย แต่เมื่อผ่านไป 3 วันอัตราการละลายและการปลดปล่อยจะลดลง สารละลายเริ่มอิมัว ความไวของปฏิกิริยาทางชีวภาพลดลง

เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Midha S และคณะ ในปี 2013 [45] ที่ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟฟกลาสชนิด 70S30C ด้วยวิธี Sol-gel glass foaming และศึกษาการละลายและการปลดปล่อยอิออนของไบโอแอคทีฟฟกลาสในสารละลาย Simulated body fluid (SBF) คณะวิจัยรายงานผลการปลดปล่อยอิออนเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jones J.R. และคณะ ปี 2006 [46] ข้างต้น ที่อัตราการปลดปล่อยอิออนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป และการปลดปล่อยจะลดลงในวันที่ 3

### สมบัติของไบโอแอคทีฟฟกลาส

**1. ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility);** ไบโอแอคทีฟฟกลาส เป็นวัสดุที่ไวต่อปฏิกิริยาชีวภาพ โดยมีคุณสมบัติส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เนื่องจากไบโอแอคทีฟฟกลาสมีอิออนที่เหมือนกับกระดูกมนุษย์ โดยมีการทดลองทั้งระดับห้องปฏิบัติการและระดับสิ่งมีชีวิตที่บ่งชี้ว่าไบโอแอคทีฟฟกลาสไม่เป็นพิษและมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ [37]

การทดลองของ Midha S และคณะ ในปี 2013 [45] ได้นำโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟฟกลาสชนิด 70S30C ที่ขึ้นรูปด้วยวิธี Sol-gel glass foaming มาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ MC3T3-E1 pre-osteoblasts พบว่า ไบโอแอคทีฟฟกลาสไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และเซลล์มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์

**2. การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation);** ไบโอแอคทีฟฟกลาสสามารถถูกย่อยสลายในร่างกายได้เมื่อเวลาผ่านไป และถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อที่บริเวณนั้นๆ ซึ่งอัตราการย่อยสลายสามารถปรับให้สัมพันธ์กับอัตราการเติบโตของเนื้อเยื่อได้ โดยเมื่อไบโอแอคทีฟฟกลาสสัมผัสกับสารละลายในร่างกายมันจะปลดปล่อยอิออนต่างๆ ออกมา [39] การย่อยสลายทำให้น้ำหนักของชิ้นวัสดุไบโอแอคทีฟฟกลาสลดลงด้วย ดังงานวิจัยของ Fu Q และคณะ ในปี 2010 [47] ที่ทำการศึกษาการย่อยสลายไบโอแอคทีฟฟกลาส 3 ชนิด คือ Silicate, borosilicate และ borate ในสารละลาย SBF พบว่าไบโอแอคทีฟฟกลาสทั้ง 3 ชนิด ใช้เวลาในการย่อยสลายถึง 200 ชั่วโมง จึงไม่เกิดการย่อยสลายได้อีก

**3. สมบัติทางกล (mechanical property);** ไบโอแอคทีฟกลาส มีความแข็งแรงทางแรงกดต่ำ เพราะ ไม่ยืดหยุ่น แตกหักง่าย ตารางที่ 7 แสดงตัวอย่างความทนต่อแรงอัดของไบโอกลาสชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกของมนุษย์ อย่างไรก็ตามไบโอแอคทีฟกลาสสามารถปรับให้มีความทนต่อแรงอัดเพิ่มขึ้นโดยลดความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ แต่การลดความพรุนลงอาจมีผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโต

**ตารางที่ 7** เปรียบเทียบสมบัติทางกลของไบโอแอคทีฟกลาสชนิดต่างๆ กับกระดูกมนุษย์

ชนิดของไบโอแอคทีฟกลาส	Compressive strength (MPa)	แหล่งอ้างอิง
70S30C	0.36	[46]
Calcium zirconium silicate ( $\text{Ca}_3\text{ZrSi}_2\text{O}_9$ )	1.3	[48]
Ceramics (Portland+lime+quartz sand+calcium carbonate+aluminum powder)	1.9±0.3	[49]
13-93 bioactive glass	11±1	[50]
Trabecular bone	0.1-16	[51]

## 2.5 กระบวนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ สามารถขึ้นโครงสร้างได้หลากหลายวิธี โดยแต่ละวิธีให้ขนาดรูพรุน (pore size) ความพรุน (porosity) และรูปร่างสัณฐานที่แตกต่างกัน ซึ่งขนาดรูพรุนและความพรุนมีผลต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ เช่น สมบัติทางกล (ความแข็งแรง, ความยืดหยุ่น), อัตราการย่อยสลาย, ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์กับเซลล์, การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะใหม่ เป็นต้น

โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดรูพรุนสามารถขึ้นรูปได้หลายวิธี เช่น การชะล้างเกลือ (salt leaching) กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) และการทำให้เกิดฟอง (foaming) เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 8

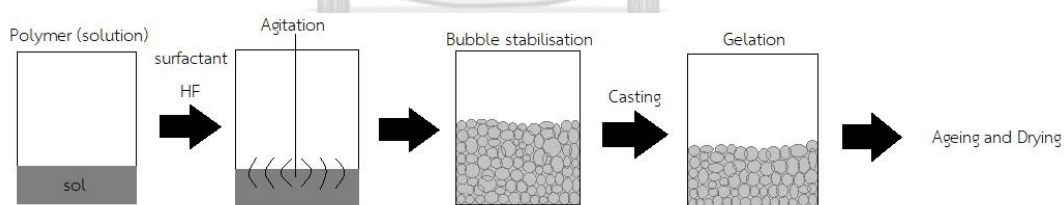
ตารางที่ 8 วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

วิธีการ	การชะล้างเกลือ (salt leaching) [52]	กระบวนการทำแห้งแบบ เยือกแข็ง (freeze drying) [53]	การทำให้เกิดฟอง (foaming) [38]
หลักการ	อนุภาคของเกลือกระจาย ในสารละลายพอลิเมอร์ จากนั้นทำให้พอลิเมอร์ แข็งตัวแล้วทำการล้างเกลือ ออกด้วยน้ำ จะได้โครงเลี้ยง เซลล์ที่มีรูพรุน	แช่แข็งเพื่อเปลี่ยนสถานะ ของน้ำจากของเหลวมาเป็น ของแข็ง จากนั้นทำให้เกิด การระเหิดของน้ำแข็งให้ กลายเป็นไอโดยการปรับ ความดันไอให้น้ำมีค่าต่ำกว่า จุดรวมสามสถานะ ของน้ำ ซึ่งเป็นจุดน้ำในสถานะ ของแข็ง ของเหลว และแก๊ส สมดุลกัน ทำให้ขึ้นงานที่ได้ แห้ง มีรูพรุน และคงรูป	ปั่นกวนสารละลายพอลิ เมอร์ด้วยความเร็วคงตัวจน เกิดเป็น ฟอง อากาศ หลากหลายขนาดกระจาย ภายในโครงสร้าง อาจมีการ ใช้สารเคมีจำพวกสารลด แรงตึงผิวช่วยทำให้เกิดฟอง และสารเคมีเร่งการเกิดเจ ลของโครงร่างเพื่อความ เสถียรและการคงอยู่ของ ฟองอากาศ
porogen	เกลือ	น้ำแข็ง	ฟองอากาศ
ข้อดี	ง่าย ราคาถูก	ใช้กับสารที่มีการสลายตัว ด้วยความร้อนได้ง่าย	- เกิดรูพรุนหลายขนาด เชื่อมต่อกัน - ง่าย ราคาถูก
ข้อเสีย	เกล็ดตกค้างในพอลิเมอร์	- เครื่องมือมีราคาแพง - ใช้เวลาในการทำแห้งแต่ ละรอบนาน 24-72 ชม. - ใช้พลังงานสูง	- ใช้สารเคมีในการทำให้เกิด ฟองและเร่งความเสถียร และคงอยู่ของฟองอากาศ - ควบคุมอัตราเร็วและเวลา ที่ใช้ในการทำให้เกิดฟองทั่ว ภาชนะยาก

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิคการขึ้นรูป Sol-gel foaming process ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีหลักการขึ้นรูปและข้อดีข้อเสียดังนี้

### Sol-gel foaming process [38]

Sol-gel foaming process เป็นเทคนิคการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ก่อให้เกิดโครงร่างสามมิติที่มีรูพรุนหลากหลายขนาดเชื่อมต่อกัน (Interconnected pore) รูพรุนเหล่านี้จะกระจายตัวทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยวิธีการขึ้นรูปแบบนี้จะทำให้เกิดรูพรุนโดยการปั่นกวจนเกิดเป็นฟองอากาศกระจายภายในโครงสร้างซึ่งฟองอากาศเป็นตัวที่ทำให้เกิดรูพรุน (porogen) กระบวนการ sol - gel foaming เริ่มด้วยการนำสารละลายพอลิเมอร์ มาเปลี่ยนสถานะจากของเหลวที่เรียกว่า “Sol” ให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยและเกาะตัวเป็นร่างแหอย่างไม่เป็นระเบียบที่เรียกว่า “Gel” โดยระหว่างกระบวนการเกิดเจล (Gelation) ของพอลิเมอร์ มีการปั่นกวทำให้เกิดฟองอากาศที่ก่อให้เกิดรูพรุนเชื่อมกัน โดยมีสารช่วยทำให้เกิดฟอง (Surfactant/Foaming agent) เช่น Teepol surfactant [54], [46], [55] ,Anionic surfactant SLES [56], [57] เป็นตัวช่วย และในกระบวนการที่เกิดเจลอาจมีการใช้กรด เช่น Hydrofluoric Acid (HF) [46], [54], [58] เป็นตัวเร่งกระบวนการเกิดเจลของโครงร่างเพื่อความเสถียรและคงอยู่ของฟองอากาศ ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 การทำให้เกิดฟอง

[46], [54]

งานวิจัยของ Valliant E และ Jones J.R. ในปี 2011 [38] ได้อธิบายกระบวนการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับงานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยวิธี Sol-gel foaming ที่มีกระบวนการเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pereira M.M และคณะในปี 2005 [54] และงานวิจัยของ Jone J.R. และคณะในปี 2006 [46] โดยมีส่วนผสมของพอลิเมอร์และ alkoxysilane เพื่อสร้างวัสดุคอมโพสิต

คณะวิจัยเตรียมสารละลาย 2 ส่วน คือ ส่วนของสารละลายพอลิเมอร์และ alkoxy silane ผสมรวมกับ Teepol surfactant และ Hydrofluoric Acid (HF) จากนั้นทำการปั่นกวนให้เกิดฟองทั่วภาชนะ ในระหว่างนี้ alkoxy silane จะเกิดปฏิกิริยา polycondensation จนได้ร่างแหที่เสถียรและถึงจุดที่เจล จากนั้นนำไปอบและทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนเพื่อความสะดวกและคงตัวของโครงข่ายเซลล์

#### ข้อดีของวิธีการทำให้เกิดฟอง

1. โครงข่ายเซลล์มีรูพรุนหลากหลายขนาดเชื่อมต่อกัน
2. กระบวนการขึ้นรูปง่าย ไม่ซับซ้อน
3. เครื่องมือที่ใช้มีราคาถูก

#### ข้อเสียของวิธีการทำให้เกิดฟอง

1. กระบวนการขึ้นรูปมีการใช้สารเคมีในการทำให้เกิดฟองและคงความเสถียรของฟองอากาศ
2. ใช้เวลาในกระบวนการขึ้นรูปโครงข่ายเซลล์นาน
3. ควบคุมอัตราเร็วและเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิดฟองทั่วภาชนะยาก

## 2.6 การเชื่อมขวาง (Crosslinking)

การเชื่อมขวาง (Crosslinking) เป็นขั้นตอนหนึ่งของการขึ้นรูปโครงข่ายเซลล์ที่มีความสำคัญมาก เพราะการเชื่อมขวางเป็นกระบวนการสร้างพันธะเคมีภายในหรือระหว่างโมเลกุลของสารที่เป็นองค์ประกอบในโครงข่ายเซลล์ ส่งผลให้สมบัติของโครงข่ายเซลล์ เช่น เสถียรภาพมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น จึงเป็นที่นิยมนำการเชื่อมขวางมาใช้ในการปรับปรุงสมบัติต่างๆ เช่น ปรับปรุงสมบัติทางกล (mechanical property) อัตราการย่อยสลาย (degradation rate) ลดการละลายน้ำ ความสามารถในการบวมน้ำ (swelling capacity) เป็นต้น เพื่อให้มีความเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ การเชื่อมขวางแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การเชื่อมขวางทางเคมี และการเชื่อมขวางทางกายภาพ โดยจะกล่าวถึงการเชื่อมขวางในบริบทของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

### 2.6.1 การเชื่อมขวางด้วยสารเคมี (Crosslinking by chemical agents)

การเชื่อมขวางด้วยสารเคมี เป็นการเชื่อมขวางของโมเลกุลโดยใช้สารเคมีในการเชื่อมขวางเพื่อสร้างพันธะขึ้น โดยพันธะที่เกิดขึ้นเป็นพันธะโควาเลนต์ [59] สารเชื่อมขวางที่นิยมนำมาใช้มีหลายชนิด เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) คาร์โบไดอิมิด (Carbodiimide) เจนิพิน (Genipin) และสารจำพวกอีพอกซี (Epoxy compounds) เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงสารกลุ่มอีพอกซีในบริบทของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

### การเชื่อมขวางด้วยสารกลุ่มอีพอกซี (Epoxy compounds) [60]

สารกลุ่มอีพอกซี เป็นสารเคมีที่ประกอบด้วยวงสามเหลี่ยมมีออกซิเจน 1 อะตอม และคาร์บอน 2 อะตอม ซึ่งจัดเป็นกลุ่มสารอินทรีย์ (organic compounds) สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน (amine) คาร์บอกซิล (carboxyl) และไฮดรอกซิล (hydroxyl)

ตัวอย่างสารกลุ่มอีพอกซีที่นิยมใช้ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก ได้แก่ 3-ไกลซิโดอกซีโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน ((3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane; GPTMS) พอลิเอทิลีนไกลคอลไดไกลซิديلอีเทอร์ (Polyethylene glycol diglycidyl ether) ไกลซิديلเมทิลอีเทอร์ (glycidyl Methyl ether) เป็นต้น แสดงโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มอีพอกซี

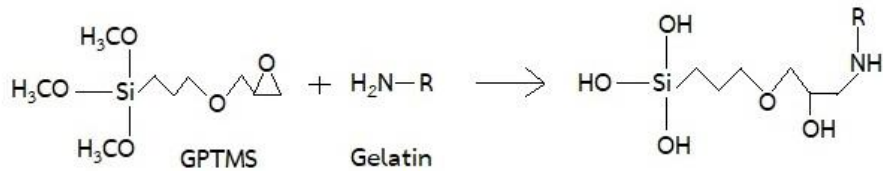
(<http://www.sigmaaldrich.com>)

ในที่นี้จะกล่าวถึงการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกด้วย 3-ไกลซิโดอกซีโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน ((3-Glycidoxypropyl) trimethoxysilane; GPTMS) ที่นิยมใช้เพื่อเชื่อมขวางโครงข่ายซิลิเกตกับสารอินทรีย์อื่นๆ [61-68]

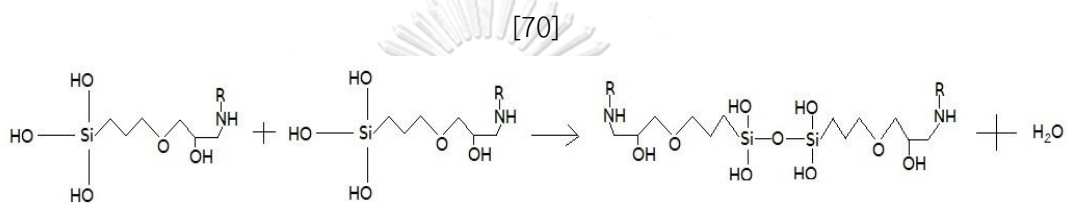
**3-ไกลซิโดอกซีโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน ((3-Glycidoxypropyl) trimethoxysilane; GPTMS) [69], [70]**

GPTMS เป็นสารเชื่อมขวางกลุ่มไซเลน (silane coupling agent) ที่ประกอบด้วย หมู่อีพอกซี (epoxy group) และหมู่เมทอกซีไซเลน (methoxysilane) โดยวงออกซิเรน (oxirane) บนโมเลกุล

GPTMS สามารถทำปฏิกิริยาและสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่เอมีน (amine group) ดังรูปที่ 15 ซึ่งเป็นตัวอย่างปฏิกิริยาการสร้างพันธะของ GPTMS กับเจลาติน



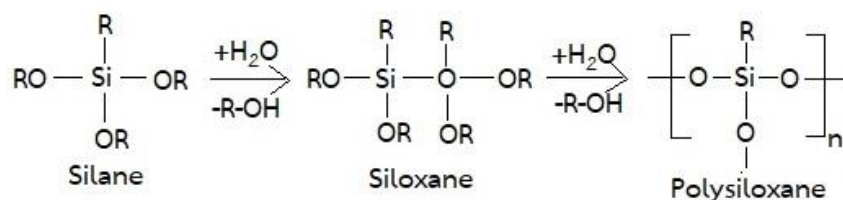
รูปที่ 15 การเชื่อมขวางของวงออกซิเรนกับหมู่เอมีน



รูปที่ 16 การเกิด Si-O-Si bond โดยผ่านปฏิกิริยาควบแน่น (condensation reaction)

[70]

ขณะเดียวกันหมู่เมทอกซีไซเลน (methoxysilane) ที่อีกปลายด้านหนึ่งของ GPTMS เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิล (silanol groups; Si-OH) จากนั้นหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่สามารถเกิดปฏิกิริยาควบแน่น (condensation reaction) ส่งผลให้เกิดพันธะ Si-O-Si (รูปที่ 16) มากไปกว่านั้นการควบแน่นของหมู่ไฮดรอกซิลนี้ยังสามารถเกิดเป็น Polysiloxane network ได้โดยปฏิกิริยา Polycondensation เมื่อมีหมู่ไฮดรอกซิล (Silane) ที่เพิ่มขึ้น [71] ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 การเกิด Polysiloxane network โดยปฏิกิริยา Polycondensation

[71]

ในปี 2004 Liu Y.L. และคณะ [72] นำสารเชื่อมขวาง GPTMS มาใช้เชื่อมขวางเมมเบรนโคโตนกับซิลิกาและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด MG-63 osteoblast-like คณะวิจัย พบว่าเมมเบรนโคโตนกับซิลิกาเชื่อมด้วย GPTMS ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ อีกทั้ง Si-OH และ Si-O-Si จาก GPTMS ยังส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย ผลการทดลองของ Liu Y.L. และคณะ สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Tonda-Turo C และคณะ ในปี 2011 [70] ที่นำ GPTMS มาเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน และทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ MG-63 osteoblast-like

**ข้อดีของการเชื่อมขวางทางเคมี คือ**

1. ประสิทธิภาพการเชื่อมขวางสูง

**ข้อเสียของการเชื่อมขวางทางเคมี คือ**

1. มีสารเคมีตกค้าง ซึ่งสารเคมีเชื่อมขวางบางชนิดอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษ
2. ต้องทำการล้างสารเชื่อมขวางส่วนเกินออก
3. ราคาสูงเมื่อเทียบกับการเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพ

### 2.6.2 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพ (Crosslinking by physical means)

ตัวอย่างการเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การเชื่อมขวางด้วยรังสี (Irradiation-based techniques) การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal method) การเชื่อมขวางโดยใช้พลาสมา (plasma method) เป็นต้น

#### การเชื่อมขวางด้วยรังสี (Irradiation-based techniques) [60], [73], [74]

การเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยรังสี เป็นการนำพลังงานจากรังสีถ่ายทอดไปยังโมเลกุลซึ่งโดยมากเป็นพอลิเมอร์จนเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในโครงสร้างของโมเลกุลพอลิเมอร์ เช่น การเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) โดยอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากัน เกิดเป็นพันธะเคมีเชื่อมระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ โดยมีปฏิกิริยาหลักเกิดขึ้น 2 ชนิด คือ การเกิดการเชื่อมขวาง (Crosslinking) และการแตกสลาย (Degradation) ทั้ง 2 ปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้พร้อมๆ กัน โดยมีปฏิกิริยาอันใดอันหนึ่งที่เกิดขึ้นมากกว่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ รังสีที่ฉายและปริมาณรังสีที่ฉาย การเชื่อมขวางและการแตกสลายที่เกิดขึ้นจะส่งผลถึงคุณสมบัติทางกลและทางความร้อนของพอลิเมอร์ รังสีที่นิยมนำมาใช้ในการเชื่อมขวาง ได้แก่ รังสีแกมมา รังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น



รังสีอัลตราไวโอเลตมีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางโม่เลกุลจำพวกโปรตีน นิยมนำวิธีการเชื่อมขวางนี้มาใช้เชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน หรือโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากวิธีนี้ไม่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งทำให้ไม่มีผลต่อการสลายตัวของคอลลาเจนเมื่อในสภาวะที่มีความร้อนสูง [73]

#### **การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment ; DHT) [60]**

การเชื่อมขวางด้วยความร้อน เป็นการนำความร้อนหรืออุณหภูมิที่สูง (สูงกว่า 100 องศาเซลเซียส) ภายใต้สภาวะสุญญากาศมาใช้ โดยในกระบวนการเชื่อมขวางเกิดปฏิกิริยาควบแน่น (condensation) กำจัดโม่เลกุลน้ำออก ผ่านการเกิดปฏิกิริยาของ 2 หมู่ฟังก์ชัน อาทิ หมู่คาร์บอกซิล, หมู่เอมีน และหมู่ไฮดรอกซิล วิธีการเชื่อมขวางนี้นิยมใช้ในพอลิเมอร์จำพวกพอลิอีเทอร์ (polyethers) พอลิเอสเทอร์ (polyesters) พอลิเอมีน (polyamines) พอลิเอไมด์ (polyamides) เป็นต้น การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้ง่ายและปลอดภัย แต่ความร้อนสูงก็อาจทำให้เกิดการเสียด่างได้ ดังนั้นจึงไม่เหมาะกับการเชื่อมขวางโปรตีนที่เสียด่างได้ง่าย

#### **การเชื่อมขวางโดยใช้พลาสมา (Plasma method) [60]**

พลาสมา คือ สภาวะที่ก๊าซเกิดการแตกตัว ประกอบด้วยอิเล็กตรอน ไอออน และอนุภาคของก๊าซ ในสัดส่วนที่ทำให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์ ทำให้พลาสมาคงสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้า

การเชื่อมขวางโดยใช้พลาสมา เป็นการตัดแปลงพื้นผิวของวัสดุ เกิดได้โดยการนำก๊าซที่ต้องการทำให้กลายเป็นพลาสมาอยู่ในสภาวะกระตุ้นตลอดเวลาเกิดเป็นไอออน อิเล็กตรอน และอนุภาคของก๊าซ จากนั้นนำเอาวัสดุเข้าไปอยู่ในพลาสมา ซึ่งอนุภาคที่ไม่เสถียรเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของมอนอเมอร์จนเกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งอนุมูลอิสระสามารถเข้าไปเกิดปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของมอนอเมอร์เกิดพันธะโควาเลนต์กัน ซึ่งการเชื่อมขวางนี้ไม่เหมาะสมกับวัสดุปริมาณมวล (bulk material)

**ข้อดีของการเชื่อมขวางทางกายภาพ คือ**

1. ไม่มีสารเคมีที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษตกค้างภายในวัสดุ
2. ราคาถูก

**ข้อเสียของการเชื่อมขวางทางกายภาพ คือ**

1. ประสิทธิภาพการเชื่อมขวางต่ำ
2. ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวางได้ยาก

ตารางที่ 9 งานวิจัยที่ศึกษาการขึ้นรูป Scaffolds ด้วยกระบวนการทำให้เกิดฟอง (Sol-gel foaming)

ลำดับ	รูปแบบโครงสร้างเชิงเซลล์	สารที่ทำให้เกิดฟอง (Surfactant)	สารเร่งการเจล (Gelation catalyst)	สารเชื่อมขวาง (Crosslinker)	กระบวนการขึ้นรูป	แหล่งอ้างอิง
1	โพลีเอคทีพกลาสชนิด 70S30C 50 ml	Teepol 0.35 ml	Hydrofluoric acid (HF) 5% v/v ปริมาตร 1.5 ml	-	ผสมสารละลายรวมกับสารที่ทำให้เกิดฟองและสารเร่งการเจล จากนั้นปั่นจนให้เกิดฟองทั่ว ภาชนะจนถึงจุดที่สารละลายเจล จากนั้นอบที่ 60 °C, 130 °C, 600 °C และ 800 °C	[45]
2	โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ - โพลีเอคทีพลาส อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก (50% PVA)/(35% SiO <sub>2</sub> -15% CaO)	Surfactant sodium lauryl ether sulfate 27% v/v	Hydrofluoric acid (HF) 48% v/v	-	ผสมสารละลายรวมกับสารที่ทำให้เกิดฟองและสารเร่งการเจล จากนั้นปั่นจนให้เกิดฟองทั่ว ภาชนะจนถึงจุดที่สารละลายเจล จากนั้นอบที่ 40 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์	[57]

3	<p>ไบโอแอคทีฟกลาส (70.5wt%TEOS-3.5wt%CaO)-พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) (18.9 wt%)-โซเดียมอัลจิเนต (7.05wt%)</p>	Sodium lauryl sulphate (SLS) 3% v/v	Hydrofluoric acid (HF) 5% v/v	-	เตรียมสารละลาย TEOS-CaO ก่อน จากนั้นนำสารละลาย PVA, โซเดียมอัลจิเนต, สารที่ทำให้เกิดฟองและสารเร่งการเจลดิมลง ปั่น กวนให้เกิดฟองทั่วภาชนะจนถึงจุดที่ สารละลายเจลด จากนั้นอบที่ 60 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	[58]
4	<p>โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) - ไบโอแอคทีฟกลาส (58SiO<sub>2</sub>-33CaO-9P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 80/20, 70/30 และ 60/40</p>	Sodium lauryl sulphate (SLS)	Hydrofluoric acid (HF) 10% v/v	-	ผสมสารละลาย PVA และไบโอแอคทีฟกลาสร่วมกับสารที่ทำให้เกิดฟอง และสารเร่งการเจลด จากนั้นปั่นกวน ให้เกิดฟองทั่วภาชนะจนถึงจุดที่ สารละลายเจลด จากนั้นอบที่ 40 °C เป็นเวลา 192 ชั่วโมง	[49]

5	ไปโอแอคทีฟกลาส-พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 90/10, 80/20, 70/30	Teepol	Hydrofluoric acid (HF) 5% v/v	-	ผสมสารละลายทั้งหมดและปั่นจนทำให้เกิดฟอง จากนั้นนำมาอบที่ 40 °C เป็นเวลา 3 วัน และอบแห้งที่ 40 °C เป็นเวลา 3 วัน	[54]
6	กลาส 3 ชนิด คือ 1. SiO <sub>2</sub> (100S) 2. 70 mol% SiO <sub>2</sub> – 30 mol CaO (70S30C) 3. 60mol% SiO <sub>2</sub> - 36mol% CaO – 4 mol% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (58S)	Teepol (0.25, 0.5, 0.65, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 3 ml)	Hydrofluoric acid (HF) ปริมาตร 1.5 ml	-	ผสมสารละลายและปั่นจนทำให้เกิดฟองทั้งหมดที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นนำมาอบที่ 60 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง, อบที่ 130 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และอบที่ 600 °C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง	[55]

ตารางที่ 10 งานวิจัยที่ศึกษาการเชื่อมขวางด้วย GPTMS

ลำดับ	รูปแบบชีวิต	ปริมาณสารเชื่อมขวาง	วิธีการเชื่อมขวาง	อ้างอิง
1	ฟิล์มโพรอินใหม่	10-70% โดยน้ำหนัก	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสมในสารละลายโพรอินใหม่ ปั่นรวมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที	[61]
2	โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน - ซิลิกาที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 60% โคอโตซาน - 40%ซิลิกา และ 40% โคอโตซาน-60% ซิลิกา	อัตราส่วน 4:1 และ 1:4 โมลของโคโตซานต่อ GPTMS	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสมในสารละลายโคโตซานที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงใส่สารละลายซิลิกา และปั่นรวมต่อ 1 ชั่วโมง	[62]
3	โครงเลี้ยงเซลล์โพรแอกทีฟฟอสเฟต - เจลาตินที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 30% (SiO <sub>2</sub> - CaO) - 70% เจลาติน	12.65 wt%	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสมในสารละลายเจลาตินก่อน หลังจากนั้นใส่สารละลายโพรแอกทีฟฟอสเฟต	[63]

4	เส้นใยกรดแกมมาพอลิกลูตามิก - ซิลิกาที่อัตราส่วนผสมโดย %โมล (1-0, 5:3, 1:1, 3:5)	0.18 กรัม	ผสมสารละลายกรดแกมมาพอลิกลูตามิก - ซิลิกาเป็นก้อนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อน จากนั้นใส่ GPTMS และปั่นกวาดต่อ 30 นาที	[64]
5	เมมเบรนไคโตซาน (2%w/v) - คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (2%w/v) - ซิลิกา	1% v/v	ผสมสารละลายไคโตซานและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเข้าด้วยกัน จากนั้นใส่ GPTMS และปั่นกวาดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	[65]
6	โครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซาน - ซิลิกา ที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 65% ไคโตซาน - 35% ซิลิกา และ 50% ไคโตซาน - 50% ซิลิกา	0.55 กรัม, 2.3 มิลลิโมล (อัตราส่วน 4:1 โมลของไคโตซานต่อ GPTMS )	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสมในสารละลายไคโตซาน ปั่นกวาดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นค่อยใส่สารละลายซิลิกา และปั่นกวาดต่อ 1 ชั่วโมง	[66]
7	เส้นใยนาโนเจลาตินที่ระดับความเข้มข้น 8, 10, 12, 15, 18 และ 20% w/v	92 ไมโครลิตรต่อเจลาติน 1 กรัม	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสมในสารละลายเจลาติน ปั่นกวาดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	[70]

8	โคโรนเดียเซลล์ bis (3-aminopropyl) polyethylene glycol (dPEG) - ซิลิกา	อัตราส่วน 1:2 และ 1:4 ไม่ ของ dPEG ต่อ GPTMS	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสม ในสารละลาย dPEG ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่สารละลายซิลิกา และปั่นกวนต่อ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 °C	[68]
9	เส้นใยเจลลาตินชนิดเอ 35 wt% - ไบโอแอคทีฟกลาส (70SiO <sub>2</sub> - 25CaO - 5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mol %))	50 wt%	ผสมสารละลายเจลลาติน - ไบโอแอคทีฟกลาส ปั่นกวนที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นใส่ GPTMS และปั่นกวนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง	[67]
10	ฟิล์มเจลลาตินความเข้มข้น 2.5 w/v	อัตราส่วนโดยโมลของหมู่ อะมิโน (hydroxylysine, lysine และ arginine) จาก เจลลาติน : GPTMS เป็น 2 : 1	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสม ในสารละลายเจลลาติน ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็น เวลา 30 นาที	[69]
11	เมมเบรนโคโตนาน 1.5 wt%	5, 10, 20, 30, 40, 50 wt%	เชื่อมขวางแบบผสมในสารละลาย โดยนำ GPTMS ผสม ในสารละลายโคโตนาน ปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	[72]

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 ไหมไทย *Bombyx mori* (พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1, ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา)

3.1.2 เตตระเอทอกซีไซเลน (Tetraethoxysilanes; TEOS, Sigma-Aldrich, จีน)

3.1.3 แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ; Ajax Finechem, Pty' Ltd, ออสเตรเลีย)

3.1.4 3-ไกลซิโดอกซีโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน ((3-Glycidoxypropyl) trimethoxysilane; GPTMS, Gelest, Inc, สหรัฐอเมริกา)

3.1.5 ไฮโดรคลอริก (HCl; 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, สหรัฐอเมริกา)

3.1.6 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr; Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน)

3.1.7 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Ajax Finechem, Pty' Ltd, ออสเตรเลีย)

3.1.8 น้ำปราศจากประจุ (Deionized Water)

3.1.9 เอทานอล (99.9%, VWR international Ltd., อังกฤษ)

3.1.10 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, Bio Basic Inc., ญี่ปุ่น)

3.1.11 โซเดียมเอไซด์ ( $\text{NaN}_3$ , Labchem, ออสเตรเลีย)

3.1.12 โปรติเอส XIV (Protease = 3.5 U/mg, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน)

3.1.13 สารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ (Simulated body fluid; SBF)

3.1.14 เอทานอลามีนบัฟเฟอร์ (Ethanalamine, 0.88 mol/L, pH 11, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

3.1.15 O-cresolphthalein complex substrate (OCPC, MW = 636.62, Sigma-Aldrich, ญี่ปุ่น)

3.1.16 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

3.1.17 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

3.1.18 Penicillin/streptomycin antibiotic (Hyclone, สหรัฐอเมริกา)



- 3.1.19 Trypsin-EDTA (Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.20 Sodium dodecyl sulfate lysis buffer (SDS, Bio basic, แคนาดา)
- 3.1.21 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.22 p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.23 p-Nitrophenol standard solution (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.24 Trypan blue stain 0.4 % (Gibco, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.25 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.26 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

## 3.2 อุปกรณ์

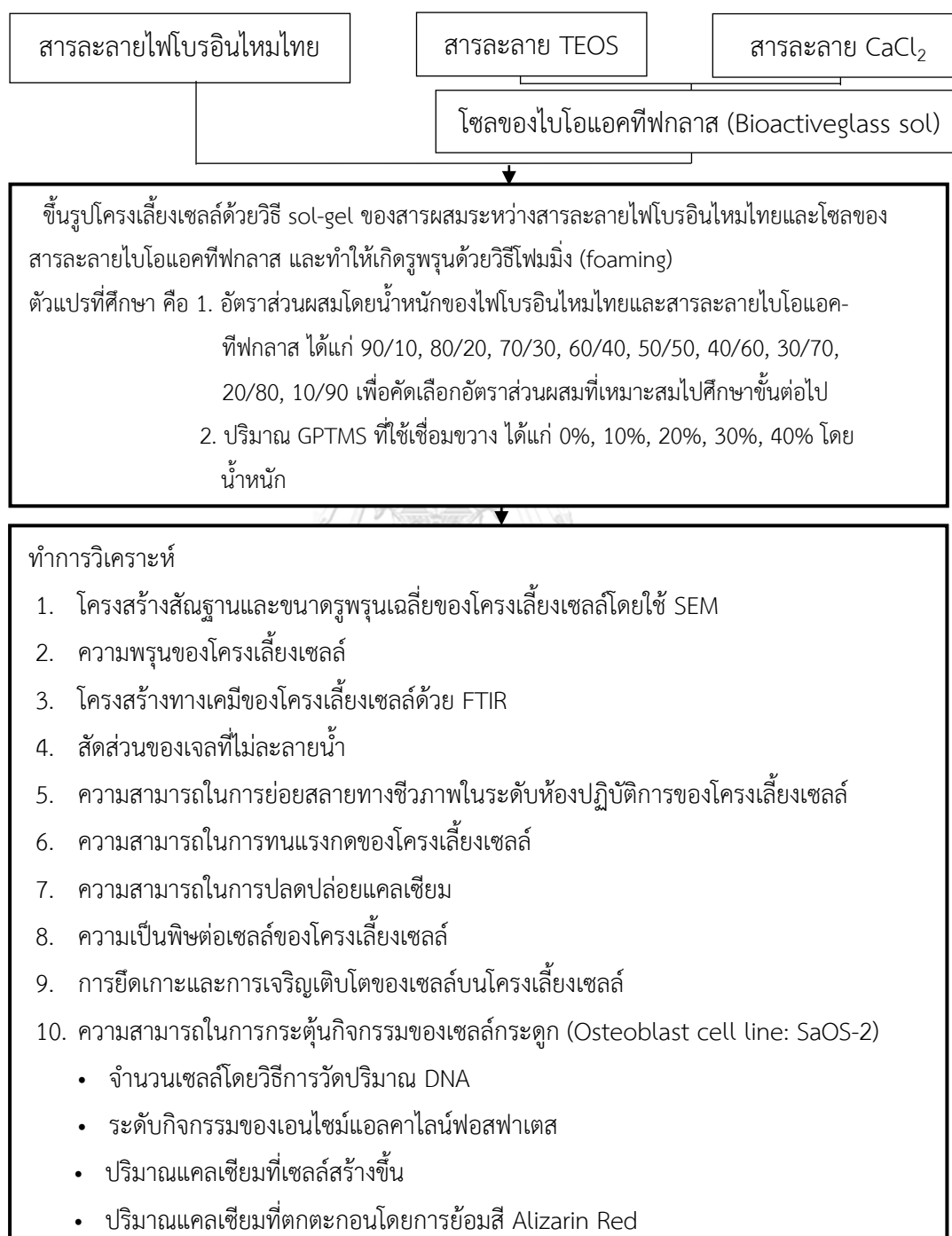
- 3.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)
- 3.2.2 เครื่อง Microplate reader (FLUOstar, Omega, BGM LABTECH, เยอรมัน)
- 3.2.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, professional meter PP-50, เยอรมัน)
- 3.2.4 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (NR-BU343, Panasonic, ไทย)
- 3.2.5 เครื่องตีฟองนม (Koffeemart, จีน)
- 3.2.6 ตู้อบความร้อน (VD23, Binder, เยอรมัน)
- 3.2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1235 PC, Shel-Lab, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.8 ตู้ดูดไอสารเคมี (fume hood, proLAB Laboratory, แคนาดา)
- 3.2.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow, Mars 1800, Scanlaf, เดนมาร์ก)
- 3.2.10 ตู้เลี้ยงเซลล์บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> Incubator, Galaxy 170R, New Brunswick, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.11 เครื่องชั่งน้ำหนักจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo AG, สวิตเซอร์แลนด์)
- 3.2.12 เครื่องชั่งน้ำหนักจุดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (RADWAG Wagi Elektroniczne, โปแลนด์)
- 3.2.13 เตาไฟฟ้า (Electric Hot Plate, HOUSE WORTH, จีน)
- 3.2.14 Magnetic stirrer/ Hot plate (RCT Basic, lka labortechnik, เยอรมัน)
- 3.2.15 Autopipette (Eppendorf, เยอรมัน)

- 3.2.16 ถังไดอะไลซิส (MWCO 12000-16000 Viskase Company Inc, ญี่ปุ่น)
- 3.2.17 Hemocytometer (Counting Chamber, Boeco, เยอรมัน)
- 3.2.18 24, 96-Well Polystyrene tissue culture plates (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.19 Tissue culture dish (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.20 หลอดทดลอง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tubes, Jet Biofil®, จีน)
- 3.2.21 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscopes, Eclipse TS100, Nikon, ญี่ปุ่น)
- 3.2.22 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sandenintercool, ไทย)
- 3.2.23 ตู้แช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส (Haier, จีน)
- 3.2.24 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (New Brunswick scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.25 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry, CHRIST®, เยอรมัน)
- 3.2.26 Microcentrifuge tube (Hycon plastics, ไทย)



### 3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกเป็นการศึกษาการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ และการเชื่อมขวางทางเคมีด้วย GPTMS และส่วนที่สองเป็นการวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 แผนการดำเนินงานวิจัย

### 3.3.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส

#### 3.3.1.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย

ตามรายงานของ Kim U.J และคณะ ปี 2005 [75] แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 19

##### 1) การกำจัดกาวไหม (Degumming)

1.1) นำรังไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 มาทำความสะอาดดึงปุ๋ยไหมและตัวดักแต่ ออก ซึ่งรังไหมน้ำหนัก 40 กรัม

1.2) นำรังไหม 40 กรัม มาต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที

1.3) นำรังไหมที่ต้มแล้วมาล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ (Deionized water) ประมาณ 4-5 รอบ เพื่อกำจัดส่วนของกาวไหมและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

1.4) ทำซ้ำข้อ 1.2) - 1.3) อีก 1 รอบ

1.5) นำเส้นไหมที่ผ่านการกำจัดกาวไหมไปผึ่งตากแห้งประมาณ 2 วัน

1.6) นำเส้นไหมที่แห้งมาฉีกให้ฟู เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

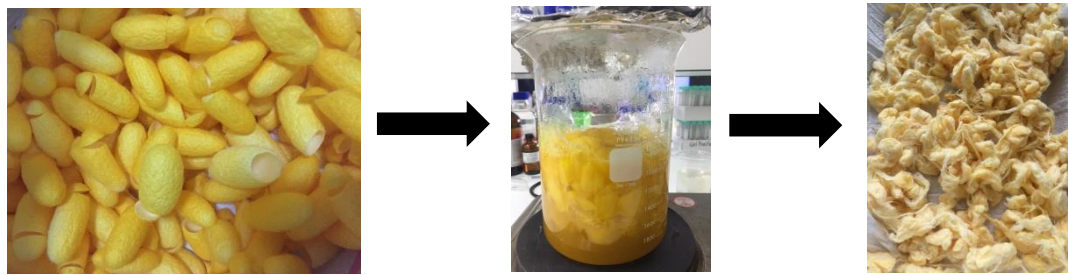
##### 2) การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

2.1) นำเส้นไหมไฟโบรอินมาละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ด้วยอัตราส่วนไหม 4 กรัมต่อ LiBr 16 มิลลิลิตร จำนวน 2 บีกเกอร์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สารละลายไฟโบรอิน

2.2) นำสารละลายไฟโบรอินมาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากประจุ เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) โดยการเปลี่ยนน้ำในนาที่ที่ 15, 35 และ 55 ของชั่วโมงแรก จากนั้นเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้งเป็นเวลา 3 วัน

2.3) เมื่อไดอะไลซ์เสร็จเก็บสารละลายไฟโบรอินไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน

2.4) คำนวณความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินโดยการอบแห้ง โดยสารละลายไฟโบรอินที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 5-7% โดยน้ำหนัก



รังไหมไทย

ต้มใน  $0.02\text{ M Na}_2\text{CO}_3$   
20 นาที (2 ครั้ง)

เส้นใยไฟโบรอิน



สารละลายไฟโบรอิน



ไดอะไลซิสในน้ำปราศจากไอออน



ละลาย  $9.3\text{ M LiBr } 60\text{ }^\circ\text{C}$   
4 ชม.

รูปที่ 19 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3.1.2 การเตรียมโซลของไปโอแอกทีฟกลาส

ดัดแปลงจากรายงานของ Mahony O และคณะ ปี 2010 [76] และ Midha S และคณะ ปี 2013 [45] แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

#### 1) การเตรียมสารละลาย TEOS

1.1) ละลายเตตระเอทอกซีไซเลน (TEOS) ในน้ำปราศจากไอออนที่มีกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล โดยสัดส่วนของน้ำปราศจากประจุต่อกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็น 3:1 มิลลิลิตร และสัดส่วนของเตตระเอทอกซีไซเลนต่อน้ำ เป็น 4:1 โมล

1.2) ทำการปั่นกววน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสและควบแน่น จนได้สารละลายที่มีลักษณะเหมือนเนื้อเดียวกันและใส

## 2) การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

2.1) เตรียมสารละลายแคลเซียม โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) เป็นสารตั้งต้น ซึ่งละลายในน้ำปราศจากประจุ โดยสัดส่วนของแคลเซียมคลอไรด์ต่อน้ำปราศจากประจุ เป็น 4:1 โมล

2.2) ทำการปั่นกวน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายใสเนื้อเดียวกัน

นำสารละลาย TEOS จากข้อ 1 และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จากข้อ 2 ผสมกันโดยกำหนดสัดส่วนซิลิกาต่อแคลเซียมออกไซด์เป็น 70%โมล ต่อ 30%โมล ปั่นกวนจนสารละลายใสเนื้อเดียวกัน

### 3.3.2 การขึ้นรูปและการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์

3.3.2.1. ศึกษาผลของอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายไบโอแอคทีฟกลาสต่อการขึ้นรูป

นำสารละลายไฟโบรอินและสารละลายไบโอแอคทีฟกลาสที่เตรียมจากข้างต้นมาผสมกันตามอัตราส่วนโดยน้ำหนัก คือ 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 10/90 เพื่อศึกษาการเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลาย 2 ส่วนเมื่อผสมกันเป็นสารละลายรวมและการขึ้นรูปเบื้องต้น

#### 3.3.2.2 การศึกษาการขึ้นรูปและการเชื่อมขวางของโครงเลี้ยงเซลล์

การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS โดยวิธีโฟมมิ่ง (foaming)

1) นำสารละลายไฟโบรอินมาเติมหมู่ฟังก์ชัน (functionalize) ด้วยการเติม GPTMS จนได้ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30% และ 40%wt แล้วทำการปั่นกวนเบาๆ เป็นเวลา 1 นาที

2) นำสารละลายไบโอแอคทีฟกลาสที่เตรียมข้างต้นในข้อ 3.3.1.2 มาผสมกับสารละลายไฟโบรอินที่เติมหมู่ฟังก์ชันแล้ว โดยอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยต่อโซลของไบโอแอคทีฟกลาส เป็น 1:1 แล้วทำการปั่นกวนเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที

3) นำสารละลายมาตีฟองขึ้นรูปด้วยเครื่องตีฟองนมที่ระดับความเร็ว 8000 รอบ/นาที ทำการตีปั่นกวนจนสารละลายหนืดและคงรูป จากนั้นปิดปากปิกเกอร์พลาสติกด้วยฟอยล์และนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

4) เมื่ออบที่ 60 องศาเซลเซียส ครบ 3 วัน นำพอยล์ที่ปิดปากบีกเกอร์ออก จากนั้นอบที่ 60 องศาเซลเซียส ต่ออีกเป็นเวลา 1 วัน

### 3.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพของโครง เลี้ยงเซลล์

#### 3.3.3.1 การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยผสมไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่มีความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30% และ 40%wt ถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) โดยตัดโครงเลี้ยงเซลล์ในแนวตัดขวาง (cross-section) จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปวางบนแท่นเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปเคลือบด้วยทองเพื่อให้ชิ้นงานเกิดการนำไฟฟ้า และส่องด้วยกล้องที่กำลังขยาย 50 และ 100 เท่า จากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดรูพรุนโดยโปรแกรม Image J วัดขนาดรูพรุนทั้งหมด 100 จุด ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนแบบสุ่ม 100 รู

#### 3.3.3.2 การวิเคราะห์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity)

การวิเคราะห์ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ สามารถทำได้โดยใช้หลักการการแทนที่ของของเหลว ในที่นี้ใช้เฮกเซน (Hexane) ซึ่งมีความสามารถในการซึมผ่านโครงเลี้ยงเซลล์โดยไม่ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการบวมหรือหดตัว [75] โดยเริ่มจากการชั่งน้ำหนักสารละลายเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ( $W_1$ ) จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในสารละลายเฮกเซน เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เฮกเซนซึมเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ แล้วชั่งน้ำหนักทั้งหมดของเฮกเซนที่มีโครงเลี้ยงเซลล์แช่อยู่ ( $W_2$ ) จากนั้นเอาโครงเลี้ยงเซลล์ออกและชั่งน้ำหนักของเฮกเซนที่เหลืออยู่ ( $W_3$ ) โดยความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์} = \frac{W_1 - W_3}{W_2 - W_3} \times 100$$

- โดยที่  $W_1$  = น้ำหนักของสารละลายเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร  
 $W_2$  = น้ำหนักทั้งหมดของเฮกเซนที่มีโครงเลี้ยงเซลล์แช่อยู่ด้วย  
 $W_3$  = น้ำหนักของเฮกเซนที่เหลืออยู่ภายหลังจากนำโครงเลี้ยงเซลล์ออก

ค่าที่ได้จะต้องนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำซ้ำ 5 ซ้ำ (n=5)

### 3.3.3.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

วิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย, โครงเลี้ยงเซลล์ไปโอแอคทีฟกลาส, GPTMS, โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยเชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่มีความเข้มข้น 10%, 20%wt และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมของไฟโบรอินไหมไทยและไปโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS 10%wt วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer, Perkin Elmer โดยเทคนิค Attenuated Total Reflectance ที่ช่วงความยาวคลื่น 4000-400 ต่อเซนติเมตร

### 3.3.3.4 การศึกษาสัดส่วนของเจลที่ไม่ละลายน้ำ (gel fraction) ของโครงเลี้ยงเซลล์

- นำโครงเลี้ยงเซลล์แห้งน้ำหนัก  $10 \pm 1$  มิลลิกรัม ขนาด 2 มิลลิเมตร  $\times$  2 มิลลิเมตร  $\times$  2 มิลลิเมตร แช่ในน้ำปราศจากประจุ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหลืออยู่ในน้ำหลังการบ่มไปอบแห้ง และชั่งน้ำหนักแห้ง คำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์จากสูตร

$$\text{ร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไป} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

- โดยที่  $W_0$  = น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในน้ำปราศจากประจุ  
 $W_1$  = น้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในน้ำปราศจากประจุเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค่าที่ได้จะต้องนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำซ้ำ 4 ซ้ำ (n=4)



### 3.3.3.5 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro biodegradation) ของโครงเลี้ยงเซลล์

การทดสอบการย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ ในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV (protease XIV) ในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้โดย

1) ชั่งน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์  $50 \pm 1$  มิลลิกรัม ขนาด 5 มิลลิเมตร  $\times$  5 มิลลิเมตร  $\times$  5 มิลลิเมตร จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเอนไซม์โปรตีเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 วัน เก็บผลช่วงเวลา 1, 3, 5, 7, 10 14, 20 และ 28 วัน

2) นำโครงเลี้ยงเซลล์มาล้างน้ำปราศจากไอออน 3 รอบ และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและชั่งน้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ คำนวณหาร้อยละของน้ำหนักคงเหลือจากสูตร

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

โดยที่  $W_f$  = น้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลายเอนไซม์

$W_i$  = น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลายเอนไซม์

ค่าที่ได้จะต้องนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำซ้ำ 4 ซ้ำ (n=4)

### 3.3.3.6 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (Compression test)

ทดสอบความสามารถในการทนแรงกด (Compression test) ของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่อง Universal Testing Machine ในการทดสอบใช้อัตราการกดคงที่ 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที เพื่อคำนวณค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยหาได้จากความชันระหว่างกราฟของความเค้น (Compression stress) และความเครียด (Compression strain) การทดสอบแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1) การทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์แบบแห้ง

2) การทดสอบโครงเลี้ยงเซลล์แบบเปียก: นำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในสารละลาย PBS 24 ชั่วโมง และซับน้ำส่วนเกินออกแล้วจึงนำไปทดสอบ

ค่าที่ได้จะต้องนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำซ้ำ 7 ซ้ำ (n=7)

### 3.3.3.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียม (Calcium Assay) ของ โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ (Simulated body fluid; SBF)

ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS ด้วยวิธี Foaming โดยมีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อไบโอแอคทีฟกลาส เป็น 1:1 และกำหนดสัดส่วนซิลิกาที่ 70% โมลต่อแคลเซียมออกไซด์ 0, 10, 20, 30 และ 40% โมล

1) เตรียมตัวอย่างโดยชั่งโครงเลี้ยงเซลล์หนัก  $50 \pm 1$  มิลลิกรัม ขนาด 5 มิลลิเมตร x 5 มิลลิเมตร x 5 มิลลิเมตร และเติมสารละลาย SBF ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

2) เตรียมกราฟมาตรฐานจากการละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ (Simulated body fluid; SBF) แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็นครั้งหนึ่งของความเข้มข้นเดิมตามลำดับ คือ 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 และ 0.15625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3) ปิเปตสารมาตรฐานและตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตรแล้วผสมกับสารละลาย ethanolamine buffer (ความเข้มข้น 0.88 M, pH 11) 1 มิลลิลิตร และสาร O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน แคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สารสีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำการเก็บผลหลังบ่มเป็นเวลา 1, 2, 4, 6, 8 ชั่วโมง และ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 และ 14 วัน

ค่าที่ได้จะต้องนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำซ้ำ 4 ซ้ำ (n=4)

### 3.3.3.8 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์ (Cytotoxicity)

การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ทำโดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929) ตามมาตรฐาน ISO 10993 part 5 และใช้วิธีทางอ้อมในการตรวจสอบ (Indirect method)

#### การเพาะเลี้ยงเซลล์ L929

เพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well-plate) โดยในแต่ละหลุมใช้เซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^4$  เซลล์/0.32 ตารางเซนติเมตร (พื้นที่ผิวของแต่ละหลุม) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ เพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มีก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและแผ่ตัวเป็นชั้นเดียว (confluence)

#### การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดโครงเลี้ยงเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตามมาตรฐาน ISO 10993 part 12 สามารถทำได้โดย

- 1) นำโครงเลี้ยงเซลล์หนัก 0.1 กรัม ไปผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีอบก๊าซเอธิลีนออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 2) จากนั้นแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดสารออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ นำสารสกัดดังกล่าวไปทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

#### กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

- 1) กลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control): เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ
- 2) กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control): เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซิเตต (zinc acetate) ความเข้มข้น 20 ppm
- 3) กลุ่มทดลอง (experiment): เลี้ยงเซลล์ในสารละลายตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100%, 50%, 25% และ 12.5%

#### 3.3.3.8 การวิเคราะห์ความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยเทคนิค MTT assay

ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงซึ่งมีเซลล์ที่แผ่เป็นชั้นเดียว และเติมสารสกัดโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นดังกล่าวไปแล้วลงไปในห้องจานเพาะเลี้ยง นำไปเพาะเลี้ยงตามสภาวะข้างต้นและนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay โดยสาร MTT มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ Tetrazolium มีสีเหลือง ซึ่งวงแหวน Tetrazolium สามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ Dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้เปลี่ยนเป็นผลึก Formazan ที่มีสี

ม่วง ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารละลายสีม่วงที่ได้ถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยปริมาณผลึก Formazan ที่ละลายออกมา มีค่าแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

จำนวนเซลล์สามารถหาได้จากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (viability) คำนวณจากสูตร

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{OD}_{570e}}{\text{OD}_{570b}} \times 100$$

โดยที่  $\text{OD}_{570b}$  = จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มีซีรัม เป็นองค์ประกอบ

$\text{OD}_{570e}$  = จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตต และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมเป็น องค์ประกอบ

### 3.3.3.9 การยึดเกาะของเซลล์ (Attachment) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) บนโครงเลี้ยงเซลล์

#### การเพาะเลี้ยง SaOS-2 cell line (human osteoblast-like cells)

เพาะเลี้ยง SaOS-2 cell line ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ เพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและแผ่ตัวเป็นชั้นเดียว (confluence)

#### การเพาะเลี้ยง SaOS-2 cell line ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์

1) ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีขนาด 5 มิลลิเมตร x 5 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร ใส่ในหลอดชนิด cryovial นำไปผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีอบก๊าซเอธิลีนออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2) เตรียมเซลล์โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  และ  $2 \times 10^5$  เซลล์/50 ไมโครลิตร/โครงเลี้ยงเซลล์ โดยหยดเซลล์ให้ครอบคลุมพื้นที่โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (agitation seeding) ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3) เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบลงไป 500 ไมโครลิตร และเพาะเลี้ยงโดยมีการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเช่นเดิม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

4) ย้ายโครงเลี้ยงเซลล์ไปที่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24 well-plate) จากนั้นเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 1, 3, 5 และ 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน แล้วจึงเก็บผลการทดลอง

5) เมื่อครบตามเวลาเพาะเลี้ยง วัดจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ DNA (DNA assay) โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่แทรกใน DNA double strands ด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader

#### การหาจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานจากเซลล์ SaOS-2 cell line โดยนำเซลล์แขวนลอย  $4 \times 10^6$  เซลล์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวที่แยกชั้นทิ้ง เติม SDS lysis buffer 8 มิลลิลิตร ผสมกันและนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมการสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เซลล์แตก และปล่อย DNA ออกมา จากนั้นทำการเจือจางเซลล์ด้วย SDS lysis buffer ให้มีความหนาแน่นเป็นครึ่งหนึ่งของความหนาแน่นเดิมตามลำดับ คือ  $5 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $1.25 \times 10^5$ ,  $6.25 \times 10^4$ ,  $3.125 \times 10^4$ ,  $1.5625 \times 10^4$  และ  $7.8125 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2) เตรียมตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพาะเลี้ยงตามเวลาที่กำหนด ล้างด้วย PBS และตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้เป็นชิ้นละเอียด จากนั้นเติม SDS lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมจาก 20 มิลลิกรัมของ SDS ละลายในสารละลาย SSC 5 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 95 มิลลิลิตร) และนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมการสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 3 รอบ เพื่อให้เซลล์แตก

#### 3) ตรวจวัดปริมาณ DNA

3.1) เตรียมสารแขวนลอยเซลล์มาตรฐาน (cell suspension standard) และตัวอย่าง โดยปิเปต 100 ไมโครลิตรของ cell lysate และสารแขวนลอยเซลล์มาตรฐาน ใส่ในภางด้าขนาด 96 หลุม (black plate)

3.2) เตรียมสารละลาย Hoechst 33258 โดยนำ Hoechst 33258 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 19 มิลลิลิตร และ SSC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.3) เตรียมสารละลาย Hoechst 33258 100 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยเซลล์มาตรฐาน และตัวอย่าง วัดความเข้มของสารเรืองแสง ด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader โดยใช้ ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 355 นาโนเมตร (Excitation wavelength) และวัดการเรืองแสงที่ความยาว คลื่น 460 นาโนเมตร (Emission wavelength)

4) คำนวณร้อยละการยึดเกาะ (Percentage of cell attachment) อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate,  $\mu$ ) บนโครงเลี้ยงเซลล์ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) จาก

4.1) คำนวณร้อยละการยึดเกาะ (Percentage of cell Attachment)

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะหลังการเพาะเลี้ยง}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ใส่ในโครงเลี้ยงเซลล์}} \times 100$$

4.2) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate,  $\mu$ )

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{x} dx$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln x_2 - \ln x_1$$

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{(t_2 - t_1)}$$

โดยที่  $x_1$  = จำนวนเซลล์ที่เวลา  $t_1$

$x_2$  = จำนวนเซลล์ที่เวลา  $t_2$

4.3) เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT)

$$\text{PDT} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

### 3.3.3.10 ทดสอบความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก (Osteoblasts cell line: SaOS-2)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 cell line ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย, โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส ด้วยวิธีที่กล่าวข้างต้นในหัวข้อ 3.3.3.9 และตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ DNA (DNA assay) ที่กล่าวข้างต้นในหัวข้อ 3.3.3.9 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) และวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม (Calcium content) ที่เซลล์สร้างขึ้นจาก cell lysate ที่เวลา 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน และย้อมสี Alizarin Red เพื่อศึกษาแคลเซียมที่ตกตะกอนลงบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ ที่เวลา 28 วัน

#### การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งกิจกรรมนี้เป็น Early marker ที่บ่งบอกถึงความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก โดยดูจากเอนไซม์ ALP ภายในเซลล์

1) เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ p-nitrophenol (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล) ทำการเจือจางในน้ำปราศจากประจุ ให้มีความเข้มข้นเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเดิมตามลำดับ คือ 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.07813, 0.03906, 0.01953 และ 0.00977 มิลลิโมล

2) เตรียมตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสาร SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตร ลงไปในโครงเลี้ยงเซลล์และบดให้เป็นชิ้นละเอียด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมการสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 1 นาที

3) ปิเปตสารมาตรฐานและตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แล้วเติม p-nitrophenyl phosphate 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.02 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 80 ไมโครลิตร โดยเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะเปลี่ยน p-nitrophenyl phosphate ให้เป็น p-nitrophenol และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

### วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม (Calcium content) ที่สะสมภายในเซลล์

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่สะสมภายในเซลล์ โดยแคลเซียมเป็น Late marker ที่จัดเป็นอีกหนึ่งความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก โดยดูจากปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์

1) เตรียมกราฟมาตรฐานจากแคลเซียมคาร์บอเนต 20 มิลลิกรัมในกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเดิมตามลำดับ คือ 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2) เตรียมตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสาร SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตร ลงไปในโครงเลี้ยงเซลล์และบดให้เป็นชิ้นละเอียด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมการสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 1 นาที

3) ปิเปตตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทำการปิเปตตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ethanamine buffer (ความเข้มข้น 0.88 M, pH 11) 1 มิลลิลิตร และสาร O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยแคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สารสีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

### ปริมาณแคลเซียมที่ตกตะกอน (Calcium deposition) โดยการย้อมสี Alizarin Red

1) นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 28 และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เลี้ยงเซลล์ (Control) แช่ใน 70% เอทานอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2) ทำการย้อมสีย้อม 1% Alizarin Red solution ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยน้ำปราศจากประจุ 3 รอบ นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูป เพื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีย้อมของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์และไม่มีเซลล์ โดยใช้โปรแกรม Image J



### 3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล แล้วนำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อศึกษาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบอะโนวา (Analysis of variance: Anova) ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P\text{-value} < 0.05$ )



## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

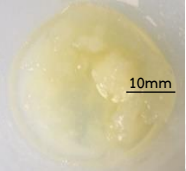
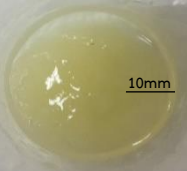
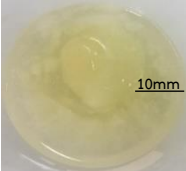
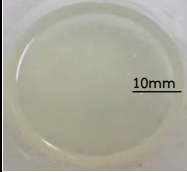
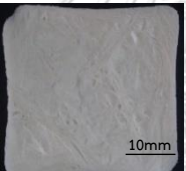




งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส ด้วยวิธีโฟมมิ่ง (foaming) และทำการเชื่อมขวางด้วย 3-ไกลซิดอกซีโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (GPTMS) โดยทดสอบสมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาสที่เป็นกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาแสดงรายละเอียดในหัวข้อต่อไป

#### 4.1 การขึ้นรูปและการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์

##### 4.1.1 ผลของอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายไบโอแอคทีฟกลาสต่อการขึ้นรูป

การศึกษาผลของอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทย (SF) และสารละลายไบโอแอคทีฟกลาส (BG) ต่อการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อศึกษาการเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลาย 2 ส่วนเมื่อผสมกันเป็นสารละลายรวมและการขึ้นรูปเบื้องต้น จากผลการทดลองในรูปที่ 20 ซึ่งแสดงลักษณะของสารละลาย SF และสารละลาย BG เมื่อผสมกันและลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น พบว่าที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของ SF และสารละลาย BG 90/10, 80/20, 70/30 และ 60/40 สารละลายผสมไม่รวมกันเป็นเนื้อเดียวกัน แต่มีการจับตัวเป็นก้อนรวมกลุ่มกัน และแยกสารละลายออกเป็นส่วนเนื้อและน้ำ แสดงดังรูป (a)-(d) โดยยังมีปริมาณสารละลาย SF มากขึ้น สารละลายผสม SF-BG มีการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนมากขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปริมาณสารละลาย SF มีผลต่อการจับตัวเป็นก้อนของสารละลายผสม ขณะที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของสารละลาย SF และ BG 50/50, 40/60, 30/70, 20/80 และ 10/90 พบว่าสารละลายผสมรวมกันเป็นเนื้อเดียวกัน จึงนำมาขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แสดงดังรูป (e)-(i) และจากการขึ้นรูปเบื้องต้น พบว่าอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของสารละลาย SF และ BG 40/60, 30/70, 20/80 และ 10/90 โครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะกรอบและเปราะบาง แตกออกจากกันเป็นชิ้นเล็กๆ เนื่องด้วยสมบัติของ BG ที่มีความแข็งแรงสูง (strength) แต่เปราะ (brittle) [46] ทำให้เมื่อยังมีปริมาณ BG มากขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์ผสมจะยังมีลักษณะที่กรอบและเปราะมากขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปริมาณสารละลาย BG มีผลต่อโครงสร้างสัณฐานและสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เกิดจากอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของ

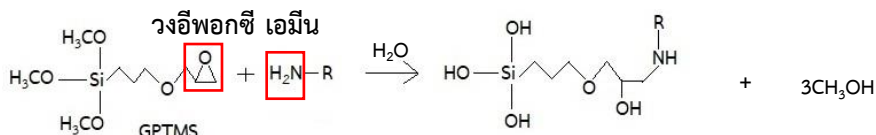
สารละลาย SF และ BG 50/50 สามารถขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่สมบูรณ์ที่สุด จึงเลือกอัตราส่วนนี้ไปศึกษาขั้นต่อไป

	ลักษณะปรากฏ			
	(a)	(b)	(c)	(d)
อัตราส่วนผสมโดย น้ำหนักของ SF/BG				
	90/10	80/20	70/30	60/40
อัตราส่วนผสมโดย น้ำหนักของ SF/BG				
	50/50	40/60	30/70	20/80
อัตราส่วนผสมโดย น้ำหนักของ SF/BG				
	10/90			

รูปที่ 20 ลักษณะของสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก (a) 90/10, (b) 80/20, (c) 70/30, (d) 60/40, (e) 50/50, (f) 40/60, (g) 30/70, (h) 20/80 และ (i) 10/90 เมื่อขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

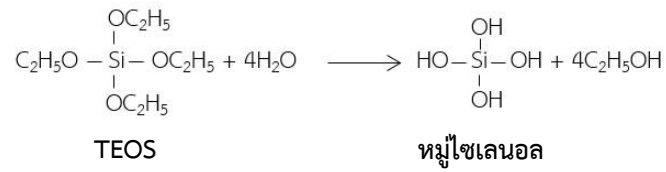
#### 4.1.2 การขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS โดยวิธีโฟมมิ่ง (Foaming)

การเตรียมโครงข่ายเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ด้วยวิธีโฟมมิ่ง โดยเริ่มจากการเติมหมู่ฟังก์ชันไฟโบรอินไหมไทยด้วย GPTMS แสดงปฏิกิริยา ดังรูปที่ 21ก. โดยวงอีพอกซีบนโมเลกุล GPTMS สามารถทำปฏิกิริยาและสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ เอมีนของไฟโบรอินไหมไทย ในขณะที่เดียวกันหมู่เมทอกซีไซเลนที่อีกปลายด้านหนึ่งของ GPTMS เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) และมีเมทานอล (CH<sub>3</sub>OH) เป็นผลพลอยได้ ขณะที่ไบโอแอคทีฟกลาสถูกเตรียมจากเตตระเอทอกซีไซเลน (TEOS) แสดงปฏิกิริยา ดังรูปที่ 21ข. โดยผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) และมีเอทานอล (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) เป็นผลพลอยได้ และผ่านปฏิกิริยาควบน้ำจนฟอร์มตัวเป็นโครงข่ายซิลิเกต จากนั้นจึงใส่ CaCl<sub>2</sub> ลงไป โดยแคลเซียมไอออนจะเข้าไปอยู่ในโครงข่ายซิลิเกต แสดงโครงสร้าง ดังรูปที่ 21ค. ซึ่งการเชื่อมขวางไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส จะเกิดผ่านปฏิกิริยาควบน้ำของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่จากสารเชื่อมขวาง GPTMS และไบโอแอคทีฟกลาส ส่งผลให้เกิดการเชื่อมขวางผ่านอะตอมของออกซิเจน (Si-O-Si ; bridging oxygen) แสดงปฏิกิริยา ดังรูปที่ 21ง.

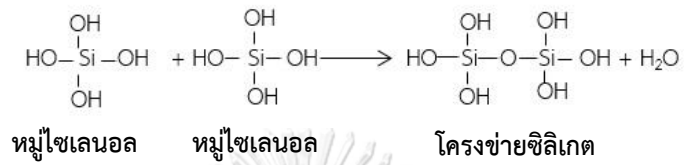


ก) การเติมหมู่ฟังก์ชันไฟโบรอินไหมไทยด้วย GPTMS [70]

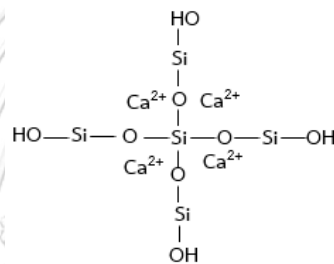
### ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส



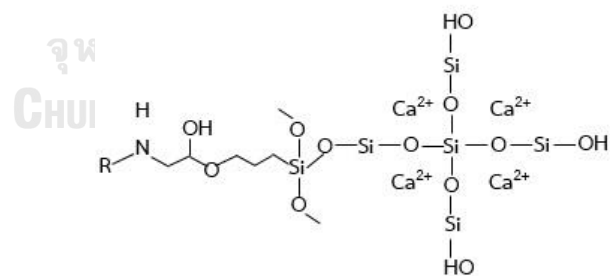
### ปฏิกิริยาควบแน่น



#### ข) โครงข่ายซิลิเกต [40]



#### ค) ไบโอแอคทีฟกลาส [42]



#### ง) ไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS



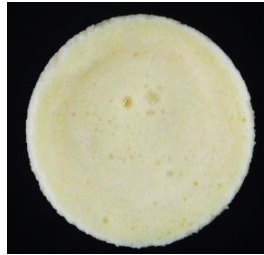

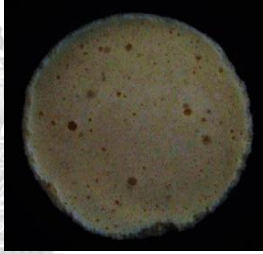
รูปที่ 21 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการเตรียมโครงข่ายเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS

เมื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธีโพรมิ่ง (ตารางที่ 11) จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะภายนอก ดังแสดงในรูปที่ 22

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีสีเหลืองอ่อน เนื่องมาจากสารละลาย SF มีสีเหลืองใส ขณะที่สารละลาย BG เป็นสารละลายใส จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปได้มีสีเหลืองอ่อน และเมื่อสัมผัสด้วยมือ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 40 มีลักษณะที่แข็งกว่า SF-BG 30, SF-BG 20, SF-BG 10 และ SF-BG 0 ตามลำดับ เนื่องมาจากการเชื่อมขวางที่เพิ่มขึ้นของไฟโบรอินไหมไทยกับโครงข่ายซิติเกตของไบโอแอคทีฟกลาส จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงที่เพิ่มขึ้น

**ตารางที่ 11** ชนิดของตัวอย่างและสัญลักษณ์ของโครงเลี้ยงเซลล์

ชนิดของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์	สัญลักษณ์
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (กลุ่มควบคุม)	SF
โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (กลุ่มควบคุม)	BG
โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS 0%wt	SF-BG 0
โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS 10%wt	SF-BG 10
โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS 20%wt	SF-BG 20
โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS 30%wt	SF-BG 30
โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS 40%wt	SF-BG 40

ลักษณะปรากฏโครงเลี้ยงเซลล์ผสม SF-BG ที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของ SF/BG เป็น 50/50 และเชื่อมขวางด้วย GPTMS ความเข้มข้นต่างๆ		
GPTMS (%wt)	(a)  0	(b)  10
GPTMS (%wt)	(c)  20	(d)  30
	(e)  40	

รูปที่ 22 โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0%wt, (b) 10%wt, (c) 20%wt, (d) 30%wt และ (e) 40%wt

## 4.2 สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

### 4.2.1. โครงสร้างพื้นฐานภายในของโครงเลี้ยงเซลล์

เมื่อศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานภายใน (รูปที่ 23) และเพื่อวัดขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แสดงในตารางที่ 12

จากรูปที่ 23 พบว่าโดยทั่วไปโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG เชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีรูพรุนขนาดเล็กและใหญ่กระจายตัวสม่ำเสมอ (Homogeneous) และมีรูเชื่อม (interconnected pore) ที่ผนังของรูพรุนเหล่านั้น และทะลุต่อกันทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้น GPTMS ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG ที่มีความเข้มข้นของ GPTMS มากขึ้น จะมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยใหญ่ขึ้น ผนังรูพรุนขรุขระมากขึ้น และมีก่อนมวลสารสะสมบนผนังรูพรุนมากขึ้น (ตารางที่ 12)

หากพิจารณาขนาดรูพรุนเฉลี่ยที่วัดจากรูป SEM จะพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์จาก SF หรือ BG จะมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิต (แม้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF จะขึ้นรูปด้วยกรรมวิธีที่แตกต่างจากพวกก็ตาม) อย่างไรก็ตามขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิต SF-BG 10, SF-BG 20 และ SF-BG 30 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และความเข้มข้นของ GPTMS ที่ส่งผลให้ขนาดรูพรุนเฉลี่ยใหญ่ขึ้น มีความเป็นไปได้ว่าความเข้มข้น GPTMS ช่วยเพิ่มขนาดรูพรุน มีรายงานการขึ้นรูปเยื่อที่มีรูพรุน (porous membrane) เพื่อการใช้ในลิเธียมแบตเตอรี่จาก polystyrene-block-poly(4-vinylpyridine) block copolymer โดยคณะวิจัยได้เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ GPTMS ที่ใช้ พบว่าขนาดของรูพรุนใหญ่ขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ GPTMS มากขึ้น เช่นเดียวกัน [77] และรายงานของ Wang และคณะปี 2017 [62] ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โคโคซานและซิลิกาเชื่อมขวางด้วย GPTMS ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ GPTMS ที่ใช้ พบว่า ขนาดของรูพรุนใหญ่ขึ้นจาก 150 ไมโครเมตร เป็น 400 ไมโครเมตร โดยคณะวิจัยได้อภิปรายผลว่า GPTMS อาจช่วยเพิ่มขนาดรูพรุนได้ เนื่องจาก GPTMS แสดงพฤติกรรมเป็นสารลดแรงตึงผิว

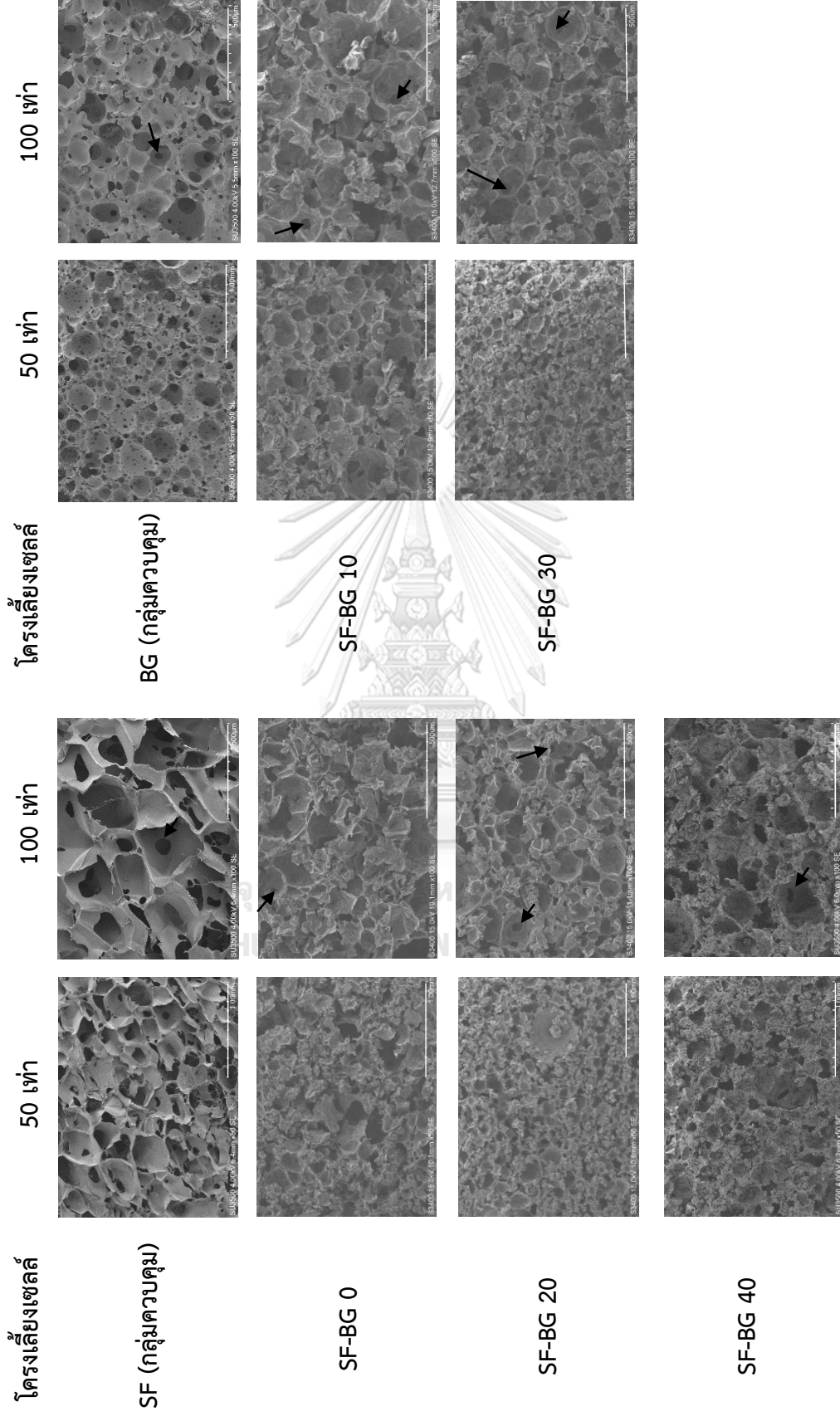
รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ SF มีรูปร่างหลายหน้า (polyhedron) ผนังของรูพรุนมีลักษณะเป็นแผ่นเรียบ และมีรูเชื่อมทะลุผนังขนาดประมาณ 100-200 ไมโครเมตร ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ BG จะมีรูพรุนรูปร่างกลมขนาดเล็กและใหญ่ผสมกัน กระจายตัวอย่างทั่วถึงในโครงเลี้ยงเซลล์ และมีรูเชื่อมขนาดประมาณ 25-50 ไมโครเมตร มีรายงานว่ารูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ มีผลต่อการถ่ายเท



และแลกเปลี่ยนสารอาหาร ออกซิเจนให้แก่เซลล์ภายในโครงสร้าง [6] และขนาดรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ควรมีขนาดรูพรุนอย่างน้อย 100 ไมโครเมตร [78] นอกจากนี้มีรายงานของ Vorrapakdee R และคณะ ในปี 2013 [79] พบว่า กระดูกมนุษย์ประเภท cancellous มีรูพรุนเฉลี่ยประมาณ 255 ไมโครเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 40

เป็นที่น่าสังเกตว่าบนผนังที่ขรุขระของโครงเลี้ยงเซลล์คอมโพสิตมีการทับถมกันของมวลสารบางอย่างซึ่งไม่ได้ถูกตรวจสอบในวิทยานิพนธ์นี้ มีความเป็นไปได้ว่ามวลสารเหล่านี้เป็น GPTMS ที่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและพอลิคอนเดนเซชันของหมู่ฟังก์ชัน  $\text{Si-O-CH}_2$  จนเกิดเป็นโครงข่ายขนาดใหญ่ที่แยกตัวออกมา [80] หรืออีกทางหนึ่งก่อนมวลสารเหล่านี้คือโปรตีนไฟโบรอินบางส่วนที่ทับถมบนผนังรูพรุนอันเกิดจาก BG ที่เชื่อมขวางกับ SF





รูปที่ 23 โครงสร้างพื้นฐานของโครงสร้างเซลล์ (SEM) กำลังขยาย 50 เท่า (สเกลบาร์ : 1 mm) และ 100 เท่า (สเกลบาร์ : 500  $\mu$ m) ( $\rightarrow$ ; รูเชื่อมผนังโครงสร้างเซลล์)

ตารางที่ 12 ขนาดรูลัพฐณเจ็ลลยและลัษณะผนั้งของรูลัพฐณของโครงเล็ยงเซลล์ไฟโอรอินใหม่ไทย, โครงเล็ยงเซลล์ไบโอแอกทีฟกลาส และโครงเล็ยงเซลล์ผสมไฟโอรอินใหม่ไทยและไบโอแอกทีฟกลาส

ชนิดของโครงเล็ยงเซลล์	ขนาดรูลัพฐณเจ็ลลย (ไมโครเมตร)	ความขรุขระของผนั้งรูลัพฐณ	การทั้บถมของมวลสารบนผนั้ง
SF (กลุ่มควบคุม)	247±53 <sup>a</sup>	-	-
BG (กลุ่มควบคุม)	313±67 <sup>b</sup>	-	-
SF-BG 0	128±36 <sup>c</sup>	+	+
SF-BG 10	177±74 <sup>d</sup>	+	+
SF-BG 20	185±23 <sup>d</sup>	+	+
SF-BG 30	189±26 <sup>d</sup>	++	++
SF-BG 40	236±54 <sup>a</sup>	+++	+++

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่งมีนัยสำคัณที่ระดับความเชื่่อมัน 95%,  $p < 0.05$  โดยเป็รียบเทียบโครงเล็ยงเซลล์แต่ละชนิด)

ระดับความขรุขระของผนั้งรูลัพฐณและการทั้บถมของมวลสารบนผนั้ง

- หมายถึง ไม่มีความขรุขระของผนั้งรูลัพฐณหรือการทั้บถมของมวลสารบนผนั้ง
- + หมายถึง เริ่มมีความขรุขระของผนั้งรูลัพฐณหรือการทั้บถมของมวลสารบนผนั้ง
- ++ หมายถึง มีความขรุขระของผนั้งรูลัพฐณหรือการทั้บถมของมวลสารบนผนั้งปานกลาง
- +++ หมายถึง มีความขรุขระของผนั้งรูลัพฐณหรือการทั้บถมของมวลสารบนผนั้งมาก

#### 4.2.2. ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity)

เมื่อวัดค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้หลักการการแทนที่ของของเหลว ในการทดลองนี้ใช้เฮกเซน (Hexane) ซึ่งมีความสามารถในการซึมผ่านโครงเลี้ยงเซลล์โดยไม่ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการบวมหรือหดตัว [75] จะได้ค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ดังแสดงในตารางที่ 13

โครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุม ทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ SF และโครงเลี้ยงเซลล์ BG มีความพรุนประมาณร้อยละ 91.62 และ 87.14 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG ที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง โดยมีความพรุนประมาณร้อยละ 73-84 แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้น GPTMS ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง พบว่าหากใช้ความเข้มข้นของ GPTMS ในการเชื่อมขวางมากขึ้นส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG มีความพรุนมากขึ้น มีความเป็นไปได้ว่าความเข้มข้น GPTMS ช่วยเพิ่มขนาดรูพรุนและความพรุนเนื่องจาก GPTMS แสดงพฤติกรรมเป็นสารลดแรงตึงผิว [62] ทั้งนี้มีงานวิจัยของ Cheng M และคณะ ในปี 2013 [81] กล่าวว่าหากโครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนมากทำให้เกิดช่องเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุนได้มาก ส่งผลให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารอาหารและออกซิเจนให้แก่เซลล์ภายในโครงสร้างอย่างทั่วถึง ซึ่งช่วยให้เซลล์เจริญได้ดียิ่งขึ้น

**ตารางที่ 13** ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย, โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์	ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (%)
SF (กลุ่มควบคุม)	91.62±1.59 <sup>a</sup>
BG (กลุ่มควบคุม)	87.14±1.95 <sup>a,c</sup>
SF-BG 0	73.87±2.15 <sup>b</sup>
SF-BG 10	77.01±1.82 <sup>b,e</sup>
SF-BG 20	81.22±2.71 <sup>d,e</sup>
SF-BG 30	83.48±3.18 <sup>d,c</sup>
SF-BG 40	84.32±3.08 <sup>d,c</sup>

(a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด)

#### 4.2.3. โครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการเชื่อมขวางระหว่างไฟโบรอินไหมไทย (SF) กับ GPTMS ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy โดยใช้เทคนิค Attenuated total reflectance mode (ATR-FTIR) แสดงดังรูปที่ 24 พบว่าสเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของ SF เกิดท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1650 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ I (Amide I) ที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O (C=O stretching) ตำแหน่งถัดมา คือ ท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1514 ต่อเซนติเมตร สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ II (Amide II) ซึ่งแสดงการสั่นของพันธะ C-N (C-N stretching) และที่เลขคลื่น 1233 ต่อเซนติเมตร สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ III (Amide III) ซึ่งแสดงการสั่นของพันธะ N-H (N-H deformation) ซึ่งทั้ง 3 ตำแหน่งข้างต้นแสดงหมู่ฟังก์ชันที่พบในโปรตีนไฟโบรอินทั่วไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wongputtaraksa T [82] และคณะ ในปี 2012 ที่แสดงสเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการกำจัดเกลือ โดยมีท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1650 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะเอไมด์ I ที่มีโครงสร้างแบบ random coil, 1550-1525 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะพันธะเอไมด์ II (N-H deformation and C-N stretching) และ 1250, 1225 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะเอไมด์ III (C-N stretching and N-H deformation) ที่มีในโครงสร้างแบบ  $\beta$ -sheet และ random coil ตามลำดับ

สำหรับสเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของ GPTMS (โครงสร้างแสดงในรูปที่ 25) เกิดท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1254, 909 และ 854 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับวงแหวนอีพอกซี (epoxy ring) ที่มีลักษณะการสั่นแบบ breathing (breathing vibration), การสั่นแบบยืดไม่สมมาตร (asymmetric stretching) และการสั่นแบบยืดสมมาตร (symmetric stretching) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเกิดท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1191 ต่อเซนติเมตร ที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน Si-C ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Hernandez-Barrios และคณะ ในปี 2017 [83] ที่แสดงสเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของ GPTMS โดยมีท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1250, 910 และ 860 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงวงแหวนอีพอกซี (epoxy ring) และท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1190 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน Si-C

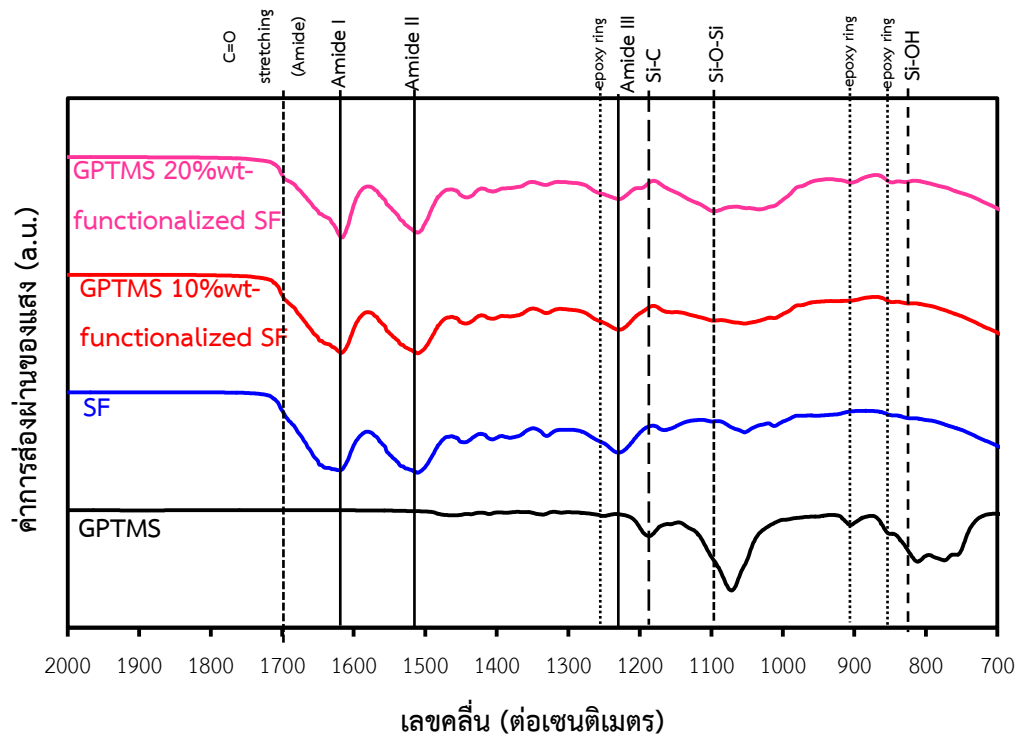
เมื่อทำการเติมหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) SF ด้วย GPTMS ความเข้มข้น 10 %wt และ 20 %wt แล้วนำมาทดสอบด้วย ATR-FTIR พบว่ามีท่วงคลื่นที่เลขคลื่น 1621 ต่อเซนติเมตร ซึ่ง

สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ I (Amide I) ท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1514 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ II (Amide II) และท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1233 ต่อเซนติเมตร สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ III (Amide III) ท้องคลื่นเหล่านี้แสดงถึงการคงอยู่ของไฟโบรอิน

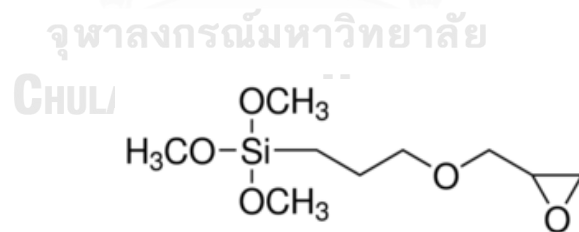
เมื่อสังเกตกราฟ FTIR ของไฟโบรอินที่เติม GPTMS จะพบการเกิดไหล่ของคลื่นบนกราฟ FTIR ที่เลขคลื่น 1690 ต่อเซนติเมตร ซึ่งตรงกับ C=O stretching ในพันธะเอไมด์ และท้องคลื่นขยับ (shift) ไปเลขคลื่น 1621 ต่อเซนติเมตรมากขึ้น (พันธะเอไมด์ I) จึงมีความเป็นไปได้ว่ามีพันธะเอไมด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง epoxy ring กับหมู่เอมีนของไฟโบรอินก็เป็นได้ หรืออีกทางหนึ่งคือ GPTMS อาจจะทำให้โครงสร้างไฟโบรอินเปลี่ยนเป็นแผ่นบิดมากขึ้น เนื่องจากการเติมหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) SF ด้วย GPTMS เกิดเมทานอลเป็นผลพลอยได้ สังเกตได้จากรูปที่ 26 ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kaewprasit K และคณะ ปี 2014 [84] ที่แสดงสเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของฟิล์ม SF ที่ผ่านการแช่ในเมทานอล ซึ่งเกิดท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1630 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะเอไมด์ I ที่มีในโครงสร้างแบบ  $\beta$ -sheet

อีกข้อสังเกตหนึ่งคือ ไม่พบท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1735-1750 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงถึง C=O stretching ในพันธะเอสเตอร์ จึงเป็นไปได้ว่าการสร้างพันธะเชื่อมระหว่างไฟโบรอินและ GPTMS เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยา ring opening ที่ทำให้เกิดพันธะเอไมด์เป็นหลัก สอดคล้องกับ Tonda-Turo C และคณะ ในปี 2013 [70] ต่างจากการเติม GPTMS ลงไปบนเจลาติน ซึ่งมีรายงานว่าเกิดผ่าน esterification ที่ทำให้เกิดพันธะเอสเตอร์เป็นหลัก [85] นอกจากนี้ยังพบท้องคลื่นที่เลขคลื่น 832 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชัน Si-OH ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรซิซของหมู่เมทอกซีไซเลน (methoxysilane) ที่อีกปลายด้านหนึ่งของ GPTMS และท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1071-1100 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชัน Si-O-Si ที่เกิดจากหมู่ไซเลนอล (Si-OH) 2 หมู่เกิดปฏิกิริยาควบแน่น ทำให้เกิดพันธะ Si-O-Si ดังกล่าวขึ้น สังเกตโครงสร้างทางเคมีได้จากรูปที่ 26 ที่แสดงปฏิกิริยาเติมหมู่ฟังก์ชัน SF ด้วย GPTMS

ทั้งนี้หากเปรียบเทียบกราฟของการเชื่อมขวางระหว่าง SF และ GPTMS ที่ 20 %wt และที่ 10 %wt พบว่าเกิดท้องคลื่นที่เลขคลื่น 909 ต่อเซนติเมตรขึ้นเมื่อเชื่อมขวางด้วย GPTMS 20%wt ซึ่งสอดคล้องกับวงแหวนอีพอกซี จึงอาจสรุปได้ว่า GPTMS มีปริมาณเกินความจำเป็นต่อการเชื่อมขวาง

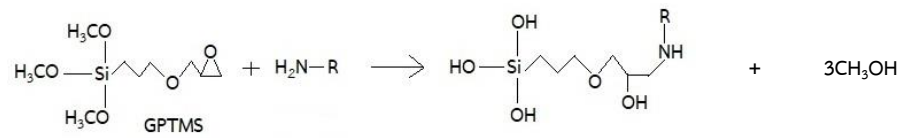


รูปที่ 24 สเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดโดยดูการเชื่อมขวางระหว่างไฟโบรอินไหมไทยกับ 3-ไกลซิดอกซีโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน ด้วยเทคนิค FTIR

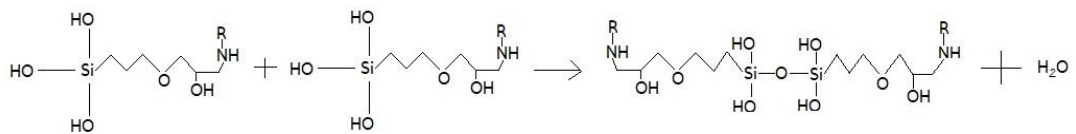


รูปที่ 25 โครงสร้างทางเคมีของ GPTMS

### ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส



### ปฏิกิริยาควบแน่น



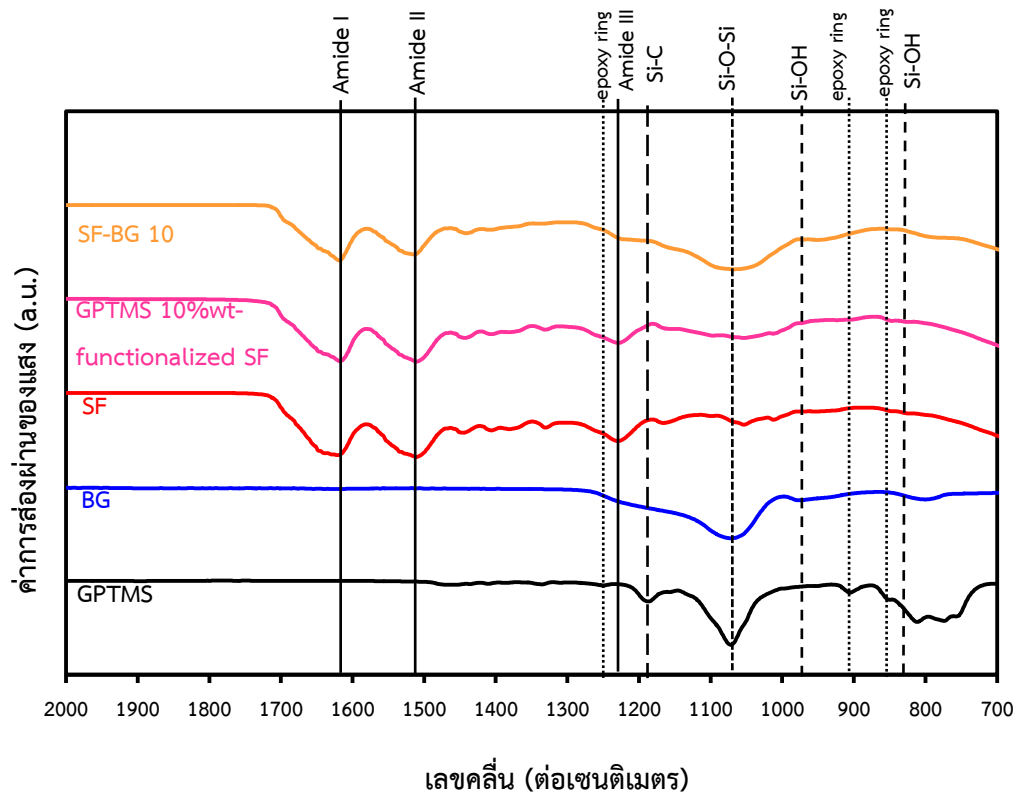
รูปที่ 26 การเติมหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) SF ด้วย GPTMS



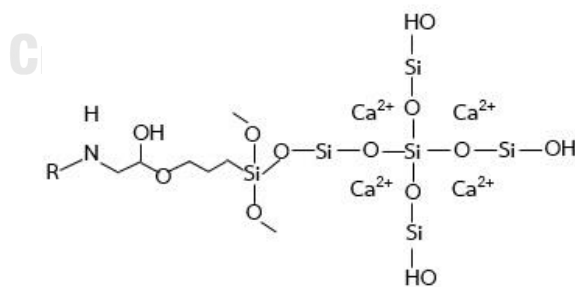
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ผสมของไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 10%wt มาวิเคราะห์ด้วย ATR-FTIR (รูปที่ 27, เส้นกราฟบนสุด และรูปที่ 28 แสดงโครงสร้างทางเคมี) ยังคงพบท้องคลื่นที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฟโบรอิน ได้แก่ ท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1622 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ I (Amide I) ท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1519 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ II (Amide II) และที่เลขคลื่น 1233 ต่อเซนติเมตร สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ III (Amide III) และพบท้องคลื่นที่เป็นลักษณะของ BG และ GPTMS ได้แก่ ที่เลขคลื่น 832 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชัน Si-OH ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรซิซของหมู่เมทอกซีไซเลน (methoxysilane) และท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1071 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชัน Si-O-Si ที่เกิดจากหมู่ไซเลนอล (Si-OH) 2 หมู่เกิดปฏิกิริยาควบแน่นกัน จากโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมของ SF-BG สังเกตได้ว่ามีท้องคลื่นหมู่ฟังก์ชัน Si-OH ที่เลขคลื่น 977 ต่อเซนติเมตรเพิ่มขึ้นมา อีกทั้งพันธะ Si-O-Si ท้องคลื่นมีลักษณะที่สูงขึ้น ซึ่งให้เห็นว่ามีหมู่ฟังก์ชันที่เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการมี BG เข้ามาเป็นองค์ประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีท้องคลื่นที่เลขคลื่น 1071 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน Si-O-Si และท้องคลื่นที่เลขคลื่น 832 และ 977 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน Si-OH



รูปที่ 27 สเปกตรัมการส่งผ่านรังสีอินฟราเรดของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมของไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส ด้วยเทคนิค FTIR

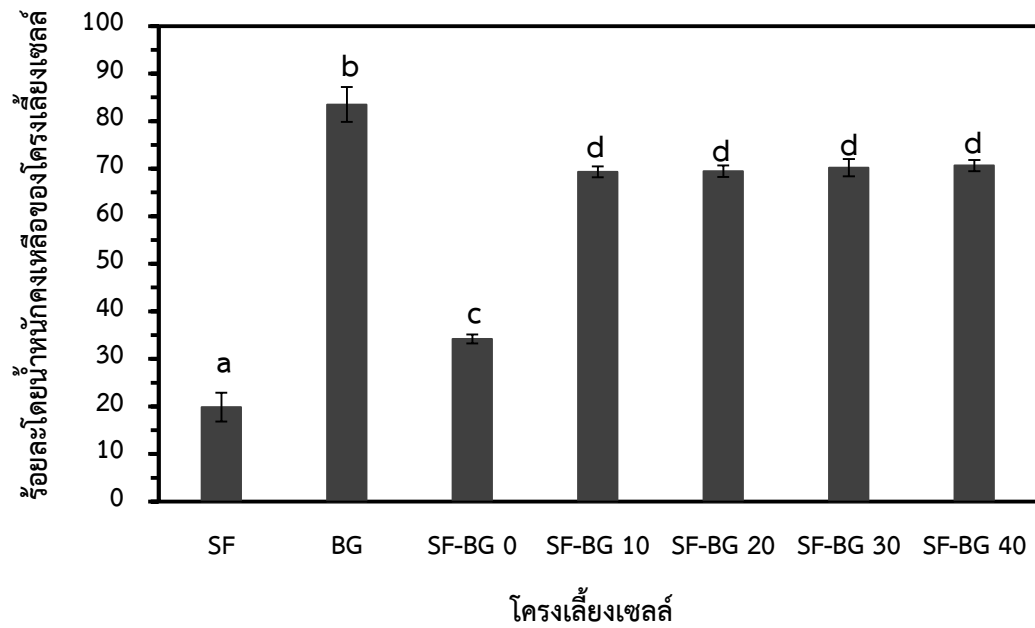


รูปที่ 28 โครงสร้างทางเคมีไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS

#### 4.2.4. สัดส่วนของเจลที่ไม่ละลายน้ำ (gel fraction) ของโครงเลี้ยงเซลล์

การทดสอบสัดส่วนของเจลที่ไม่ละลายน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นการวิเคราะห์หาน้ำหนักที่คงอยู่ของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่ในน้ำปราศจากประจุ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงถึงเสถียรภาพของโครงสร้าง จากผลการศึกษาในรูปแบบที่ 29 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG ที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่ความเข้มข้น 10-40%wt มีร้อยละโดยน้ำหนักคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์สูงประมาณ 69-70 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG ที่ไม่ถูกเชื่อมขวาง มีร้อยละโดยน้ำหนักคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ประมาณ 34 ในขณะที่กลุ่มโครงเลี้ยงเซลล์ควบคุมทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ SF และโครงเลี้ยงเซลล์ BG มีร้อยละโดยน้ำหนักคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ประมาณ 19 และ 83 ตามลำดับ ทั้งนี้การละลายน้ำของ SF มีความเป็นไปได้ว่าโครงสร้างของไหมไม่ได้จัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบ จึงทำให้เกิดการละลายน้ำที่ง่าย ขณะที่ BG มีการละลายน้ำได้น้อย อาจเป็นไปได้จากโครงสร้างที่เป็นโครงข่ายซิติเกตต่อเชื่อมกัน

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเชื่อมขวางด้วย GPTMS มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มเสถียรภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในน้ำได้ อีกทั้งยังแสดงว่าความเข้มข้นของ GPTMS 10%wt เพียงพอต่อการเชื่อมขวางของโมเลกุลในวัสดุคอมโพสิตที่มีสมบัติเฉพาะตัวต่างกันมาผสมกัน



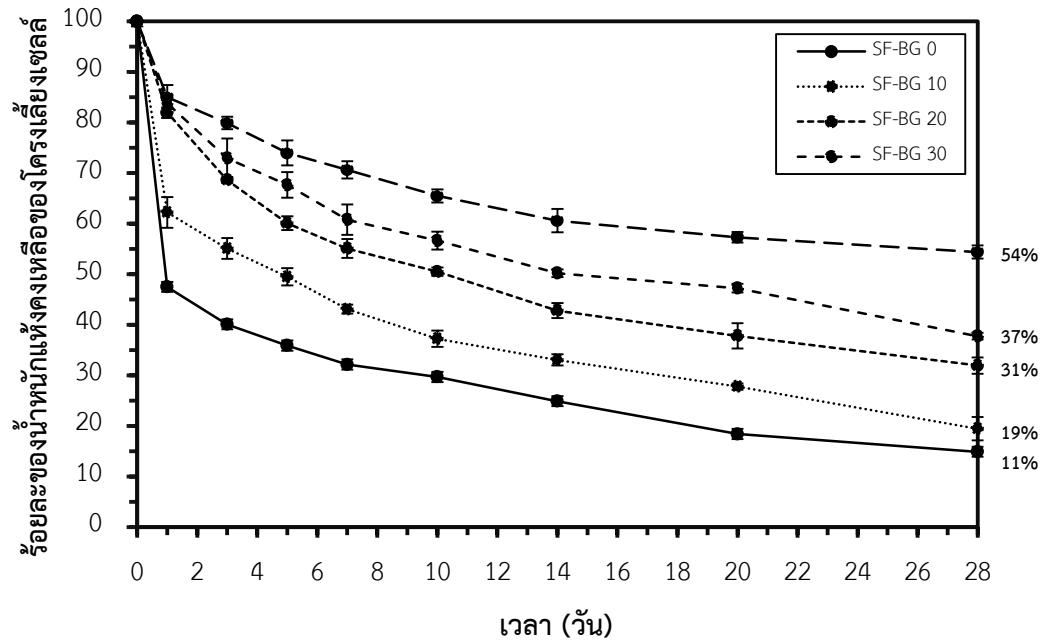
รูปที่ 29 ร้อยละโดยน้ำหนักของคอนกรีตที่ดูดน้ำหลังจากการแช่ในน้ำปราศจากประจุที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด)

#### 4.2.5. ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพระดับห้องปฏิบัติการของโครมเลียงเซลล์

เพื่อศึกษาผลสัมฤทธิ์ของการเชื่อมขวางในการเพิ่มเสถียรภาพของโครมเลียงเซลล์ งานวิจัยนี้ จึงศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของโครมเลียงเซลล์ SF-BG ที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่ความเข้มข้นต่างกัน ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีโครมเลียงเซลล์ที่ไม่ถูกเชื่อมขวางเป็นกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษา (รูปที่ 30) พบว่าโครมเลียงเซลล์ทุกสูตรเกิดการย่อยสลายในสารละลาย เอนไซม์โปรติเอส XIV แต่มีอัตราการย่อยสลายที่ต่างกัน โดยในช่วงวันที่ 1 โครมเลียงเซลล์ SF-BG 0 เกิดการย่อยสลายรวดเร็วเหลือน้ำหนักแห้งต่ำกว่าร้อยละ 50 ของน้ำหนักเริ่มต้น ในขณะที่โครมเลียง เซลล์ SF-BG 40, SF-BG 30, SF-BG 20 และ SF-BG 10 เกิดการย่อยสลายจนเหลือน้ำหนักแห้ง ตามลำดับความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง

เมื่อระยะเวลาดำเนินไป โครมเลียงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ความเข้มข้นต่างกันเกิด การย่อยสลายด้วยอัตราเร็วใกล้เคียงกันซึ่งพิจารณาได้จากความชันของกราฟ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 28 วัน โครมเลียงเซลล์ SF-BG 40 มีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือมากที่สุด ซึ่งมีค่าประมาณร้อยละ 54 รองลงมา คือ SF-BG 30, SF-BG 20, SF-BG 10 และ SF-BG 0 โดยมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือ ประมาณร้อยละ 37, 31, 19 และ 14 ซึ่งสรุปได้ว่า การย่อยสลายของโครมเลียงเซลล์ จะขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง GPTMS ที่ใช้ในโครมเลียงเซลล์ SF-BG การขึ้นรูป



รูปที่ 30 ร้อยละของน้ำหนักแห้งคองเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30% และ 40%wt ภายหลังจากแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากตารางได้ทำการสรุปสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่แตกต่างกัน

จากการทดลองข้างต้น

การทดลอง	ผลการทดลอง
1. โครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์	สารเชื่อมขวาง GPTMS เข้มข้น 10%wt เพียงพอต่อการเชื่อมขวาง
2. ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์	SF-BG 0 : 128±36 $\mu\text{m}$ SF-BG 10 : 177±74* $\mu\text{m}$ SF-BG 20 : 185±23* $\mu\text{m}$ SF-BG 30 : 189±26* $\mu\text{m}$ SF-BG 40 : 236±54 $\mu\text{m}$
3. ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์	SF-BG 0 : 73.87±2.15 SF-BG 10 : 77.01±1.82 SF-BG 20 : 81.22±2.71 SF-BG 30 : 83.48±3.18 SF-BG 40 : 84.32±3.08
4. น้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากแช่ในน้ำปราศจากประจุ 24 ชั่วโมง	โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 10-40 มีร้อยละ น้ำหนักคงเหลือประมาณ 69-70 ซึ่งไม่แตกต่างกัน
5. น้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์ โปรติเอส XIV	โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG ที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS ที่ความเข้มข้นสูง จะมีอัตราการย่อยสลายที่ต่ำ

จากตารางสรุปสมบัติข้างต้น ผู้วิจัยได้ทำการเลือกโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ไปทำการทดลองต่อไป เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ให้ขนาดรูพรุนและความพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ อีกทั้ง GPTMS 20%wt ยังมีความเหมาะสมในเรื่องของปริมาณที่ใช้และราคาของสารเชื่อมขวาง ดังนั้นผู้วิจัยนำโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ไปทดสอบความสามารถในการทนแรงกด

ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ และสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อไป

#### 4.2.6 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (Compression test)

ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟพลาสติก (BG) โครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟพลาสติกที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) ที่ถูกทดสอบในสภาวะแห้ง แสดงผลในรูปของ Hencky stress-strain (Non-Hookean Material) เนื่องจากวัสดุมีค่า strain ที่เกิน 10% (รูปที่ 31) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF เมื่อมีความเค้นจากแรงกด จะมีความเครียดสูงขึ้นเรื่อยๆ จนเกินขอบเขตของเครื่องวัดแรงกด ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่ามอดูลัสของการกด (ตารางที่ 14) สำหรับในสภาวะแห้ง ค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ SF มีค่าประมาณ 0.264 MPa ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chamchongkaset J และคณะ ในปี 2008 [86] ที่รายงานว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF มีค่ามอดูลัสของการกดประมาณ 0.262 MPa ขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ BG เมื่อได้รับแรงกด โครงเลี้ยงเซลล์สามารถทนต่อแรงกดได้ประมาณ 0.8 MPa และจะแตกหักออกจากกัน จากนั้นจะสามารถรับแรงกดได้เพิ่มจนถึงระดับประมาณ 0.9 MPa แล้วแตกหักอีกรอบเป็นเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงระดับความเครียดประมาณ 1.3 MPa ซึ่งเป็นระดับความเครียดสูงสุด และมีมอดูลัสการกดเท่ากับ 10.561 MPa ลักษณะกราฟของโครงเลี้ยงเซลล์ BG เป็นลักษณะของวัสดุประเภท elastic-brittle foam โดยการแตกหักแต่ละรอบเป็นการพังทลาย (collapse) ของผนังรูพรุนในแต่ละชั้นของวัสดุ ก่อนจะเข้าสู่ระยะ densification ที่เกิดจากผนังรูพรุนทั้งหมดพังทลายลงเป็นผลให้ความหนาแน่น (density) ของวัสดุมากขึ้น จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ BG มีความเครียดสูงขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่ SF-BG 20 เมื่อได้รับแรงกด จะอยู่ในระยะ linear elasticity จนถึงประมาณ 0.2 MPa แล้วจึงเข้าสู่ระยะ plateau ที่แสดงถึงการพังทลายของผนังรูพรุน แล้วตามด้วย densification ตามแบบ elastic brittle foam เช่นกัน โดยมีค่ามอดูลัสของการกดประมาณ 2.917 MPa

เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ SF, BG และ SF-BG 20 จะพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 มีความแข็งแรงและความแข็งแกร่ง (stiffness) ที่ดีกว่า SF อีกทั้งมีระยะ linear elasticity ที่กว้างกว่า และมีค่าความแข็งแกร่งที่น้อยกว่า BG ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบ หากโครงเลี้ยงเซลล์กระตุกมีค่าความแข็งแกร่งมากเกินไปเช่น BG จะทำให้เกิด stress-shielding เมื่อปลูกถ่ายเป็นเวลานาน เป็นผลให้

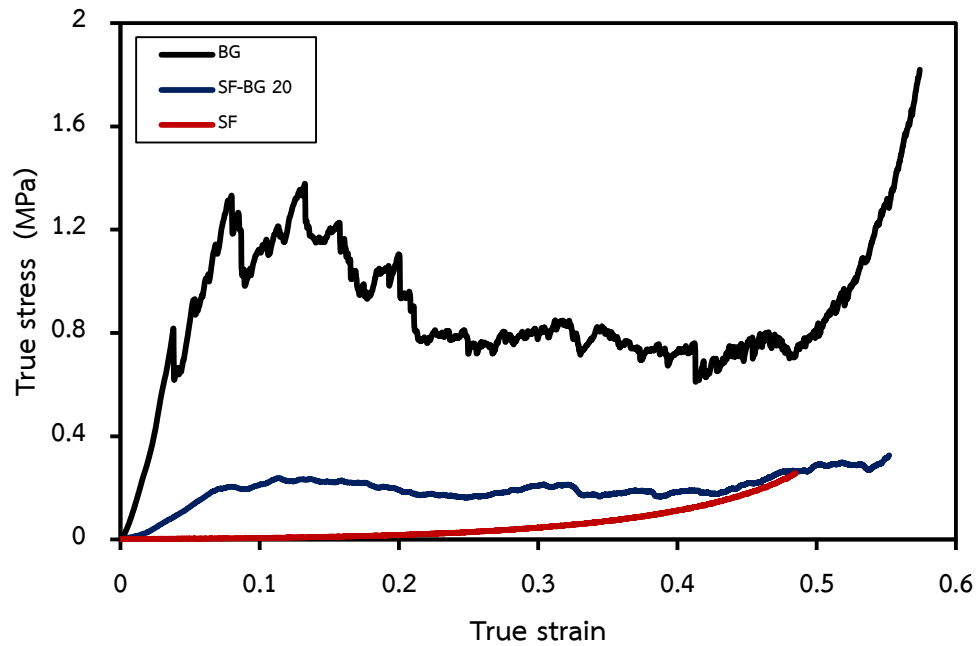


กระดูกบริเวณปลุกถ่ายไม่ได้รับแรงกดมากเท่าที่ควรจะเป็นมีผลให้สูญเสียมวลกระดูก แต่หากค่าความแข็งแรงน้อยเกินไปเช่น SF จะทำให้กระดูกโดยรอบรับแรงกดมากเกินไปซึ่งเสี่ยงต่อการหักหรือแตกซ้ำซ้อน [87] โดยโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 สามารถปรับปรุง stiffness ได้มากถึง 11 เท่าหรือประมาณ 1 order of magnitude

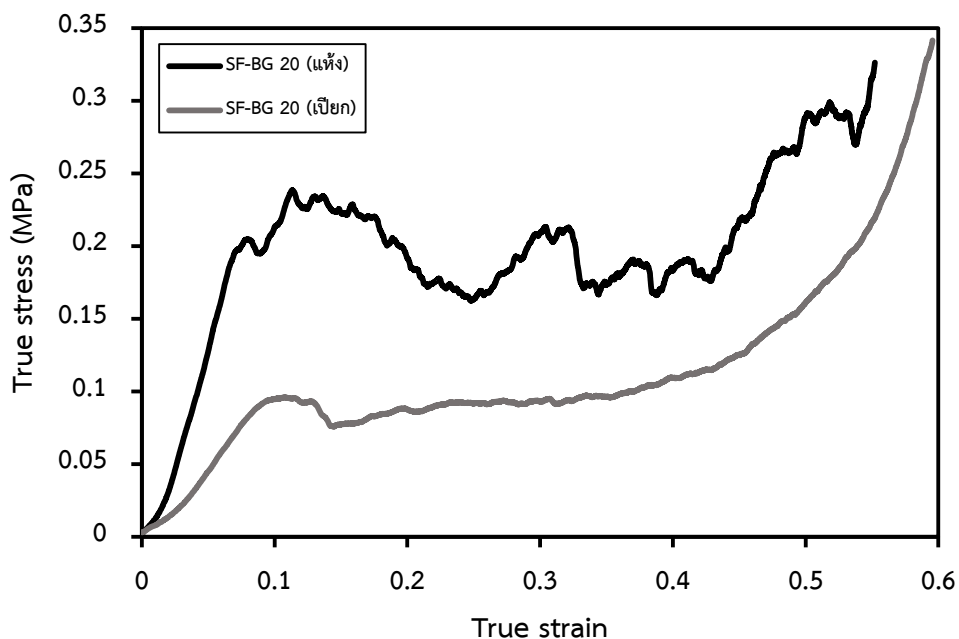
ตามรายงานของ Vorrapakdee R และคณะ ในปี 2013 [79] พบว่าค่ามอดูลัสของการกดของกระดูกมนุษย์ในสภาวะแห้ง มีค่าประมาณ 3.7 MPa ซึ่งมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ประมาณ 0.8 เท่าเท่านั้น ผู้วิจัยเชื่อว่าในอนาคตหากมีการเพิ่มความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ก็จะช่วยให้ค่ามอดูลัสการกดเข้าใกล้กระดูกมนุษย์จริงมากยิ่งขึ้น

หากเปรียบเทียบความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ในสภาวะแห้งและสภาวะเปียก (รูปที่ 32) พบว่าขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ในสภาวะแห้งแสดงพฤติกรรมแบบ elastic-brittle foam โครงเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกันในสภาวะเปียกเปลี่ยนไปแสดงพฤติกรรมเป็น elastic-plastic foam เนื่องจากโมเลกุลน้ำเข้าไปแทรกตัวในโครงเลี้ยงเซลล์และแรงดันจากน้ำอาจทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ทนการกระทบ (impact) ได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์ SF และโครงเลี้ยงเซลล์ BG เกิดการละลายภายหลังแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้มีการเสีรูปร่าง ดังแสดงในรูปที่ 33 จึงไม่สามารถนำมาหาค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเปียกได้ ขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 คงรูปร่างปกติเช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้ง จึงสามารถหาค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเปียกได้ มีค่าประมาณ 0.929 MPa ซึ่งน้อยกว่าในสภาวะเปียกประมาณ 3 เท่า



รูปที่ 31 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20)



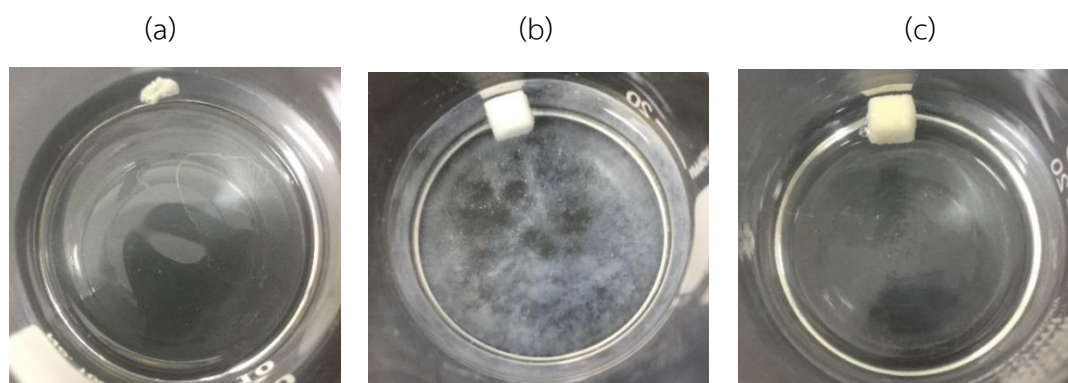
รูปที่ 32 ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไปโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) ที่สภาวะแข็งและสภาวะเปื่อยก

ตารางที่ 14 มอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์	มอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (MPa)
SF	$0.2638 \pm 0.0786^a$
BG	$10.5610 \pm 1.6158^b$
SF-BG 20 (สภาวะแข็ง)	$2.9173 \pm 0.3453^c$
SF-BG 20 (สภาวะเปื่อยก)	$0.9294 \pm 0.2022^d$
กระดูกมนุษย์ประเภท cancellous*	$3.7 \pm 0.1^e$

\* อ้างอิงจากรายงานของ Vorrapakdee R *et al.*, 2013 [79]

(a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด)



**รูปที่ 33** ลักษณะ (a) โคร่งเลี้ยงเซลล์เซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), (b) โคร่งเลี้ยงเซลล์ไปโอแอกทีฟ  
กลาส (BG) และ (c) โคร่งเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไปโอแอกทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย  
GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) ภายหลังจากแช่ในสารละลาย PBS 24 ชั่วโมง

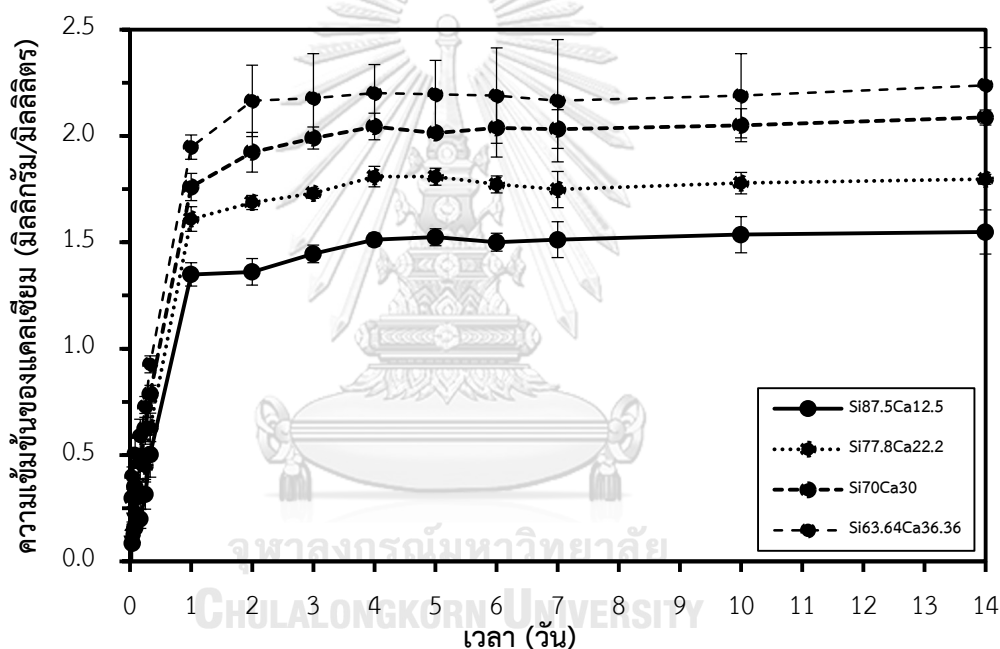
#### 4.2.7. ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์

การปลดปล่อยแคลเซียมออกจากโครงเลี้ยงเซลล์เป็นขั้นตอนหนึ่งในกลไกการเกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG เมื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ที่ต่างกัน (ร้อยละ 0, 12.5, 22.2, 30 และ 36.36% โดยโมล) และเชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ (SBF) ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ช่วงเวลาต่างๆ (รูปที่ 34) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดมีการปลดปล่อยแคลเซียมอย่างต่อเนื่อง โดยในช่วงวันแรกของการทดลองโครงเลี้ยงเซลล์ปลดปล่อยแคลเซียมออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ได้เร็ว จากนั้นการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มมีการปลดปล่อยน้อยลง เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน และเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ในวันที่ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกมาจากโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดกับปริมาณแคลเซียมที่มีอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ 12.5%mol (Si87.5Ca12.5) ปลดปล่อยแคลเซียมออกมาในปริมาณมากกว่าปริมาณแคลเซียมที่ใส่ไปเพื่อขึ้นรูป ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการวัดปริมาณแคลเซียม ขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ 22.2%mol (Si77.8Ca22.2), 30%mol (Si70Ca30) และ 36.36%mol (Si63.64Ca36.36) ปลดปล่อยแคลเซียมในสารละลาย SBF ประมาณร้อยละ 87, 74 และ 64 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) เป็นที่น่าสังเกตว่ายังมีสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์มาก ร้อยละของแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกมากลับน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกมาในหน่วยมิลลิกรัมจะยังคงมากขึ้นตามสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ที่ใช้ขึ้นรูป

สิ่งที่น่าสนใจ คือ เมื่อทำการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ Si70Ca30 และ Si63.64Ca36.36 ในสารละลาย SBF ในระยะเวลาต่อเนื่องเป็นเวลา 9 วัน จะพบว่าวันที่ 9 ของการแช่ เกิดกลุ่มผลึกชั้นสี่เหลี่ยมรอบๆ โครงเลี้ยงเซลล์ แสดงดังในรูปที่ 35 และเมื่อทำการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 14 วัน Si87.5Ca12.5 และ Si77.8Ca22.2 ไม่มีผลึกเกิดขึ้น

เมื่อนำผลึกที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและเอ็กซ์เรย์สเปกโตรสโคปีแบบกระจายพลังงาน (Scanning electron microscope-Energy dispersive X-ray spectrometry; SEM-EDX) เพื่อวิเคราะห์รูปร่างผลึกและปริมาณธาตุองค์ประกอบ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 36 พบว่าผลึกที่เกิดจากโครงเลี้ยงเซลล์ Si70Ca30 มีอัตราส่วนระหว่าง

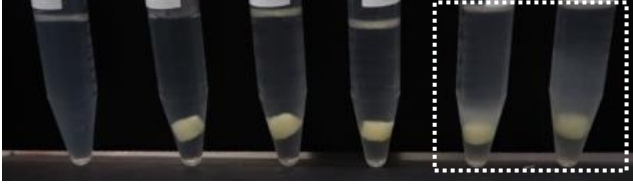
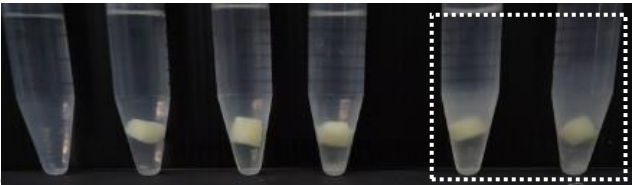

แคลเซียมต่อฟอสเฟตบนผลึกที่มีสัดส่วนประมาณ 1.47 ขณะที่ผลึกที่เกิดจากโครงเลี้ยงเซลล์  $Si63.64Ca36.36$  มีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสเฟตบนผลึก มีสัดส่วนประมาณ 1.56 ซึ่งอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสเฟตบนผลึกที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดข้างต้น สอดคล้องกับแคลเซียมฟอสเฟต (CaP) ประเภท amorphous calcium phosphate (ACP) มีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสเฟตระหว่าง 1.2-2.2 [88] อีกทั้งผลึกที่เกิดขึ้นมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับผลึกประเภท ACP ตามงานวิจัยของ Ihi J และคณะ ในปี 2013 [89] และมีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสเฟตบนผลึก มีสัดส่วนประมาณ 1.7 ทั้งนี้ผลึกที่เกิดขึ้น อาจเป็นเพราะปริมาณแคลเซียมที่ใส่เข้าไปเพื่อขึ้นรูปและปลดปล่อยออกมาจากโครงเลี้ยงเซลล์มีผลต่อการตกผลึกได้ [44]



**รูปที่ 34** ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทย และไปโอแอคทีฟกลาสที่ขึ้นรูปจากโซลของไปโอแอคทีฟกลาสที่มีสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ต่างกัน และเชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงชั่วโมงที่ 1, 2, 4, 6, 8 และวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14

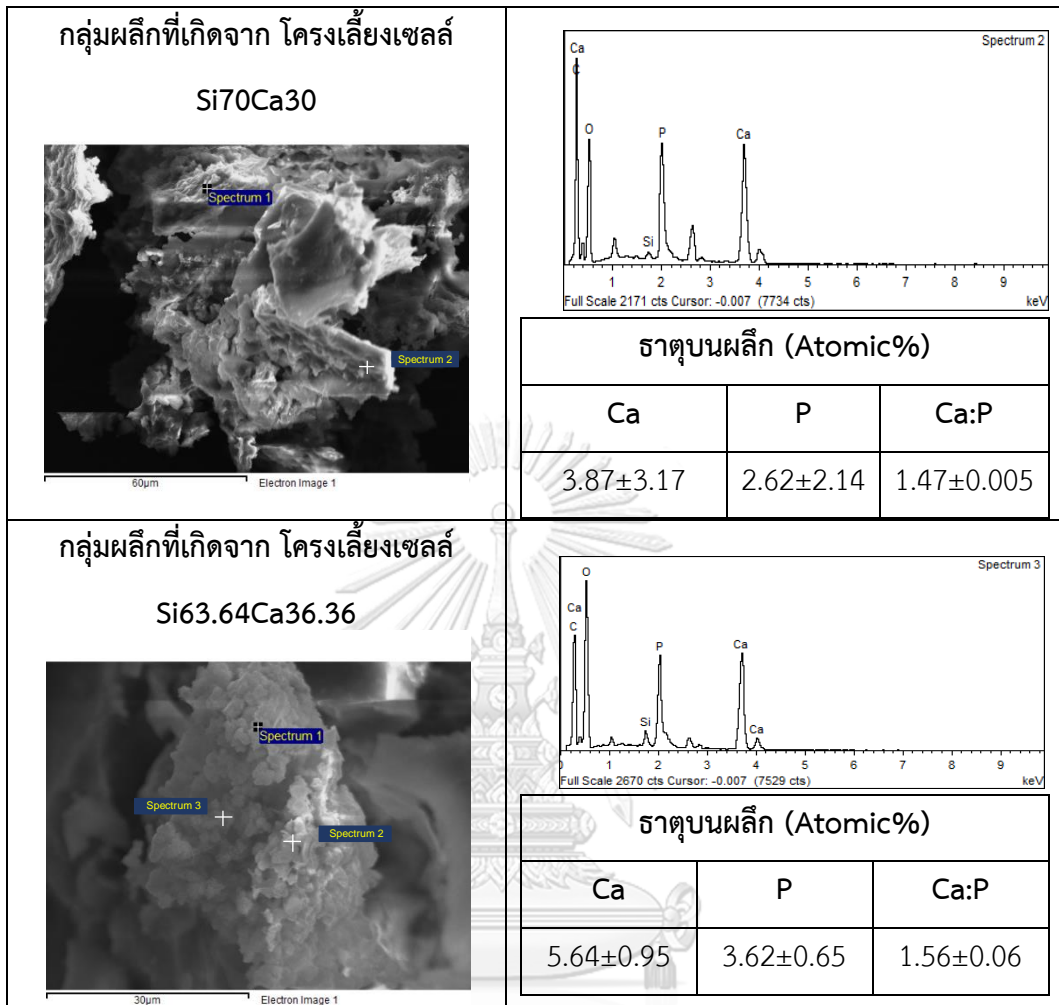
ตารางที่ 15 ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG เมื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสัดส่วนแคลเซียมออกไซด์ต่างกัน (ร้อยละ 0, 12.5, 22.2, 30 และ 36.36% โดยโมล ในโซลของ BG ที่ใช้)

โซลของไบโอแอคทีฟกลาส	ร้อยละปลดปล่อยแคลเซียมในสารละลาย SBF
Si87.5Ca12.5	ปลดปล่อยแคลเซียมออกมาในปริมาณมากกว่าปริมาณแคลเซียมที่ใส่ไป
Si77.8Ca22.2	86.98
Si70Ca30	73.64
Si63.64Ca36.36	64.24

ระยะเวลาที่แช่ใน สารละลาย SBF	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF
วันที่ 9	 <p style="text-align: center;">SBF    0%    12.5%    22.2%    30%    36.36%</p>
วันที่ 10	 <p style="text-align: center;">SBF    0%    12.5%    22.2%    30%    36.36%</p>
วันที่ 14	 <p style="text-align: center;">SBF    0%    12.5%    22.2%    30%    36.36%</p>

รูปที่ 35 ลักษณะผลึกสีขาวเกิดขึ้นหลังแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF ในวันที่ 9, 10 และ 14



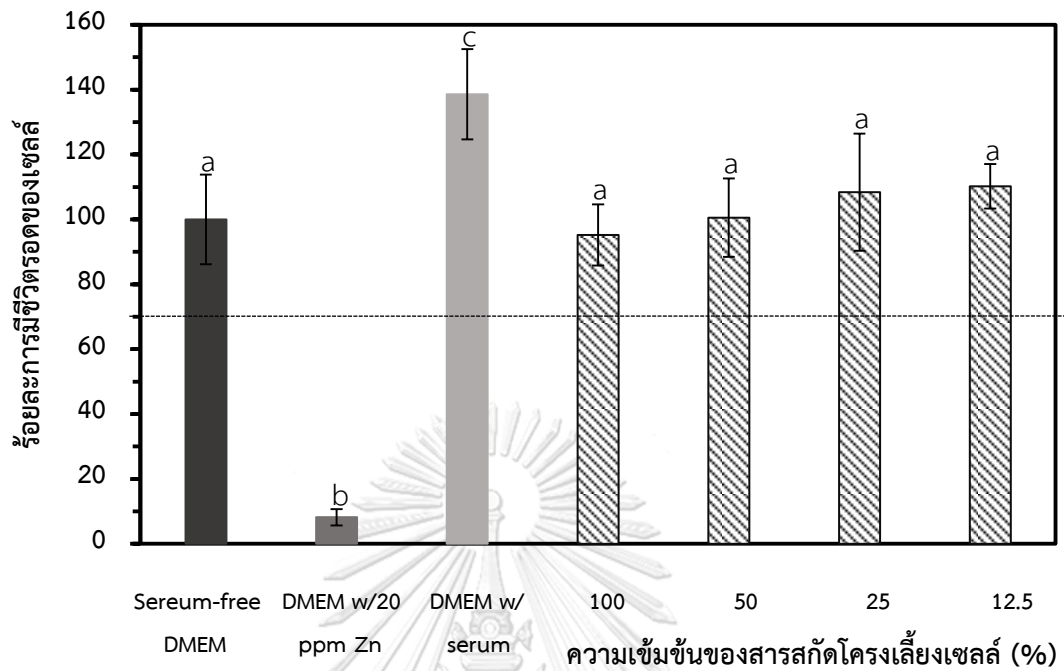


รูปที่ 36 รูปร่างผลึกและปริมาณธาตุองค์ประกอบที่พบบนโครงเลียงเซลล์ Si70Ca30 และ Si63.64Ca36.36 ภายหลังจากแช่ในสารละลาย SBF 14 วัน

#### 4.2.8. ความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด L929 ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการทางอ้อมตามมาตรฐาน ISO 10993 part 5 และเตรียมตัวอย่างสารสกัดตามมาตรฐาน ISO 10993 part 12 โดยสารที่ใช้สกัดโครงเลี้ยงเซลล์ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ (serum-free DMEM) เพื่อให้ได้สารสกัดโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 100, 50, 25 และ 12.5 จากนั้นจึงนำสารสกัดเหล่านี้ไปเลี้ยงเซลล์แล้ววัดร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ (DMEM w/ serum) และกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตต 20 ppm (DMEM w/ 20 ppm Zn) ดังแสดงในรูปที่ 37

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากโครงเลี้ยงเซลล์ทุกความเข้มข้นมีร้อยละการรอดชีวิตที่สูงกว่าร้อยละ 70 ซึ่งเป็นเกณฑ์กำหนดไว้ว่า “ ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์จะต้องไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 จึงจะถือว่าวัสดุไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ” (ISO 10993 part 5) ขณะที่เซลล์กลุ่มควบคุมเชิงลบที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบมีร้อยละการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 138 และเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตต มีร้อยละการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 8 ดังนั้นสรุปได้ว่าสารสกัดจากโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ทุกความเข้มข้นของสารสกัด ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ในระดับห้องปฏิบัติการ



**รูปที่ 37** ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางแบบผสมด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt ที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีและไม่ซีรัมเป็นองค์ประกอบ และอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตต)

#### 4.2.9. การยึดเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์

งานวิจัยนี้ทำการศึกษากิจกรรมของเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 cell line ที่ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ต่างกัน ได้แก่  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  และ  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ บนโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย DNA assay แสดงผลในรูปแบบที่ 38 รวมถึงค่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ SaOS-2 cell line บนโครงเลี้ยงเซลล์, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) แสดงในตารางที่ 16

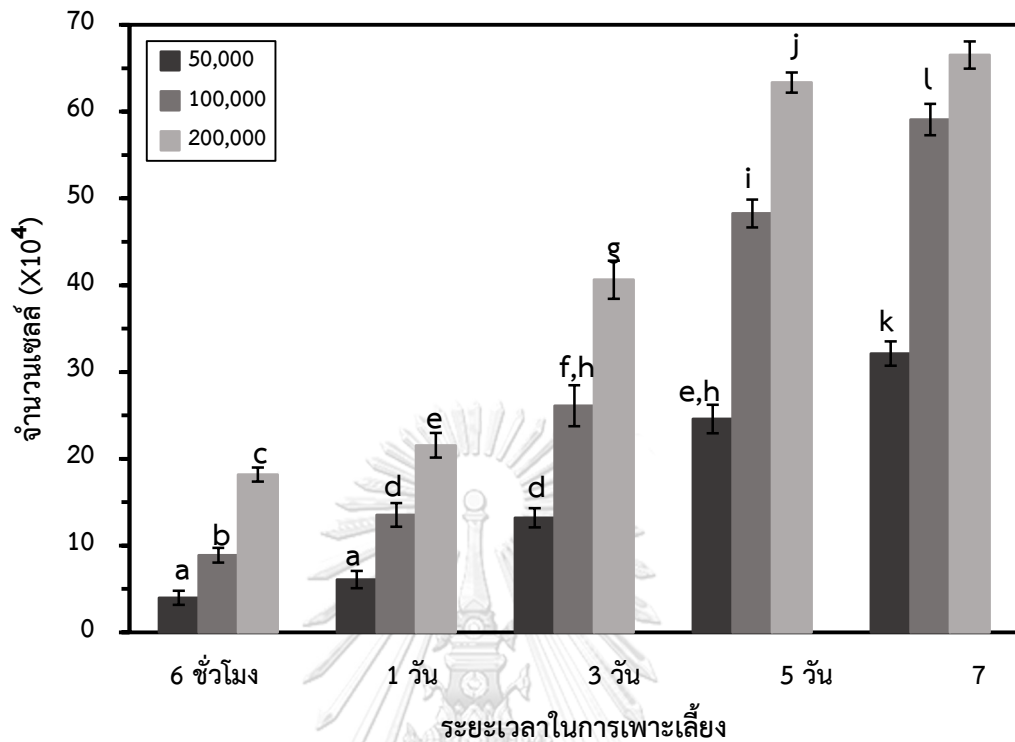
เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์ SaOS-2 cell line ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ต่างกัน ได้แก่  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  และ  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าความหนาแน่น  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้สูงถึงร้อยละ ในขณะที่ความหนาแน่น  $1 \times 10^5$  และ  $5 \times 10^4$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ประมาณร้อยละ 88 และ 79 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายิ่งความหนาแน่นของจำนวนเซลล์เริ่มต้นมาก ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นตามไปด้วย

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 cell line บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ต่างกัน ได้แก่  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  และ  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าที่ความหนาแน่น  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์เจริญเติบโตได้มากที่สุด รองลงมา คือที่ความหนาแน่น  $1 \times 10^5$  และ  $5 \times 10^4$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งที่ความหนาแน่น  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ยังพบว่าเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) ได้เร็วสุดนั่นคือ ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ ซึ่งคำนวณจากช่วงการเพาะเลี้ยงในวันที่ 1-5 และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ พบว่าความหนาแน่นของจำนวนเซลล์  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์สูงประมาณ 61 ชั่วโมง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ประมาณ 0.0113 เซลล์ต่อชั่วโมง และที่ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์  $1 \times 10^5$  และ  $5 \times 10^4$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ประมาณ 52 และ 47 ชั่วโมง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ประมาณ 0.0133 และ 0.0147 เซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยไม่มี

ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจะสังเกตเห็นว่า เมื่อความหนาแน่นของจำนวนเซลล์มากขึ้น เวลาการแบ่งตัวทวีคูณมากขึ้น อาจเป็นเพราะการยับยั้งแบบ natural inhibition [90]

ทั้งนี้วัสดุที่นำมาใช้ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ โฟโบรินไหมไทยเป็นชีววัสดุที่ได้รับการยอมรับว่ามีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีเท่ากับโปรตีนในกลุ่มคอลลาเจนและเจลาตินที่มีลำดับกรดอะมิโน RGD ซึ่งช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ [91] ดังในรายงานของ Correia C และคณะ ในปี 2012 [35] ได้นำ human adipose-derived stem cells มาใช้กับโครงเลี้ยงเซลล์โฟโบรินไหมไทยที่ขึ้นรูปด้วยการชะล้างเกลือ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ 14 วัน เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเพียง 1.6 เท่าของจำนวนเริ่มต้น ทั้งนี้การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ผสม SF-BG 20 เป็นไปได้ด้วยดี อาจเป็นผลมาจากไบโอแอคทีฟกลาสที่มีสมบัติส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก [37] ดังในรายงานของ Zhu H และคณะ ในปี 2012 [92] ขึ้นรูปฟิล์มโฟโบรินที่ผสมร่วมกับนาโนไบโอแอคทีฟกลาส ( $\text{SiO}_2 : \text{CaO} : \text{P}_2\text{O}_5 = 58 : 23 : 9$ ) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของนาโนไบโอแอคทีฟกลาสในฟิล์ม จะช่วยให้เซลล์สามารถยึดเกาะเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

จากผลการทดลองนี้ พบว่าความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line ที่ใช้เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) ได้เร็ว โดยความหนาแน่น  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ มีจำนวนเซลล์มายึดเกาะมากที่สุดภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมงและเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ได้เร็วสุด จึงได้ทำการเลือกความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ที่  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ มาศึกษาκιิจกรรมของเซลล์กระดูกต่อไป



**รูปที่ 38** จำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line ที่ยึดเกาะ (6 ชม.) และเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสเชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  และ  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ (a - m แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

**ตารางที่ 16** ค่าการยึดเกาะของเซลล์ SaOS-2 cell line เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ บนโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอกทีฟกลาสเชื่อมขวางแบบผสมด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt

จำนวนเซลล์เริ่มต้น (เซลล์)	ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ ) (เซลล์ต่อชั่วโมง)
$5 \times 10^4$	$79.47 \pm 6.35^a$	$47.64 \pm 4.49^d$	$0.0147 \pm 0.0014^f$
$1 \times 10^5$	$88.92 \pm 5.4^{a,c}$	$52.38 \pm 3.49^d$	$0.0133 \pm 0.0009^{f,h}$
$2 \times 10^5$	$90.89 \pm 1.07^{b,c}$	$61.79 \pm 3.84^e$	$0.0113 \pm 0.0007^{g,h}$

(a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  ของข้อมูล “ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ SaOS-2 cell line” โดยเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นทั้ง 3 จำนวน)

(d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  ของข้อมูล “เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ” โดยเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นทั้ง 3 จำนวน)

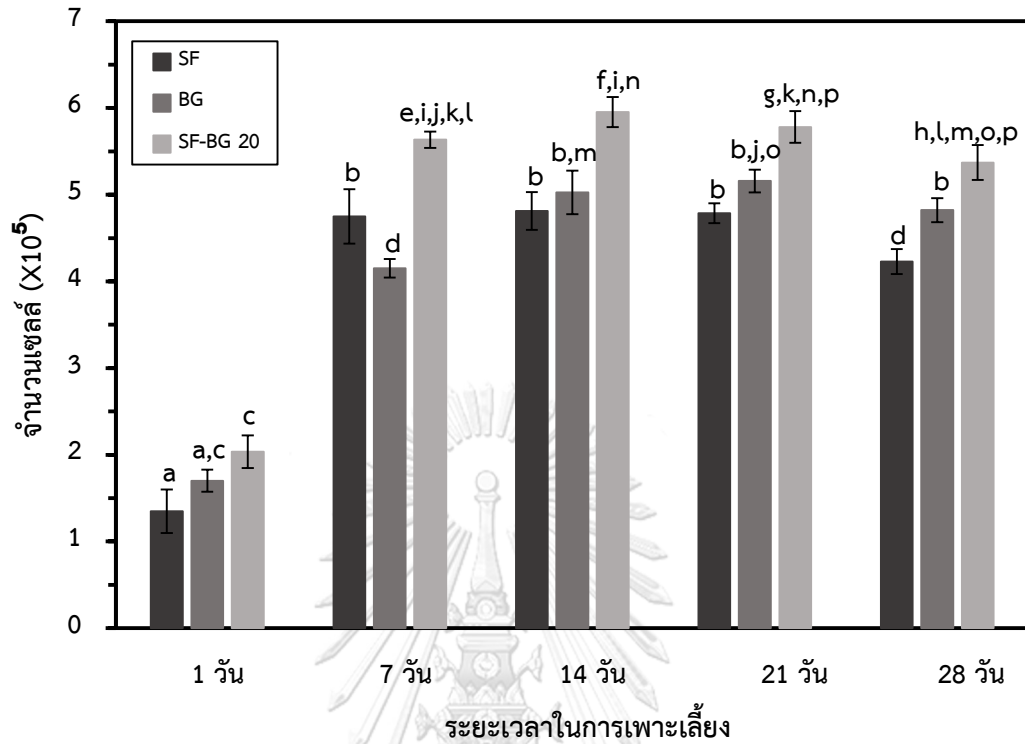
(f, g และ h แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  ของข้อมูล “อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์” โดยเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นทั้ง 3 จำนวน)

#### 4.2.10. การทดสอบความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก (Osteoblast cell line: SaOS-2)

การทดลองนี้ทดสอบความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ SaOS-2 cell line ที่ความหนาแน่น เท่ากับ  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ บนโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยวิเคราะห์การเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย DNA assay (รูปที่ 39) โดยมีกลุ่มควบคุม คือ เซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ SF และโครงเลี้ยงเซลล์ BG

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 วัน โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 มี SaOS-2 cell line ยึดเกาะและเจริญเติบโตสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ SF และโครงเลี้ยงเซลล์ BG และเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น จำนวนเซลล์เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย และจะสูงที่สุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิด จากนั้นจำนวนเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง 14 วัน แล้วเริ่มไม่เปลี่ยนแปลงและมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ SF และโครงเลี้ยงเซลล์ BG อาจกล่าวได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 เซลล์มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด





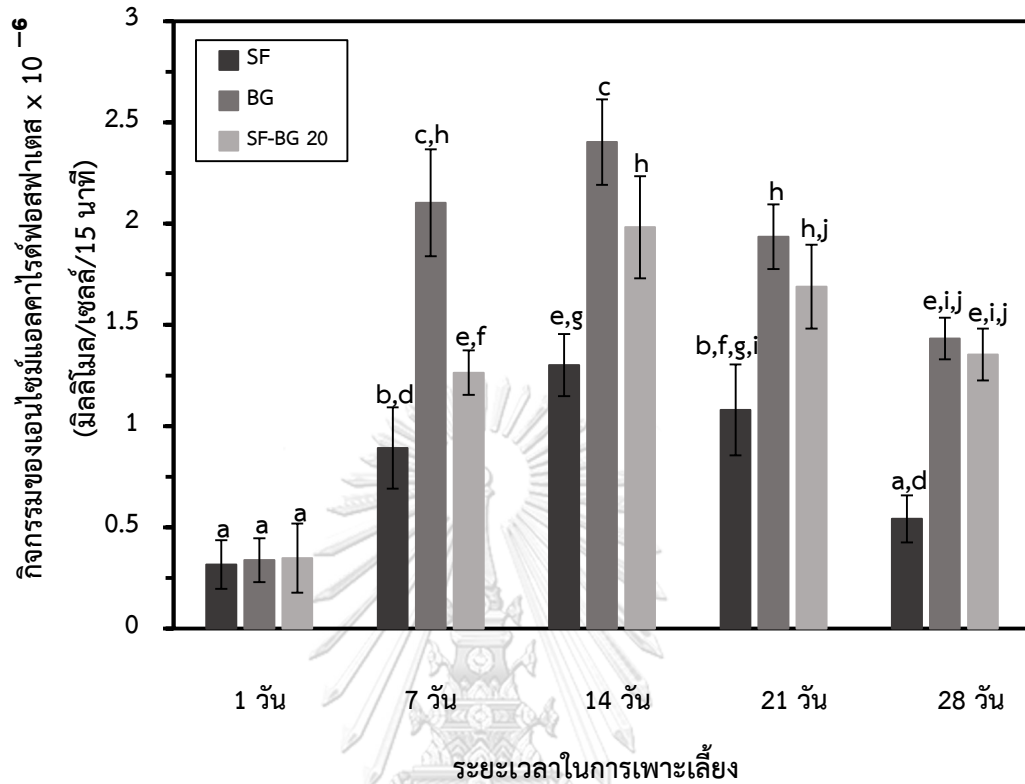
**รูปที่ 39** จำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line ที่เจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF) โครงเลี้ยงเซลล์ไปโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไปโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

(a - p แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

เพื่อศึกษาผลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีต่อกิจกรรมในวิถีการสร้างกระดูก (osteogenic pathway) งานวิจัยนี้จึงศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากเซลล์ SaOS-2 cell line ซึ่งเป็นเครื่องหมายของวิถีการสร้างกระดูก บนโครงเลี้ยงเซลล์ SF, โครงเลี้ยงเซลล์ BG และโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM เป็นเวลา 28 วัน (รูปที่ 40)

ผลการทดลองเผยให้เห็นว่าในช่วงวันที่ 1-14 ปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าเพิ่มขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิด และปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าสูงสุดในวันที่ 14 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้นในช่วงวันที่ 14-28 พบว่าปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าลดลงในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zhang Z.Y และคณะ ในปี 2009 [1] ว่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะเกิดขึ้นสูงสุดในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์และถือเป็นสัญญาณการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกช่วงแรกหรือ Early marker

เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7-14 วัน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF มีปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสน้อยที่สุด และเมื่อมีการนำ BG เข้ามาร่วมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 พบว่ามีปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากขึ้น แต่ยังไม่เทียบเท่ากับโครงเลี้ยงเซลล์ BG ที่มีปริมาณของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงที่สุด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า BG สามารถชักนำให้เซลล์สร้างกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้

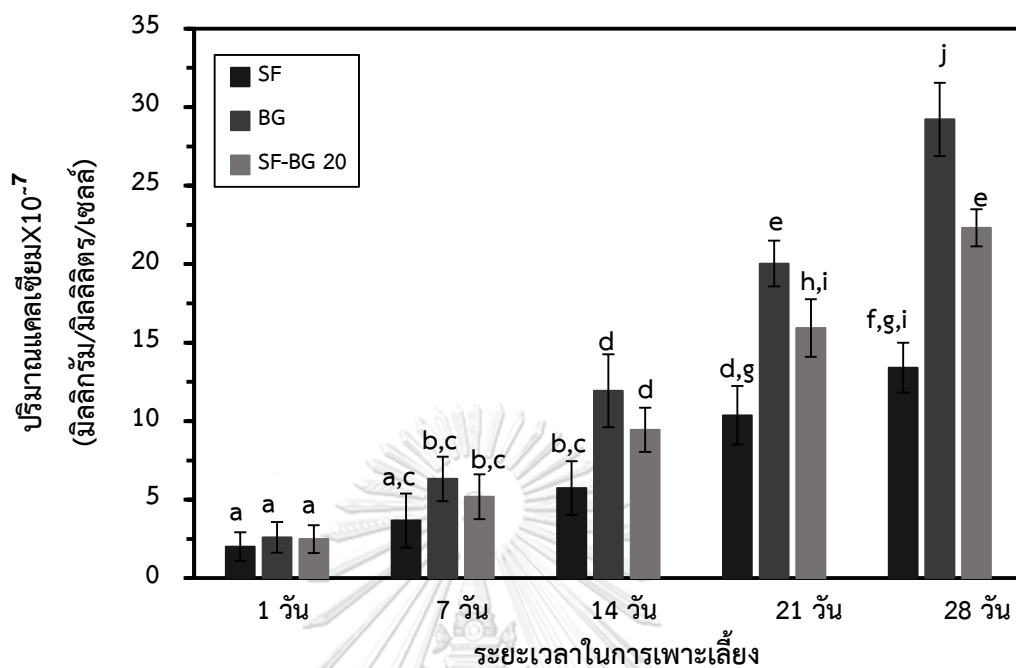


**รูปที่ 40** กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์โบโอแอกทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและโบโอแอกทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

(a - j แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

ปริมาณแคลเซียมในเซลล์เป็นอีกหนึ่งตัวชี้วัดของกิจกรรมการสร้างกระดูก จากรูปที่ 41 แสดงปริมาณของแคลเซียมภายในเซลล์ที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ SF, โครงเลี้ยงเซลล์ BG และโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM เป็นเวลา 28 วัน พบว่าปริมาณของแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดใดก็ตาม และมีปริมาณของแคลเซียมสูงสุดในวันที่ 28 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kim U.J. และคณะ ในปี 2005 [75] ว่าแคลเซียมที่เกิดขึ้นเป็น Late marker ที่แสดงว่าเซลล์มีการสะสมแคลเซียมภายในเซลล์เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการสร้างกระดูก และปริมาณของแคลเซียมจะเริ่มสูงในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป

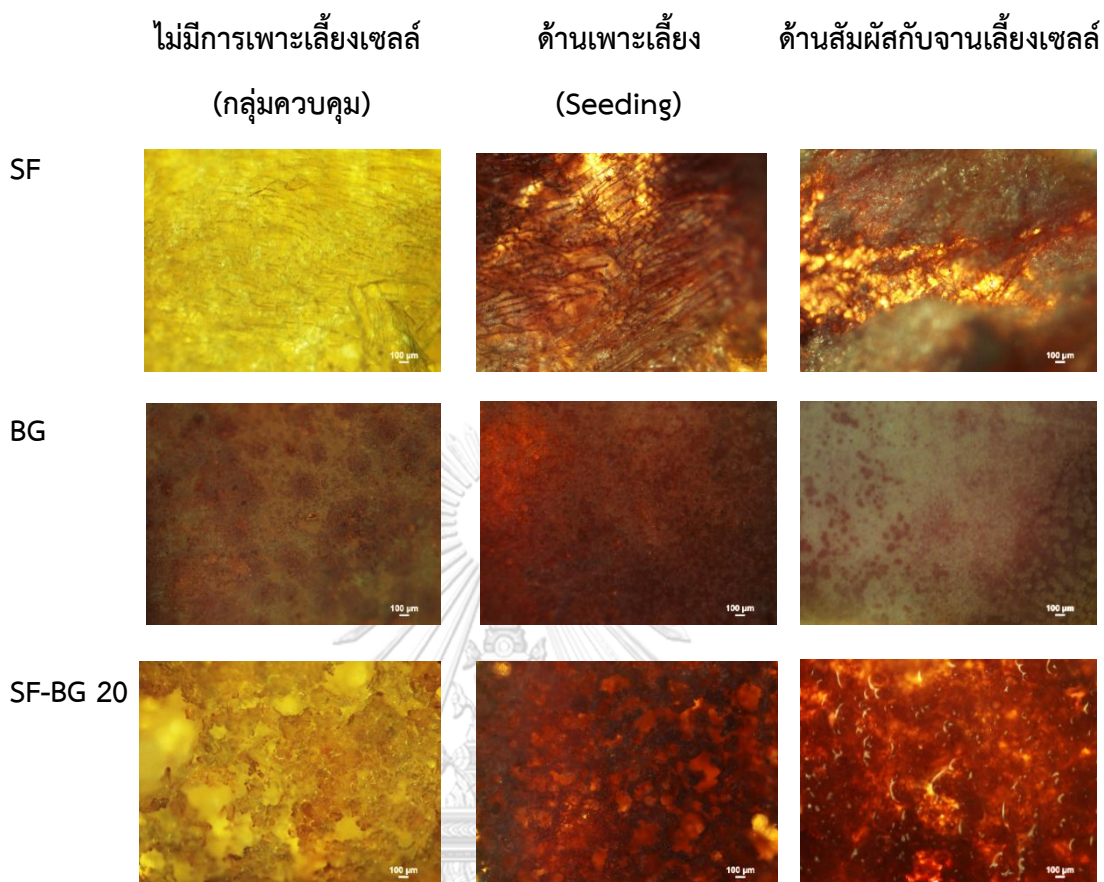
เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงใน 21-28 วัน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF มีปริมาณของแคลเซียมสะสมภายในเซลล์น้อยที่สุด และเมื่อมีการนำ BG เข้ามาร่วมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 พบว่ามีปริมาณแคลเซียมสะสมมากขึ้น แต่ยังไม่เทียบเท่ากับโครงเลี้ยงเซลล์ BG ที่มีปริมาณของแคลเซียมสะสมสูงที่สุด ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณของแคลเซียมสะสมภายในเซลล์สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีผลกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงจะให้ปริมาณของแคลเซียมสะสมภายในเซลล์สูงด้วย [79]



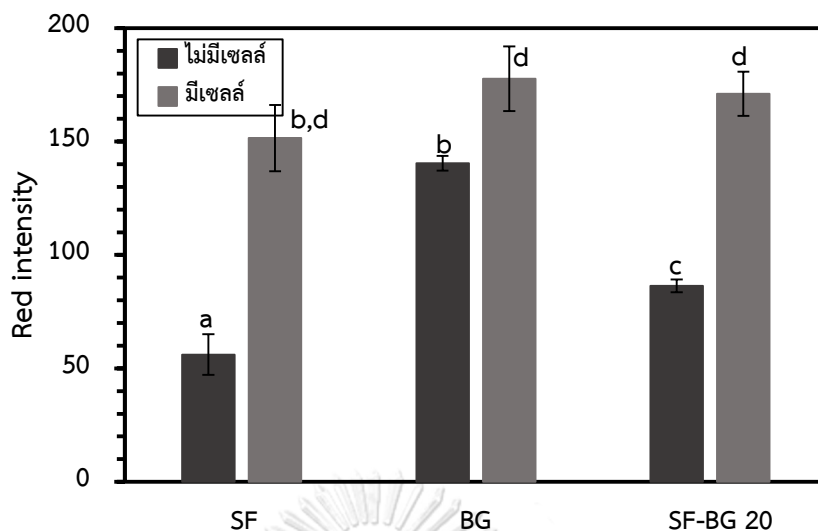
**รูปที่ 41** ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (a - j แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

เพื่อยืนยันผลที่กล่าวมาข้างต้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาปริมาณแคลเซียมที่ตกตะกอน (Calcium deposition) ออกมาบนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการย้อมสี Alizarin Red บนโครงเลี้ยงเซลล์ SF, โครงเลี้ยงเซลล์ BG และโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน (รูปที่ 42) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดมีผลให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียม เนื่องจากติดสีแดงของ Alizarin Red ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ ไม่ติดสีแดงของ Alizarin Red ผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยในการเร่งการซ่อมแซม

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีแดงของ Alizarin Red ที่ติดบนโครงเลี้ยงเซลล์ SF, โครงเลี้ยงเซลล์ BG และโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ที่เพาะเลี้ยงเซลล์และไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยโปรแกรม Image J (รูปที่ 43ก) พบว่าหลังเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 28 วัน โครงเลี้ยงเซลล์ SF ติดสีย้อมสูงชันกว่าแบบไม่มีเซลล์ประมาณร้อยละ 170 เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ BG และโครงเลี้ยงเซลล์ผสม SF-BG 20 ติดสีย้อมสูงชันประมาณร้อยละ 26 และ 98 ตามลำดับ (รูปที่ 43ข) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่โครงเลี้ยงเซลล์ SF ติดสีย้อมสูงชันกว่า เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ SF มีปริมาณของแคลเซียมสะสมภายในเซลล์น้อยที่สุด (จากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์) ปริมาณแคลเซียมนั้นอาจตกตะกอนออกมาบนโครงเลี้ยงเซลล์



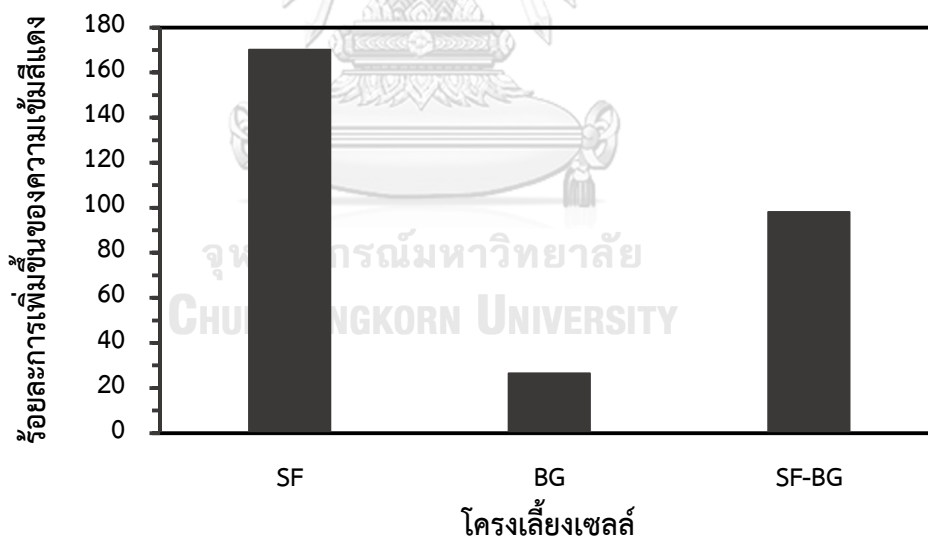
รูปที่ 42 การติดสีย้อม Alizarin Red (Calcium secretion) ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF) , โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5



โครงเลี้ยง

ก) ความเข้มของสีแดงของ Alizarin Red บนโครงเลี้ยงเซลล์ SF, โครงเลี้ยงเซลล์ BG และโครงเลี้ยง SF-BG 20 ที่ไม่มีและมีการเพาะเลี้ยงเซลล์

(a - d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

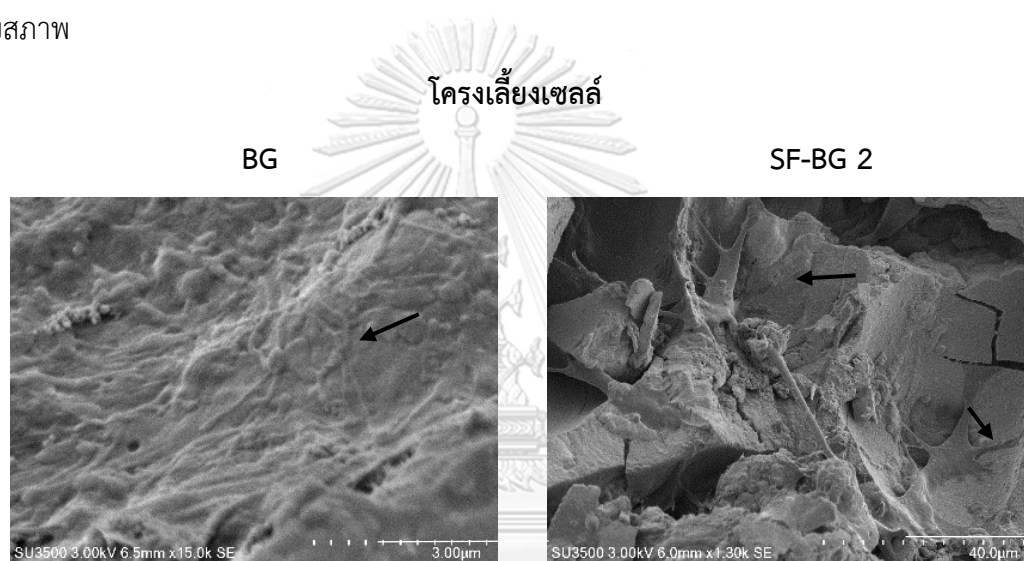


ข) ร้อยละความเข้มของสีแดงของ Alizarin red ที่เกิดขึ้น หลังจากมีการเพาะเลี้ยงเซลล์

**รูปที่ 43** ความเข้มของสีแดงของ Alizarin Red บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (SF), โครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟฟอสฟอรัส (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟฟอสฟอรัสที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5



จากรูปที่ 44 แสดงลักษณะการเกาะของเซลล์ SaOS-2 cell line บนโครงเลี้ยงเซลล์ BG และโครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM เป็นเวลา 28 วัน พบว่า มีเซลล์เกาะแผ่ขยายอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้โครงเลี้ยงเซลล์ SF ไม่สามารถแสดงภาพลักษณะการเกาะของเซลล์ได้ อาจเนื่องมาจากการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการรักษาสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล ที่ความเข้มข้น 30-100% โดยปริมาตร (serial dilution) และการทำแห้งด้วยเทคนิคการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวไปแทนที่สารละลายอินทรีย์ แล้วคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นแก๊ส (critical point dry) ที่ทำให้เซลล์เสียสภาพ



รูปที่ 44 ลักษณะเซลล์ SaOS-2 cell line ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟฟอสเฟตที่ฟอสเฟต (BG) และโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟฟอสเฟตที่เชื่อมขวางด้วย GPTMS เข้มข้น 20%wt (SF-BG 20) เป็นเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสภาวะความดันบรรยากาศและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

( —————> ; เซลล์ SaOS-2)

## บรรณานุกรม

1. Zhang, Z.Y., et al., *A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2009. 30(14): p. 2694-704.
2. Khan, Y., et al., *Tissue engineering of bone: material and matrix considerations*. *J Bone Joint Surg Am*, 2008. 90 Suppl 1: p. 36-42.
3. Azami, M., F. Moztarzadeh, and M. Tahriri, *Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques*. *Journal of Porous Materials*, 2009. 17(3): p. 313-320.
4. Bouet, G., et al., *In vitro three-dimensional bone tissue models: from cells to controlled and dynamic environment*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015. 21(1): p. 133-56.
5. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. *Trends Biotechnol*, 2012. 30(10): p. 546-54.
6. Jones, J.R., et al., *Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation*. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010. 224(12): p. 1373-87.
7. Buck, D.W., 2nd and G.A. Dumanian, *Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals*. *Plast Reconstr Surg*, 2012. 129(6): p. 1314-20.
8. Buck, D.W., 2nd and G.A. Dumanian, *Bone biology and physiology: Part II. Clinical correlates*. *Plast Reconstr Surg*, 2012. 129(6): p. 950e-956e.
9. Melke, J., et al., *Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering*. *Acta Biomater*, 2016. 31: p. 1-16.
10. Zhao, Y., et al., *Nonwoven silk fibroin net/nano-hydroxyapatite scaffold: preparation and characterization*. *J Biomed Mater Res A*, 2009. 91(4): p. 1140-9.
11. Rezwan, K., et al., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2006. 27(18): p. 3413-31.
12. Tang, D., et al., *Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration*. *Biomaterials*, 2016. 83: p. 363-82.

13. Mahony, O., et al., *Silica-gelatin hybrids for tissue regeneration: inter-relationships between the process variables*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2013. 69(2): p. 288-298.
14. พูนคำ, ร., มหกายวิภาคศาสตร์-เนื้อเยื่อวิทยาของระบบกล้ามเนื้อและกระดูก. 2015: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
15. O'Brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials Today, 2011. 14(3): p. 88-95.
16. Farokhi, M., et al., *Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering*. Biotechnol Adv, 2018. 36(1): p. 68-91.
17. Dieudonne, X., et al., *Bioactive glass hybrids: a simple route towards the gelatin-SiO<sub>2</sub>-CaO system*. Chem Commun (Camb), 2014. 50(63): p. 8701-4.
18. Poon, B., et al., *Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls*. J Pharm Pharmacol, 2016. 68(2): p. 139-47.
19. Chan, B.P. and K.W. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. Eur Spine J, 2008. 17 Suppl 4: p. 467-79.
20. Murphy, C.M., M.G. Haugh, and F.J. O'Brien, *The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2010. 31(3): p. 461-6.
21. Zhang, Q., et al., *Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration*. Acta Biomater, 2014. 10(5): p. 2005-13.
22. Luo, Z., ; Zang, Q.; Shi, M.; Zhang, Y.; Tao, W., *Effect of Pore Size on the Biodegradation Rate of Silk Fibroin Scaffolds*. Advances in Materials Science and Engineering 2015. 2015(9): p. 1932-5.
23. Kundu, B., et al., *Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. 65(4): p. 457-70.
24. Ude, A.U., et al., *Bombyx mori silk fibre and its composite: A review of contemporary developments*. Materials & Design, 2014. 57: p. 298-305.
25. Lewin, M., *Handbook of Fiber Chemistry* International fiber science and technology series, 2007.
26. Mondal, M., K. Trivedy, and N. Kumar, *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review* Caspian Journal of Environmental

- Sciences, 2007. 5(2): p. 63-76.
27. Koh, L.-D., et al., *Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials*. Progress in Polymer Science, 2015. 46: p. 86-110.
  28. Bhattacharjee, P., et al., *Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview*. Acta Biomater, 2017. 63: p. 1-17.
  29. Lamboni, L., et al., *Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery*. Biotechnol Adv, 2015. 33(8): p. 1855-67.
  30. Wang, Y., et al., *In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds*. Biomaterials, 2008. 29(24-25): p. 3415-28.
  31. Lu, Q., et al., *Degradation mechanism and control of silk fibroin*. Biomacromolecules, 2011. 12(4): p. 1080-6.
  32. Zhou, J., et al., *In vitro and in vivo degradation behavior of aqueous-derived electrospun silk fibroin scaffolds*. Polymer Degradation and Stability, 2010. 95(9): p. 1679-1685.
  33. Lia, M., M. Ogisob, and N. Minourab, *Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets* Biomaterials, 2003. 24: p. 357–365.
  34. Mandal, B.B. and S.C. Kundu, *Biospinning by silkworms: silk fiber matrices for tissue engineering applications*. Acta Biomater, 2010. 6(2): p. 360-71.
  35. Correia, C., et al., *Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells*. Acta Biomater, 2012. 8(7): p. 2483-92.
  36. Varkey, A., et al., *Impact of silk fibroin-based scaffold structures on human osteoblast MG63 cell attachment and proliferation*. Int J Nanomedicine, 2015. 10 Suppl 1: p. 43-51.
  37. Rahaman, M.N., et al., *Bioactive glass in tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2011. 7(6): p. 2355-2373.
  38. Valliant, E.M. and J.R. Jones, *Softening bioactive glass for bone regeneration: sol-gel hybrid materials*. Soft Matter, 2011. 7(11).
  39. Fu, Q., et al., *Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2011. 31(7): p. 1245-1256.

40. Martin, R.A., et al., *Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2012. 370(1963): p. 1422-43.
41. Wu, C., et al., *Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability*. Acta Biomater, 2011. 7(6): p. 2644-50.
42. Lei, B., et al., *Biomimetic and molecular level-based silicate bioactive glass-gelatin hybrid implants for loading-bearing bone fixation and repair*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. 1(38).
43. Li, R., A.E. Clark, and L.L. Hench, *An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing* Journal of Applied Biomaterials, 1991. 2: p. 231-239
44. Gunawidjaja, P.N., et al., *Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations in vitro: inferences from solid-state nuclear magnetic resonance*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2012. 370(1963): p. 1376-99.
45. Midha, S., et al., *Preconditioned 70S30C bioactive glass foams promote osteogenesis in vivo*. Acta Biomater, 2013. 9(11): p. 9169-82.
46. Jones, J.R., L.M. Ehrenfried, and L.L. Hench, *Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. 27(7): p. 964-73.
47. Fu, Q., et al., *Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. II. In vitro and in vivo biological evaluation*. J Biomed Mater Res A, 2010. 95(1): p. 172-9.
48. Sadeghpour, S., et al., *Fabrication of a novel nanostructured calcium zirconium silicate scaffolds prepared by a freeze-casting method for bone tissue engineering*. Ceramics International, 2014. 40(10): p. 16107-16114.
49. Mansur, H.S. and H.S. Costa, *Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications*. Chemical Engineering Journal, 2008. 137(1): p. 72-83.
50. Fu, Q., et al., *Mechanical and in vitro performance of 13-93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique*. Acta Biomater,

2008. 4(6): p. 1854-64.
51. Gerhardt, L.C. and A.R. Boccaccini, *Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. Materials (Basel), 2010. 3(7): p. 3867-3910.
  52. Cho, Y.S., et al., *A novel technique for scaffold fabrication: SLUP (salt leaching using powder)*. Current Applied Physics, 2014. 14(3): p. 371-377.
  53. Nireesha, G., et al., *Lyophilization/Freeze Drying - An Review* INTERNATIONAL JOURNAL OF NOVEL TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES 2013. 3(4): p. 2277 – 2782
  54. Pereira, M.M., et al., *Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method*. JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE, 2005. 16: p. 1045– 1050.
  55. Jones, J.R. and L.L. Hench, *Regeneration of trabecular bone using porous ceramics*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2003. 7(4-5): p. 301-307.
  56. de Barros Coelho, M. and M. Magalhaes Pereira, *Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: effect of surfactant type and concentration*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. 75(2): p. 451-6.
  57. Coletta, D.J., et al., *Characterization of Hybrid Bioactive Glass-polyvinyl Alcohol Scaffolds Containing a PTHrP-derived Pentapeptide as Implants for Tissue Engineering Application*. The Open Biomedical Engineering Journal, 2014. 8: p. 20-27.
  58. Mishra, R., B. Basu, and A. Kumar, *Physical and cytocompatibility properties of bioactive glass-polyvinyl alcohol-sodium alginate biocomposite foams prepared via sol-gel processing for trabecular bone regeneration*. J Mater Sci Mater Med, 2009. 20(12): p. 2493-500.
  59. Reddy, N., R. Reddy, and Q. Jiang, *Crosslinking biopolymers for biomedical applications*. Trends Biotechnol, 2015. 33(6): p. 362-9.
  60. Oryan, A., et al., *Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds*. Int J Biol Macromol, 2018. 107(Pt A): p. 678-688.
  61. da Silva, R.R., et al., *Fabrication of Biocompatible, Functional, and Transparent*

- Hybrid Films Based on Silk Fibroin and Epoxy Silane for Biophotonics*. ACS Appl Mater Interfaces, 2017. 9(33): p. 27905-27917.
62. Wang, D., et al., *Effect of inorganic/organic ratio and chemical coupling on the performance of porous silica/chitosan hybrid scaffolds*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. 70(Pt 2): p. 969-975.
  63. Lao, J., et al., *Bioactive glass–gelatin hybrids: building scaffolds with enhanced calcium incorporation and controlled porosity for bone regeneration*. Journal of Materials Chemistry B, 2016. 4(14): p. 2486-2497.
  64. Gao, C., et al., *Fabrication and in vitro characterization of electrospun poly ( $\gamma$ -glutamic acid)-silica hybrid scaffolds for bone regeneration*. Polymer, 2016. 91: p. 106-117.
  65. He, X., H. Xu, and H. Li, *Cr(VI) Removal from Aqueous Solution by Chitosan/Carboxymethyl Cellulose/Silica Hybrid Membrane*. World Journal of Engineering and Technology, 2015. 03(03): p. 234-240.
  66. Connell, L.S., et al., *Chemical characterisation and fabrication of chitosan–silica hybrid scaffolds with 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane*. J. Mater. Chem. B, 2014. 2(6): p. 668-680.
  67. Gao, C., et al., *In vitro evaluation of electrospun gelatin-bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration*. Journal of Applied Polymer Science, 2013. 127(4): p. 2588-2599.
  68. Russo, L., et al., *Novel silica/bis(3-aminopropyl) polyethylene glycol inorganic/organic hybrids by sol–gel chemistry*. Materials Chemistry and Physics, 2013. 140(1): p. 168-175.
  69. Tonda-Turo, C., et al., *Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent*. Int J Biol Macromol, 2011. 49(4): p. 700-6.
  70. Tonda-Turo, C., et al., *Crosslinked gelatin nanofibres: preparation, characterisation and in vitro studies using glial-like cells*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. 33(5): p. 2723-35.
  71. Karapanagiotis, I., et al., *Facile Method to Prepare Superhydrophobic and Water Repellent Cellulosic Paper*. Journal of Nanomaterials, 2015. 2015: p. 1-9.
  72. Liu, Y.-L., Y.-H. Su, and J.-Y. Lai, *In situ crosslinking of chitosan and formation of*

- chitosan–silica hybrid membranes with using  $\gamma$ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent.* *Polymer*, 2004. 45(20): p. 6831-6837.
73. Davidenko, N., et al., *Optimisation of UV irradiation as a binding site conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds.* *J Mater Sci Mater Med*, 2016. 27(1): p. 14.
  74. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels.* *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. 64: p. 223-236.
  75. Kim, U.J., et al., *Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin.* *Biomaterials*, 2005. 26(15): p. 2775-85.
  76. Mahony, O., et al., *Silica-Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration.* *Advanced Functional Materials*, 2010. 20(22): p. 3835-3845.
  77. Yoo, S., et al., *Hierarchical multiscale hyperporous block copolymer membranes via tunable dual-phase separation.* *Sci. Adv.* , 2015.
  78. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage* *Biomaterials*, 2000. 21: p. 2529-2543.
  79. Vorrapakdee, R., et al., *Modification of human cancellous bone using Thai silk fibroin and gelatin for enhanced osteoconductive potential.* *J Mater Sci Mater Med*, 2013. 24(3): p. 735-44.
  80. Serra, A., X. Ramis, and X. Fernández-Francos, *Epoxy Sol-Gel Hybrid Thermosets.* *Coatings*, 2016. 6(1).
  81. Cheng, M., et al., *Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions.* *Biomaterials*, 2003. 24(17): p. 2871-2880.
  82. Wongputtaraksa, T., et al., *Surface modification of Thai silk fibroin scaffolds with gelatin and chitooligosaccharide for enhanced osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012. 100(8): p. 2307-15.
  83. Hernández-Barrios, C.A., et al., *Effect of the catalyst concentration, the immersion time and the aging time on the morphology, composition and corrosion performance of TEOS-GPTMS sol-gel coatings deposited on the AZ31*



- magnesium alloy*. Surface and Coatings Technology, 2017. 325: p. 257-269.
84. Kaewprasit, K., et al., *Physico-chemical properties and in vitro response of silk fibroin from various domestic races*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014. 102(8): p. 1639-47.
  85. Connell, L.S., et al., *Functionalizing natural polymers with alkoxysilane coupling agents: reacting 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane with poly( $\gamma$ -glutamic acid) and gelatin*. Polymer Chemistry, 2017. 8(6): p. 1095-1103.
  86. Chamchongkaset, J., et al., *Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering*. Advanced Materials Research, 2008. 55-57: p. 685-688.
  87. Wieding, J., A. Jonitz, and R. Bader, *The Effect of Structural Design on Mechanical Properties and Cellular Response of Additive Manufactured Titanium Scaffolds*. Materials, 2012. 5(8): p. 1336-1347.
  88. Sadat-Shojai, M., et al., *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. Acta Biomater, 2013. 9(8): p. 7591-621.
  89. Ihli, J., A.N. Kulak, and F.C. Meldrum, *Freeze-drying yields stable and pure amorphous calcium carbonate (ACC)*. Chem Commun (Camb), 2013. 49(30): p. 3134-6.
  90. Leontieva, O.V., Z.N. Demidenko, and M.V. Blagosklonny, *Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(24): p. 8832-7.
  91. Lian, B.J. and S.G. Stein, *Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation*. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 1992. 3(3): p. 296-305.
  92. Zhu, H., et al., *Fabrication and characterization of silk fibroin/bioactive glass composite films*. Materials Science and Engineering: C, 2012. 32(4): p. 822-829.
  93. Kokubo, T. and H. Takadama, *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* Biomaterials, 2006. 27(15): p. 2907-15.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยและไบโอแอคทีฟกลาส (กลุ่มควบคุม)

#### - การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย

1. นำสารละลายไฟโบรอินที่มีความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก
2. เทสารละลายลงในแม่พิมพ์เพลลอนและนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 24 ชั่วโมง
3. จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dry) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

#### - การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส (ดัดแปลงจาก Midha S., 2013 [45])

##### การเตรียมโซลของไบโอแอคทีฟกลาส แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

##### การเตรียมสารละลายซิลิกา

1. เตรียมสารละลายซิลิกา โดยละลายเตตระเอทอกซีไซเลน (TEOS) ในน้ำปราศจากประจุที่มีกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล โดยสัดส่วนของน้ำปราศจากประจุต่อกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็น 3:1 มิลลิลิตร และสัดส่วนของเตตระเอทอกซีไซเลนต่อน้ำ เป็น 4:1 โมล
2. ทำการปั่นกวน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายใสเนื้อเดียวกัน และ TEOS จะผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสและควบแน่น

##### การเตรียมสารละลายแคลเซียม

1. เตรียมสารละลายแคลเซียม โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) เป็นสารตั้งต้น ซึ่งละลายในน้ำปราศจากประจุ โดยสัดส่วนของแคลเซียมคลอไรด์ต่อน้ำปราศจากประจุ เป็น 4:1 โมล
2. ทำการปั่นกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายใสเนื้อเดียวกัน

นำสารละลายซิลิกาและแคลเซียมผสมกันโดยกำหนดสัดส่วนซิลิกาต่อแคลเซียมเป็น 70% โมล ต่อ 30% โมล ปั่นกวนจนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน

#### - การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไบโอแอคทีฟกลาส

1. นำสารละลายซิลิกาและแคลเซียมที่เตรียมโดยข้างต้น (สัดส่วนซิลิกาต่อแคลเซียมเป็น 70% โมล ต่อ 30% โมล) ใส่ Teepol (สารที่ทำให้เกิดฟอง) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 5% HF (สารเร่งให้เกิดการเจล) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
2. ทำการตีฟองเป็นเวลา 45 นาที จนสารละลายเป็นฟองคงที่ทั่วบีกเกอร์
3. จากนั้นปิดปากบีกเกอร์พลาสติกด้วยฟอยล์และนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

**ภาคผนวก ข**  
**การเตรียมสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์**  
 (Simulated Body Fluid ; SBF) [93]

ส่วนผสมของสารละลาย SBF ปริมาณ 1 ลิตร

ลำดับ	สารเคมี	ความบริสุทธิ์ (%)	ปริมาณ (กรัม)
1	NaCl	99.5	7.996
2	NaHCO <sub>3</sub>	99.5-100	0.350
3	KCl	99.5	0.224
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	99	0.228
5	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	98	0.305
6	1 M HCl	-	40 ml
7	CaCl <sub>2</sub>	95	0.278
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99	0.071
9	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	99	6.057
10	1 M HCl	-	0 ถึง 5 ml

**วิธีการเตรียมสารละลาย SBF**

1. เตรียมน้ำปราศจากประจุปริมาตร 700 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์พลาสติกขนาด 1000 มิลลิลิตร วางบน magnetic stirrer เพื่อให้ความร้อนอุณหภูมิ 36.5±1.5 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้ามสูงเกิน 38 องศาเซลเซียส) และปิดด้วยกระจกนาฬิกาพร้อมปั่นกวนตลอดการเตรียมสารละลาย
2. ค่อยๆ ละลายสารเคมีทีละตัวตามลำดับ โดยให้สารเคมีละลายหมดก่อน จึงใส่สารละลายตัวต่อไป
3. CaCl<sub>2</sub> มีผลต่อการตกตะกอน ให้ละลายช้าๆ
4. ในการชั่งสาร KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> และ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ต้องทำอย่างรวดเร็ว เพราะเป็นสารเคมีดูดความชื้น
5. ก่อนละลาย (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> พีเอชอยู่ที่ 2.0±1.0 โดยค่อยๆ ใส่ (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> ช้าๆ ถ้าระหว่างการใส่พีเอชมากกว่า 7.45 ให้หยุดใส่ (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> แล้วหยุด 1 M HCl เพื่อปรับพีเอชลงให้อยู่ที่ 7.42 (ใส่ (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> ต่อและปรับพีเอชไปพร้อมๆ กัน)
6. หลังใส่ (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> หมด ค่อยๆ ปรับพีเอช โดยให้พีเอชเป็น 7.40 ด้วย 1 M HCl

7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุให้ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
6. เก็บสารละลาย SBF ในขวดพลาสติกที่ปิดฝาแน่น เก็บที่ความเย็น 4-10 องศาเซลเซียสและสามารถใช้ได้ภายใน 30 วันหลังจากที่เตรียม



## ภาคผนวก ค

## ร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของโครมเลียงเซลล์ภายหลังการแช่น้ำปราศจากประจุ

ตารางที่ 17 ร้อยละโดยน้ำหนักคงเหลือของโครมเลียงเซลล์ภายหลังการแช่น้ำปราศจากประจุที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

โครมเลียงเซลล์	ร้อยละโดยน้ำหนักคงเหลือของโครมเลียงเซลล์
SF	19.87±3.04 <sup>a</sup>
BG	83.49±3.67 <sup>b</sup>
SF-BG 0	34.21±0.95 <sup>c</sup>
SF-BG 10	69.36±1.15 <sup>d</sup>
SF-BG 20	69.45±1.20 <sup>d</sup>
SF-BG 30	70.20±1.80 <sup>d</sup>
SF-BG 40	70.65±1.21 <sup>d</sup>

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบโครมเลียงเซลล์แต่ละชนิด)

## ภาคผนวก ง

ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลอง  
ไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์

ตารางที่ 18 ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลอง  
ไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ที่ BG กำหนดสัดส่วนซิลิกา ต่อแคลเซียมออกไซด์ที่ %mol ต่างๆ	ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์						
	ชม.ที่ 1	ชม.ที่ 2	ชม.ที่ 4	ชม.ที่ 6	ชม.ที่ 8	วันที่ 1	วันที่ 2
Si87.5Ca12.5	0.085±0.089	0.157±0.069	0.200±0.045	0.315±0.070	0.502±0.106	1.349±0.055	1.361±0.063
Si77.8Ca22.2	0.127±0.058	0.236±0.053	0.309±0.065	0.448±0.074	0.629±0.067	1.609±0.058	1.688±0.033
Si70Ca30	0.296±0.042	0.351±0.067	0.460±0.072	0.623±0.072	0.786±0.041	1.760±0.064	1.924±0.093
Si63.64Ca36.36	0.399±0.045	0.508±0.070	0.587±0.081	0.726±0.049	0.926±0.040	1.948±0.057	2.166±0.168

โครงเลี้ยงเซลล์ SF-BG 20 ที่ BG กำหนดสัดส่วนซิลิกา ต่อแคลเซียมออกไซด์ที่ %mol ต่างๆ	ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์						
	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 10	วันที่ 14
Si87.5Ca12.5	1.446±0.041	1.512±0.030	1.525±0.040	1.500±0.042	1.512±0.084	1.537±0.085	1.549±0.104
Si77.8Ca22.2	1.730±0.024	1.809±0.048	1.809±0.040	1.773±0.040	1.748±0.085	1.779±0.050	1.797±0.023
Si70Ca30	1.990±0.052	2.045±0.062	2.015±0.020	2.039±0.137	2.033±0.091	2.051±0.078	2.087±0.035
Si63.64Ca36.36	2.178±0.210	2.202±0.134	2.196±0.160	2.190±0.224	2.166±0.288	2.190±0.198	2.238±0.178

**ภาคผนวก จ**  
**ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่ในสารละลาย**  
**เอนไซม์โปรติเอส XIV**

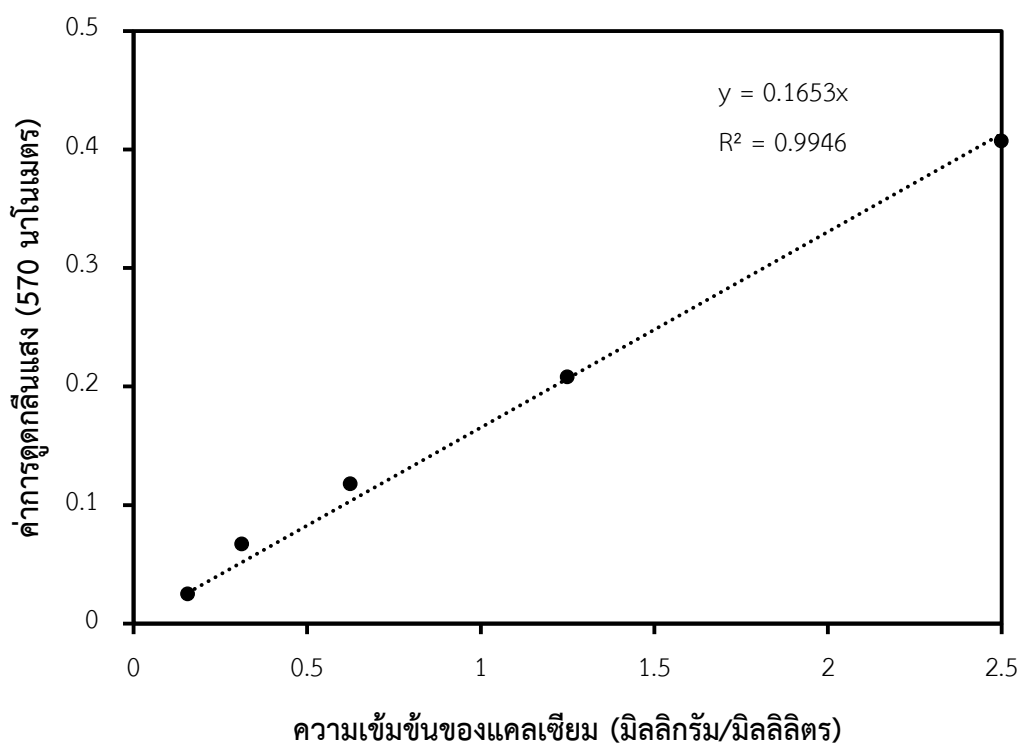
**ตารางที่ 19** ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการแช่ต่างๆ

โครงเลี้ยง เซลล์	ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์							
	ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร							
	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	10 วัน	14 วัน	20 วัน	28 วัน
SF-BG 0	47.50±1.45	40.10±1.11	35.90±1.04	32.15±0.68	29.70±0.68	24.90±1.24	18.40±1.64	14.90±1.44
SF-BG 10	62.25±3.04	55.10±2.05	49.50±1.72	43.10±0.90	37.25±1.60	33.05±1.11	27.80±0.63	19.45±2.33
SF-BG 20	81.95±1.02	68.65±0.60	60.10±1.37	55.10±1.87	50.50±0.84	42.80±1.48	37.80±2.51	31.95±1.61
SF-BG 30	83.80±1.74	72.95±3.90	67.65±2.53	60.80±2.98	56.65±1.78	50.20±0.75	47.25±0.85	37.75±0.66
SF-BG 40	85.05±2.40	79.90±1.24	74.00±2.47	70.65±1.71	65.50±1.31	60.60±2.30	57.30±1.04	54.40±1.32



## ภาคผนวก ฉ

กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณแคลเซียมของความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียม  
ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายจำลองไอออนพลาสมาของเลือดมนุษย์

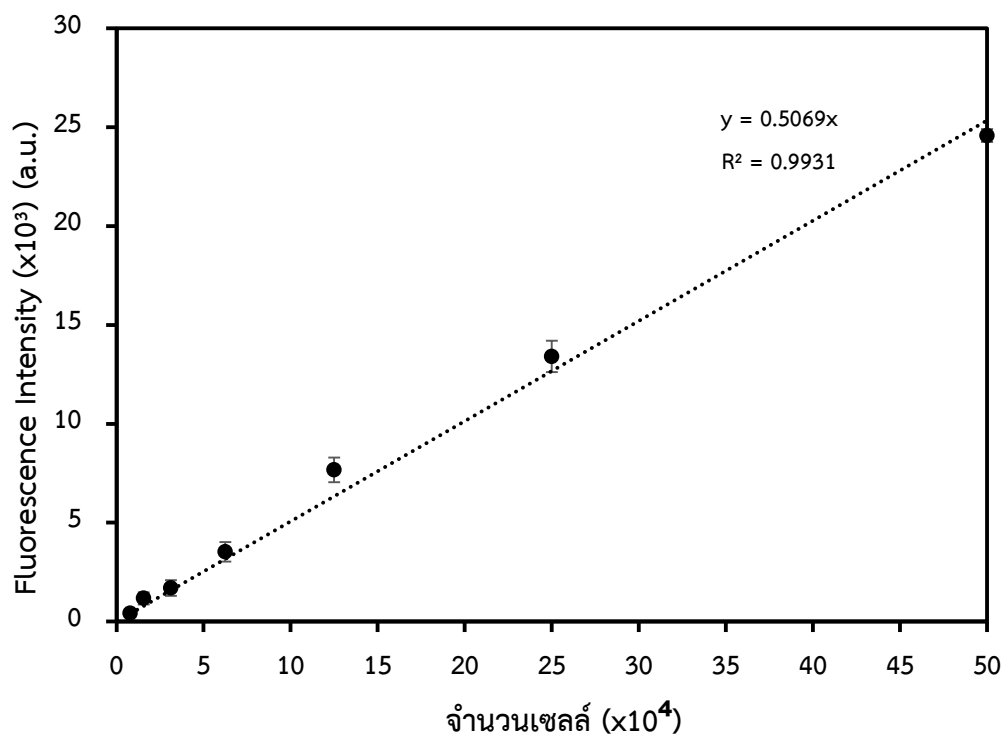


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 45 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม

## ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line โดยวิธี DNA

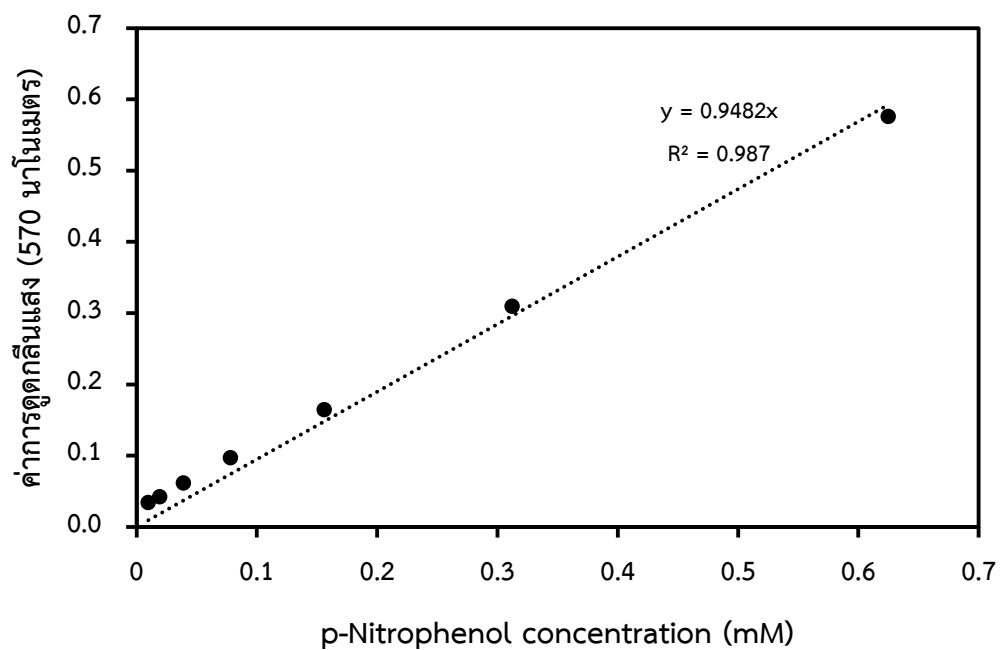


รูปที่ 46 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ SaOS-2 cell line

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ซ

กราฟมาตรฐานของการวัดค่าระดับกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส  
(Alkaline phosphatase activity, ALP)



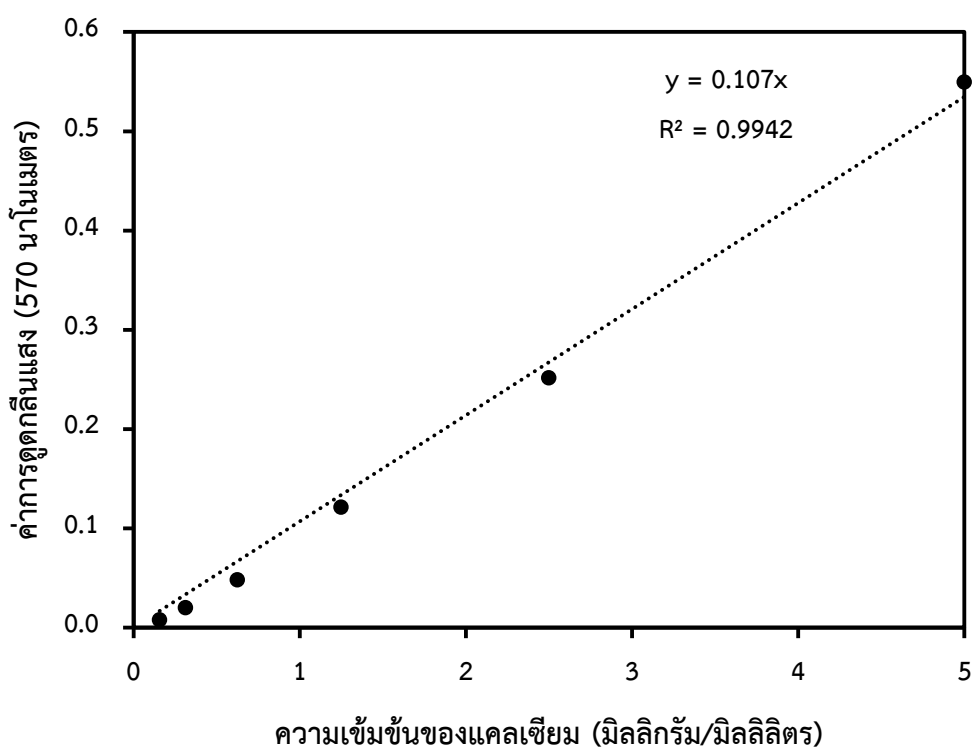
รูปที่ 47 กราฟมาตรฐานของการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)

## ภาคผนวก ฅ

## กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียมที่สะสมภายในเซลล์

(ความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรม (activity) ของเซลล์กระดูก

(Osteoblast cell line: SaOS-2))

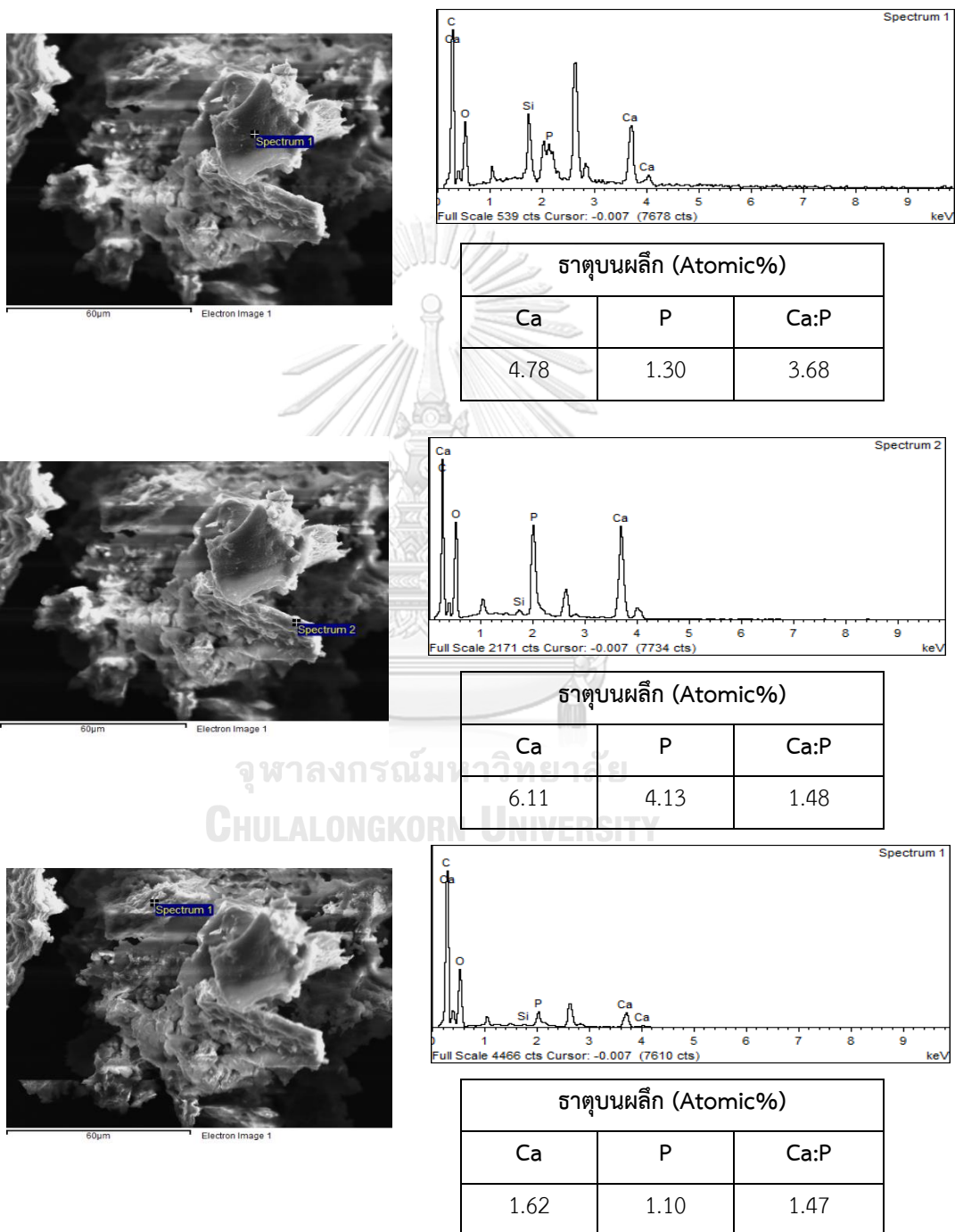


CHULALONGKORN UNIVERSITY

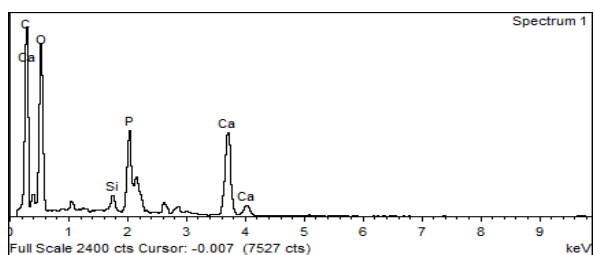
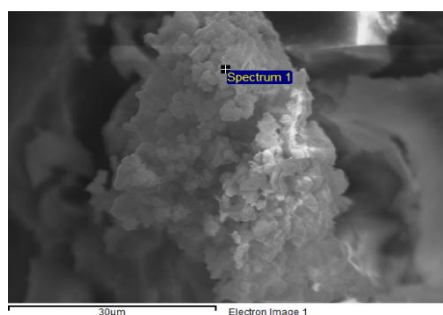
รูปที่ 48 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม

## ภาคผนวก ญ

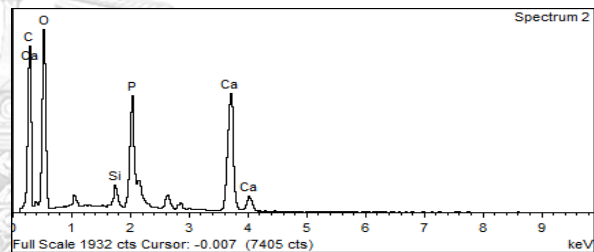
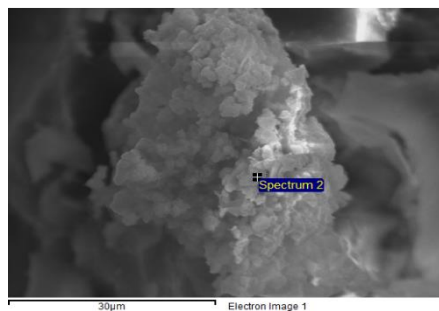
การวิเคราะห์ธาตุของผลึกที่เกิดขึ้นจากโครงเลี้ยงเซลล์ Si70Ca30 และ Si63.64Ca36.36 ด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)



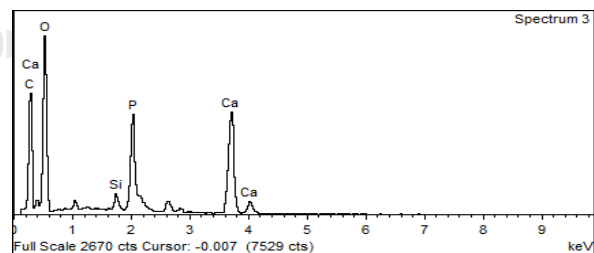
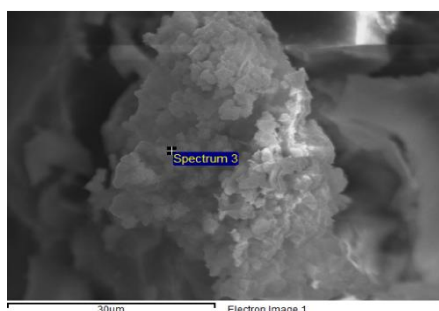
รูปที่ 49 ผลึกที่เกิดขึ้นจากโครงเลี้ยงเซลล์ Si70Ca30



ธาตุบนผลึก (Atomic%)		
Ca	P	Ca:P
4.55	2.89	1.57



ธาตุบนผลึก (Atomic%)		
Ca	P	Ca:P
6.23	3.87	1.61



ธาตุบนผลึก (Atomic%)		
Ca	P	Ca:P
6.15	4.11	1.50

รูปที่ 50 ผลึกที่เกิดจากโครงเลียงเซลล์  $Si_{63.64}Ca_{36.36}$

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวพิมพ์นารา วัฒนชะชัย
วัน เดือน ปี เกิด	22 มิถุนายน 2536
สถานที่เกิด	ชลบุรี
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา 2558 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรสหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559
ที่อยู่ปัจจุบัน	18/2 ม.7 ต.หน้าพระธาตุ อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี 20140
ผลงานตีพิมพ์	Wattanachai, P., and Thongnuek, P. Crosslinking of Thai silk fibroin and bioactive calcium silicate glass for development of bone scaffolds. Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON 2018), The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center, Hat Yai, Songkhla, Thailand, February 7-9, 2018.