

โครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนจากวัสดุประกอบอัลจิเนต/คาร์ราจีแนน
และแคลเซียมซิลิเกตสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก:
การเตรียม การตรวจวิเคราะห์ และการศึกษาในระบบจำลองสภาวะร่างกาย

POROUS ALGINATE/CARRAGEENAN AND CALCIUM SILICATE
COMPOSITE SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING:
PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* STUDIES

อมรา สาเทียน
AMMARA SATHAIN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีพอลิเมอร์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-014-065

โครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนจากวัสดุประกอบอัลจิเนต/คาร์ราจีแนน
และแคลเซียมซิลิเกตสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก:
การเตรียม การตรวจวิเคราะห์ และการศึกษาในระบบจำลองสภาวะร่างกาย

POROUS ALGINATE/CARRAGEENAN AND CALCIUM SILICATE
COMPOSITE SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING:
PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* STUDIES

อมรา สาเทียน
AMMARA SATHAIN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีพอลิเมอร์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-014-065

POROUS ALGINATE/CARRAGEENAN AND CALCIUM SILICATE
COMPOSITE SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING:
PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* STUDIES

AMMARA SATHAIN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN POLYMER TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2019
KMITL-2019-SC-M-014-065

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	โครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนจากวัสดุประกอบอัลจิเนต/ คาร์ราจีแนน และแคลเซียมซิลิเกตสำหรับงานวิศวกรรม เนื้อเยื่อกระดูก: การเตรียม การตรวจวิเคราะห์ และ การศึกษาในระบบจำลองสภาวะร่างกาย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอมรา สาเทียน
รหัสประจำตัว	60605057
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีพอลิเมอร์)
ภาควิชา	เคมี
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ภัทราวุธ มนต์วิเศษ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.ปุณณมา ศิริพันธ์โนน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนจากวัสดุประกอบอัลจิเนต/คาร์ราจีแนน และแคลเซียมซิลิเกตสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยผสมสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีการตกตะกอนกับอัลจิเนตและคาร์ราจีแนนในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนอัลจิเนต:คาร์ราจีแนน:แคลเซียมซิลิเกตเป็น 1:1:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) แล้วนำมาเชื่อมโยงด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที แล้วนำมาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เปอร์เซ็นต์การเสียสภาพ และเปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือในสารละลายจำลองของเหลวในร่างกาย (Simulated body fluid, SBF) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่าสูตร SC-1.5-120 เป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากมีค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร และเปอร์เซ็นต์การเสียสภาพต่ำ รวมถึงมีค่าเปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือที่มาก และเมื่อทำการศึกษาความว่องไวในการก่อผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยเทคนิค FTIR, XRD และ SEM โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต และคาร์ราจีแนนมีความว่องไวในการก่อให้เกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ยังศึกษาสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งและเปียกพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มีแคลเซียมซิลิเกต (SC-1.5-120) เป็นองค์ประกอบ มีคามอดุลัสกอดัดและความแข็งแรงกอดัดมากกว่าสูตรที่ไม่มีแคลเซียมซิลิเกต (S-1.5-120) เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้รูปร่างและสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเปียกสามารถคืนตัวกลับมาหลังทำการแช่ในสารละลาย SBF รวมถึงยังพบว่าค่าความแข็งแรงกอดัดของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งมีค่าใกล้เคียงกับค่าความแข็งแรงกอดัดของกระดูกเนื้อโปร่ง (Cancellous bone) ของร่างกาย และผลของการศึกษาพฤติกรรมการปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใส่ยาโดโคลิฟิแนคเป็นยาต้นแบบ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการปลดปล่อยยาในปริมาณมากในช่วง 2 วันแรก (~60 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นรูปแบบการ

ปลดปล่อยยาที่เหมาะสมสำหรับการรักษาอาการอักเสบเฉียบพลันหลังการผ่าตัด และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity assay) พบว่าโครงเลียงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ SC-1.5-120 (Diclofenac) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าโครงเลียงเซลล์สูตร SC-1.5-120 สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุสำหรับทดแทนกระดูกได้

คำสำคัญ : คาร์ราจีแนน แคลเซียมซิลิเกต โครงเลียงเซลล์ วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก อัลจินตไฮดรอกซีอะพาไทต์

Thesis Title	Porous Alginate/Carrageenan and Calcium Silicate Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Preparation, Characterization and <i>In Vitro</i> Studies
Student Name	Miss Ammara Sathain
Student ID	60605057
Degree	Master of Science (Polymer Technology)
Department	Chemistry
Year	2019
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Pathavuth Monvisade
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Punnama Siriphannon

Abstract

This research studied on the preparation of porous alginate/carrageenan and calcium silicate composite scaffolds for bone tissue engineering. The composite scaffolds were prepared by mixing synthesized calcium silicate (by precipitation technique), alginate and carrageenan in distilled water at 90 °C. The weight ratio of alginate: carrageenan: calcium silicate was 1:1:1. Subsequently, the composite scaffolds was shaped by freeze-drying and further crosslinked with 0.5, 1.0 and 1.5 M calcium chloride for 30, 60 and 120 min. The %water content, %volume change, %degradation and %solid remain in SBF solution at 37 °C for 7, 14, 21 and 28 days of the scaffolds were examined. It was found that the SC-1.5-120 scaffold was the most suitable formula due to possessing the lowest value of %water content, %volume change, and %degradation whereas still high %solid remain value. *In vitro* bioactivity of the composite scaffolds was studied by FTIR, XRD and SEM techniques at condition of soaking in simulated body fluid (SBF) at 37 °C for 28 days. It was found that calcium silicate and carrageenan could induce the formation of hydroxyapatite crystals. In addition, the mechanical properties of the composite scaffolds were studied in dry and wet conditions. It was found that the compressive modulus and compressive strength of the composite scaffold with calcium silicate (SC-1.5-120) were greater than that of scaffold without calcium silicate (S-1.5-120) both in dry and in wet conditions. Moreover, the shape and mechanical properties of wet scaffolds could be restored to the original after immersing in the SBF solution. Furthermore, the compressive strength of the dry scaffold was similar to compressive strength of the cancellous bone. *In vitro* drug release behavior of the SC-1.5-120 scaffold by using diclofenac as a model drug showed that almost amount of drug was released within 2 days (~60%). It was suggested that the drug release profile was suitable for the treatment of acute

inflammation after surgery. Additionally, it was found that the scaffold with or without drug (SC-1.5-120 and SC-1.5-120 (Diclofenac) scaffolds) were nontoxic to our living cells. Therefore, the SC-1.5-120 scaffold could be applied as a material for bone replacement.

Keywords : Carrageenan, Calcium silicate, Scaffold, Bone tissue engineering, Alginate, Hydroxyapatite

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีจากความช่วยเหลือของคณาจารย์ และบุคคลหลายฝ่ายที่ทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ ทางผู้จัดทำวิทยานิพนธ์นี้จึงขอขอบพระคุณผู้ให้ความช่วยเหลือ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ภัทราวุธ มนต์วิเศษ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.ปยุตมา ศิริพันธ์โนน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ปรับปรุงแก้ไข ข้อบกพร่อง และปัญหาต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง พร้อมทั้งให้ความช่วยเหลือตลอดการดำเนินวิทยานิพนธ์นี้ ทำให้การจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการ รศ.ดร.ทวีชัย อมรศักดิ์ชัย ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ และ ผศ.ดร.สุภารัตน์ รักชลธิ อาจารย์บัณฑิตประจำ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำแนะนำ ตรวจสอบความถูกต้อง รวมถึงปรับปรุงแก้ไขต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบทุนเสนอผลงานวิจัยให้ ทำให้มีโอกาสส่งงานวิจัยนี้ไปเผยแพร่แก่ผู้อื่น และได้รับประสบการณ์รวมถึงความรู้เพิ่มมากขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือฯ และเจ้าหน้าที่อาคารปฏิบัติการพอลิเมอร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนในการทำวิจัย การจัดซื้อสารเคมี และการส่งทดสอบ รวมถึงความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ และทดสอบชิ้นงานตลอดการดำเนินวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา รุ่นพี่ และเพื่อน ๆ ภาควิชาเคมี สาขาเทคโนโลยีพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจ จนการดำเนินวิทยานิพนธ์พิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ประโยชน์ และความรู้อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์นี้ขอมอบแต่บิดา มารดา ครอบครัว ผู้มีพระคุณ และคณาจารย์ทุกท่าน หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขอน้อมรับ และขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวอมรา สาเทียน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กระดูก (Bone).....	4
2.1.1 โครงสร้างของกระดูก (Bone structure)	4
2.1.2 องค์ประกอบของกระดูก (Bone component)	5
2.1.3 การซ่อมแซมกระดูก.....	5
2.1.4 สมบัติเชิงกลของกระดูก.....	5
2.2 วัสดุทดแทนกระดูก.....	6
2.2.1 สมบัติของวัสดุทดแทนกระดูก.....	6
2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (Bone tissue engineering)	7
2.3.1 โครงเลี้ยงเซลล์หรือโครงค้ำยัน	7
2.3.1.1 หน้าที่ของโครงเลี้ยงเซลล์.....	8
2.3.1.2 สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	8
2.3.1.3 วัสดุชีวภาพ (Biomaterial) ที่ใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์	9
2.4 ไฮโดรเจล (Hydrogel).....	14
2.4.1 ประเภทของไฮโดรเจลแบ่งตามวิธีการเชื่อมโยง.....	15
2.4.2 วิธีการเตรียมไฮโดรเจล (Preparation methods of hydrogels)	15
2.4.2.1 การเตรียมไฮโดรเจลโดยการเชื่อมโยงทางเคมี.....	15
2.4.2.2 การเชื่อมโยงทางกายภาพ	17
2.4.3 สมบัติที่สำคัญของไฮโดรเจล	23
2.4.3.1 การดูดซับน้ำของไฮโดรเจล	23
2.4.3.2 การบวมตัวและปัจจัยที่ส่งผลต่อการบวมตัวของไฮโดรเจล	24
2.4.3.3 ความหนาแน่นของพันธะร่างแห (Crosslinking density)	25
2.4.3.4 การย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradation).....	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.3.5 ความยืดหยุ่น (Elasticity).....	26
2.4.4 โครงสร้างและโมเลกุลของน้ำในไฮโดรเจล.....	26
2.4.5 ชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจล	27
2.4.5.1 อัลจินต	28
2.4.5.2 คาร์ราจีแนน	32
2.5 การปลดปล่อยยา (Controlled release, CR)	37
2.5.1 Membrane controlled device.....	38
2.5.2 Matrix device.....	38
2.6 ยาไดโกลฟีแนค	39
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	40
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	44
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	44
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	45
3.3 การเตรียมสารละลาย.....	46
3.3.1 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลต่อลิตร	46
3.3.2 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลต่อลิตร	47
3.3.3 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลต่อลิตร	47
3.3.4 สารละลาย SBF	47
3.4 การสังเคราะห์สารประกอบแคลเซียมซิลิเกตด้วยวิธีการตกตะกอน	47
3.5 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจินต คาร์ราจีแนน และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต	48
3.6 การเชื่อมโยงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์	48
3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์	49
3.7.1 วัดขนาดอนุภาคของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering.....	49
3.7.2 วัดขนาดอนุภาคของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM.....	49
3.7.3 วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)	49
3.7.4 วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF)...	50
3.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์	50
3.8.1 ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์	50
3.8.2 เพอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์	50
3.8.3 การกระจายตัวของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต และสารเชื่อมโยงในโครง- เลี้ยงเซลล์	51
3.8.4 วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค FT-IR	51
3.9 การทดสอบหาค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์.....	51
(%Water content, %WC).....	51

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.10 การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร (%Volume change, %VC)	51
3.11 การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือ (%Solid remain, %SR).....	52
3.12 การหาเปอร์เซ็นต์การเสีสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ (%Degradation).....	52
3.13 การศึกษาสมบัติความว่องไวทางชีวภาพของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตใน การเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์.....	52
3.13.1 การทดสอบ FTIR	53
3.13.2 การทดสอบ SEM-EDS	53
3.13.3 การทดสอบ XRD.....	53
3.14 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับทดสอบแรงกดอัด	53
3.14.1 การทดสอบแรงกดอัด (Compressive test).....	53
3.15 การศึกษาพฤติกรรมการปลดปล่อยตัวยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์	54
3.16 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay	55
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	56
4.1 การตรวจวิเคราะห์ของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์	56
4.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์..	57
4.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์	59
4.4 ผลของการเชื่อมโยงด้วยสารละลาย $CaCl_2$	62
4.4.1 เปอร์เซนต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เปอร์เซนต์การ เปลี่ยนแปลงปริมาตร เปอร์เซนต์การเสีสภาพ และเปอร์เซนต์ปริมาณของ แข็งคงเหลือ	62
4.5 การศึกษาสมบัติความว่องไวทางชีวภาพของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตใน การเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค FTIR, XRD และ SEM-EDS..	66
4.6 การทดสอบแรงกดอัด	78
4.7 พฤติกรรมการปลดปล่อยยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์.....	83
4.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay	84
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	85
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	85
5.2 ข้อเสนอแนะ	86
เอกสารอ้างอิง	87
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก.....	99
ภาคผนวก ข.....	101
ภาคผนวก ค	112
ภาคผนวก ง	119

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก จ.....	122
ภาคผนวก ฉ.....	125
ภาคผนวก ช.....	126
ประวัติผู้เขียน.....	127

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เทคโนโลยีที่ใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์.....	14
2.2 ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจล	27
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย SBF.....	47
3.2 สูตรการเชื่อมโยงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์.....	49
4.1 เพอร์เซ็นต์ของธาตุแคลเซียม และซิลิกอนในโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ	59
4.2 ผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์.....	84
ก-1 เพอร์เซ็นต์ของธาตุในสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์.....	99
ก-2 ผลของการวัดขนาดอนุภาคแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering	99
ข-1 ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์หลังเชื่อมโยงในแต่ละสูตร	101
ข-2 ปริมาตรที่เปลี่ยนแปลงหลังทำการเชื่อมโยงของโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละสูตร	101
ข-3 เพอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละสูตร.....	102
ค-1 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์และโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ จากเทคนิค FTIR	113
ง-1 ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ	119
ง-2 เพอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ.....	119
ง-3 เพอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือ ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ.....	120
ง-4 เพอร์เซ็นต์การเสียดสภาพในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ	120
จ-1 ค่ามอดุลัสกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120.....	122
จ-2 ค่าความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120.....	122
จ-3 เพอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120	123
จ-4 ค่ามอดุลัสกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120	123
จ-5 ค่าความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120.....	123
จ-6 เพอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120	124
ฉ-1 เพอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาไดโคลฟีแนคของโครงเลี้ยงเซลล์	125
ช-1 ผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์	126

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกระดูก.....	4
2.2 โครงสร้างของไฮดรอกซีอะพาไทต์	10
2.3 โครงสร้างของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต.....	11
2.4 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของน้ำกับสายโซ่พอลิเมอร์.....	15
2.5 การสังเคราะห์ไฮโดรเจลโดย Irradiation crosslinking	17
2.6 การสร้างโครงข่ายไฮโดรเจลจากการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจนใน CMC ที่ pH ต่ำ.....	19
2.7 (ก) การเกิดไฮโดรเจลโดยใช้สารเชื่อมโยงไอออนิก และ (ข) อันตรกิริยาระหว่างหมู่ COO ⁻ ของ Polymannuronate และ Ca ²⁺	19
2.8 สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Anionic polymer กับ Cationic polymer.....	19
2.9 (ก) การสังเคราะห์พอลิไอออนิกไฮโดรเจลของ Xanthan/Chitosan และ (ข) การเกิดไฮโดรเจลโดยใช้พอลิอิเล็กโทรไลต์ที่มีประจุตรงข้ามกัน.....	20
2.10 การเกิด Chelation ในสารประกอบเชิงซ้อนของ Copper-poly(4-vinyl pyridine).....	21
2.11 การเกิดเจลของ Kappa-carrageenan (การรวมตัวเป็นเกลียวขณะที่สารละลายร้อนเย็นตัวลงของ Kappa-carrageenan).....	22
2.12 Freeze-thawing ของไฮโดรเจลจาก Poly(vinyl alcohol) และ HAp	22
2.13 ตัวอย่างแบบจำลองของ Semi-IPNs และ IPNs	23
2.14 การขยายตัวของสายโซ่พอลิเมอร์ในขณะที่ไฮโดรเจลเกิดการบวมตัว	24
2.15 โครงสร้างโมเลกุลของโครงข่ายไฮโดรเจลกับโมเลกุลของน้ำ	26
2.16 โครงสร้างของอัลจินเตชนิดต่าง ๆ	28
2.17 การเกิดเจลของอัลจินเตด้วย Multivalent cations ทำให้เกิดเป็นโครงข่ายของเจลที่มีลักษณะคล้ายกล่องไข่	29
2.18 การเกิดเจลของอัลจินเตโดยใช้แคลเซียมไอออน	31
2.19 ขั้นตอนการสกัดโซเดียมอัลจินเตจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล	31
2.20 โครงสร้างแต่ละประเภทของคาร์ราจีแนน.....	32
2.21 การเกิดเจลของ Kappa-carrageenan เมื่อใช้ K ⁺ เป็นตัวเชื่อมโยง.....	33
2.22 การเกิดเจลของคาร์ราจีแนน	34
2.23 การเกิดเจลของคาร์ราจีแนนชนิด Kappa และ Iota เมื่อทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออน (ก) การเกิดเจลของคาร์ราจีแนนชนิด Kappa เมื่อทำปฏิกิริยากับ K ⁺ (ข) การเกิดอิลาสติกเจลของคาร์ราจีแนนชนิด Iota เมื่อทำปฏิกิริยากับ Ca ²⁺	35
2.24 วิธีทางกายภาพ (ก) และเคมี (ข) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอันตรกิริยาระหว่างยาที่บรรจุกับเจลพอลิเมอร์เพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยา	36
2.25 โครงสร้างของไดโคลฟีแนค.....	39
3.1 ตะแกรงร่อนคัดขนาด	45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.2 หม้อบดสาร	45
3.3 แม่พิมพ์ซิลิโคน	46
3.4 โครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงกระบอก.....	53
4.1 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์.....	57
4.2 ตัวอย่างลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ (ก) ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ (ข) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ และ (ค) ภาคตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์	58
4.3 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ.....	60
4.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC, SC-0.5-60, SC-1.0-60 และ SC-1.5-60...	61
4.5 โครงสร้างของ (ก) อัลจิเนต (ข) คาร์ราจีแนน และ (ค) อัลจิเนตและคาร์ราจีแนนเมื่อถูกเชื่อมโยงด้วย $CaCl_2$	62
4.6 เพอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลาย SBF หลังแช่เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน	63
4.7 เพอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตรที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลาย SBF หลังแช่เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน.....	65
4.8 (ก) เพอร์เซ็นต์การเสียน้ำหนัก และ (ข) เพอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือเมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลาย SBF	65
4.9 อินฟราเรดสเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120, SC-0.5-30, SC-0.5-60, SC-1.0-60, SC-1.5-60 และ SC-1.5-120 โดย (ก) โครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ และ (ข) โครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน.....	66
4.10 รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์	67
4.11 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF (ก) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 5000X), (ข) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 2500X) และหลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ค) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 2500X.....	69
4.12 ตัวอย่างภาพพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF จากเทคนิค SEM-EDS (ก) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 5000X), (ข) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 2500X) และ (ค) ภาคตัดขวางโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 2500X) ด้วยเทคนิค SEM	69
4.13 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X	70
4.14 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X	70

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.15 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X.....	71
4.16 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X.....	71
4.17 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF จากเทคนิค SEM-EDS ที่กำลังขยาย 500X	72
4.18 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัส จากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X	72
4.19 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF จากเทคนิค SEM-EDS ที่กำลังขยาย 500X	73
4.20 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X.....	73
4.21 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X.....	74
4.22 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X.....	74
4.23 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X.....	75
4.24 แผนภาพจำลองการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ของสารประกอบแคลเซียม-ซิลิเกต (หมายเหตุ : ชนิดไอออนในสารละลาย SBF มีมากกว่าที่แสดงในแผนภาพจำลอง).	76
4.25 แผนภาพจำลองการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ของคาร์ราจีแนน	77
4.26 ค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 ในสภาวะแห้ง	78
4.27 โครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 จากการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะแห้ง (ก) ภาพก่อนการทดสอบ (ข) ภาพระหว่างการทดสอบ และ (ค) ภาพหลังการทดสอบ.....	79
4.28 การเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์หลังทำการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120	80
4.29 ค่ามอดุลัสกดอัด (ก) และความแข็งแรงกดอัด (ข) ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 ในสภาวะเปียก.....	81

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.30 การเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์หลังทำการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร (ก) SC-1.5-120 และ (ข) S-1.5-120 ที่ 5 นาที และหลังแช่ในสารละลาย SBF ประมาณ 2-4 ชั่วโมง.....	81
4.31 โครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 จากการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะเปียก (ก) ภาพโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการทดสอบ (ข) ภาพโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างทำการทดสอบ และ (ค) ภาพโครงเลี้ยงเซลล์หลังทำการทดสอบ.....	82
4.32 กราฟมาตรฐานของยาไดโคลฟีแนคในสารละลาย SBF.....	83
4.33 เเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาไดโคลฟีแนคในสารละลาย SBF.....	84
ก-1 สัณฐานวิทยาของอนุภาคแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์ (ก) ขนาดอนุภาคของแคลเซียมซิลิเกต (ข) จากการตรวจวัดด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 600 เท่า	100
ข-1 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-30 ที่กำลังขยาย 150X.....	102
ข-2 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60 ที่กำลังขยาย 150X.....	103
ข-3 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-120 ที่กำลังขยาย 150X.....	103
ข-4 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-30 ที่กำลังขยาย 150X.....	103
ข-5 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 ที่กำลังขยาย 150X.....	104
ข-6 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-120 ที่กำลังขยาย 150X.....	104
ข-7 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-30 ที่กำลังขยาย 150X.....	104
ข-8 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 ที่กำลังขยาย 150X.....	105
ข-9 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 ที่กำลังขยาย 150X.....	105
ข-10 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60/1.5-60 ที่กำลังขยาย 150X.....	105
ข-11 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-120 (Diclofenac) ที่กำลังขยาย 150X.....	106
ข-12 ภาพตัดขวางบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC (ก) แสดงธาตุ Si และ (ข) แสดงธาตุ Ca	106
ข-13 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-30 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	107
ข-14 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	107
ข-15 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-120 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	108
ข-16 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-30 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	108
ข-17 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	109
ข-18 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-120 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	109

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข-19 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-30 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	110
ข-20 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ...	110
ข-21 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60/1.5-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ	111
ค-1 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์และโครงเลี้ยงเซลล์.....	112
ง-1 โครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่และหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (โครงเลี้ยงเซลล์เชื่อมโยงด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1.5, 1, 0.5 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที (โครงเลี้ยงเซลล์คนละชิ้น)).....	121
ง-2 โครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่และหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (โครงเลี้ยงเซลล์เชื่อมโยงด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 เป็นเวลา 30, 60, 120 นาที (โครงเลี้ยงเซลล์คนละชิ้น))	121
จ-1 พฤติกรรมของความเค้น (Stress) กับความเครียด (Strain) ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 ในแต่ละครั้งของการทดสอบแรงกดอัด.....	124

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
S	โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold)
C	สารประกอบแคลเซียมซิลิเกต (Calcium silicate)
HAp	สารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite)
SBF	สารละลายจำลองของเหลวในร่างกาย (Simulated body fluid)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระดูกเมื่อเกิดความเสียหายอันเนื่องมาจากอุบัติเหตุหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกสามารถรักษาได้โดยการปลูกกระดูกที่ได้จากตัวผู้ป่วยเองหรือจากบุคคลอื่น แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจทำให้ผู้ป่วยเกิดการบาดเจ็บ เพิ่มโอกาสในการติดเชื้อ ใช้เวลาในการฟื้นตัวนาน และที่สำคัญคือในกรณีที่ต้องใช้กระดูกปลูกจำนวนมากหรือมีชิ้นงานขนาดใหญ่ วิธีการดังกล่าวอาจไม่เหมาะสม [1] จากปัญหาและข้อจำกัดต่าง ๆ เหล่านี้ จึงนำไปสู่การพัฒนาวัสดุทดแทนและการกระตุ้นการซ่อมแซมกระดูกส่วนที่เกิดการเสียหาย โดยใช้หลักการวิศวกรรมเนื้อเยื่อผ่านการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์หรือโครงค้ำยัน (Scaffolds) ซึ่งเป็นโครงที่มีลักษณะเป็นรูพรุนเหมาะสำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์ และของเหลวในร่างกาย โดยโครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ สามารถใส่เข้าไปในร่างกายโดยไม่เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงมีความแข็งแรงและคงทนต่อแรงที่ได้รับ โดยไม่เกิดรอยร้าวหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง รวมถึงสามารถย่อยสลายได้ภายในระยะเวลาที่กำหนด ซึ่งวัสดุที่นำมาทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ พอลิเมอร์ (Polymers) จากธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์ เซรามิก (Ceramics) โลหะ (Metals) และคอมโพสิต (Composites)

พอลิเมอร์จากธรรมชาติเป็นวัสดุที่น่าสนใจ เนื่องจากมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ ไม่เป็นพิษ ขึ้นรูปได้ง่าย และพบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ ตัวอย่างของพอลิเมอร์จากธรรมชาติ เช่น เจลาติน คอลลาเจน ไคโตซาน คาร์ราจีแนน และอัลจินेट เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาตินั้นมีข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องจากมีสมบัติเชิงกลไม่เพียงพอ เช่น มีความทนแรงอัด และความทนแรงดึงต่ำ จึงมักมีการนำพอลิเมอร์มาผสมกับสารประกอบกลุ่มเซรามิกที่มีองค์ประกอบของแคลเซียม เช่น แคลเซียมฟอสเฟต แคลเซียมซิลเฟต ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และแก้วไบโอแอกทีฟ เพื่อเตรียมเป็นวัสดุคอมโพสิต โดยสารประกอบกลุ่มเซรามิกบางกลุ่มสามารถเหนียวนาให้เกิดการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ ข้อดีของวัสดุกลุ่มเซรามิกคือ มีความทนแรงอัดสูง มีความต้านทานต่อการเสีรูปลง แต่มีข้อด้อยคือ มีความเปราะ และสภาพดัดยัดต่ำ [2-4] ดังนั้น การผสมพอลิเมอร์กับสารประกอบเซรามิกเป็นการลดข้อด้อยของวัสดุทั้งสองชนิด นั่นคือเพิ่มความแข็งแรง และสามารถลดความเปราะโดยรวมของวัสดุได้ มีงานวิจัยมากมายที่เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบวัสดุคอมโพสิต เช่น โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เจลาติน และแก้วไบโอแอกทีฟ [4] โครงเลี้ยงเซลล์จากไฮดรอกซีอะพาไทต์ คอลลาเจน ไคโตซาน และท่อนาโนคาร์บอน [5] และโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซาน และนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ [6] เป็นต้น

อัลจินेट (Alginate) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ สามารถสกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ส่วนใหญ่อยู่ในรูปเกลือโซเดียมของกรดอัลจินิก สามารถละลายน้ำแล้วเกิดเป็นเจลได้ง่ายเมื่อนำไปเชื่อมโยงกับสารที่เป็นประจุบวก เช่น Ca^{2+} , Zn^{2+} และ Ba^{2+} เป็นต้น [1, 7] นอกจากนี้อัลจินेटยังมีข้อดีคือ หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายได้ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงหรือใช้ในร่างกายมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย และสามารถขึ้นรูปได้ตามต้องการ [8]

จึงนิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [1, 9] การปลดปล่อยยา [10] อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น

คาร์ราจีแนน (Carrageenan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์เชิงเส้นที่มีหมู่ซัลโฟเนตซึ่งเป็นประจุลบ สามารถสกัดได้จากสาหร่ายสีแดง โดยทั่วไปมักอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม ซึ่งคาร์ราจีแนนอาจแบ่งกลุ่มย่อยได้เป็น Kappa Iota และ Lambda โดยคาร์ราจีแนนมีสมบัติเด่นคือ เมื่อละลายน้ำแล้วให้เจลที่มีความหนืดสูง สามารถเกิดเจลได้ที่อุณหภูมิห้อง สามารถย่อยสลายได้ และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ [11, 12] โดยการใช้งานของคาร์ราจีแนนมักใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร การปลดปล่อยยา [13] วิศวกรรมเนื้อเยื่อ [14-16] เป็นต้น สำหรับงานทางด้านวิศวกรรมกระดูก พบว่าคาร์ราจีแนนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ [14, 15, 17, 18]

สารประกอบแคลเซียมซิลิเกต (Calcium silicate, CS) เป็นสารประกอบกลุ่มเซรามิกและจัดเป็นไบโอแอคทีฟประเภทซิลิเกต (Silicate bioactive) ซึ่งมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาที่พื้นผิวได้อย่างรวดเร็ว เมื่อนำไปใช้งานภายในร่างกายสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต สามารถก่อให้เกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ และทำให้เกิดการเชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อกระดูก [19, 20] โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้เร็วกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ เมื่อเปรียบเทียบในระยะเวลาที่เท่ากัน [21, 22]

นอกจากนี้ในปัจจุบันการประยุกต์ใช้ระบบนำส่งสารออกฤทธิ์ เช่น ยา ไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเพื่อการรักษาเฉพาะที่นั้นได้รับความสนใจและพัฒนาเพิ่มมากขึ้น โดยมีจุดประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาในบริเวณเป้าหมายโดยไม่กระทบหรือก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่น ๆ โดยสำหรับงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ตัวยาที่น่าสนใจคือ ไคโคลฟิแนค ซึ่งเป็นตัวยาสำหรับใช้ลดอาการปวด บวม และการอักเสบหลังการผ่าตัด รวมถึงเป็นตัวยาที่จัดอยู่ในยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ แต่มีข้อเสียคือ สามารถทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารหรือมีเลือดออกในทางเดินอาหารได้ ดังนั้นการใส่ยาไว้ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เฉพาะบริเวณกระดูกที่เกิดการบาดเจ็บ หรือบกร่อง หลังการผ่าตัดย่อมดีกว่าการรับประทานยาแบบดั้งเดิม โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาการปลดปล่อยยาไคโคลฟิแนคจากโครงเลี้ยงเซลล์ เช่น การศึกษาการปลดปล่อยยาไคโคลฟิแนคจากโครงเลี้ยงเซลล์ Poly(D,L-Lactic Acid-co-Glycolic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) [23] เป็นต้น

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นอัลจินตและคาร์ราจีแนนเป็นวัสดุที่มีความสามารถในการเตรียมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ งานวิจัยนี้จึงทำการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบวัสดุคอมโพสิตที่เตรียมจากอัลจินตและคาร์ราจีแนน โดยผสมสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพฤติกรรมการปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ในเบื้องต้น โดยใช้ตัวยาไคโคลฟิแนคเป็นยาต้นแบบ เนื่องจากเป็นตัวยาที่แก้อาการอักเสบหลังการผ่าตัดเปลี่ยนกระดูกได้ โดยวัสดุคอมโพสิตถูกทำให้เป็นรูพรุนด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) และนำมาเชื่อมโยงกับสารละลายแคลเซียม-คลอไรด์เพื่อเพิ่มความคงทนและความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำมาทดสอบสมบัติทางกายภาพ เช่น ความหนาแน่น และเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (%Porosity) เป็นต้น ศึกษาพฤติกรรมการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ภายใต้สารละลายจำลองของเหลวในร่างกาย (Simulated body fluid, SBF) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction spectroscopy, XRD) และสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) แล้ววิเคราะห์ธาตุเชิงพลังงาน (Energy dispersive x-ray spectrometry: EDS) นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถในการเสียดังในสารละลาย SBF, ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity assay) และทดสอบสมบัติเชิงกล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจินต/คาร์ราจีแนน และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อเหนี่ยวนำการเกิดของเนื้อเยื่อกระดูก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจินต/คาร์ราจีแนน และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

- ศึกษาหาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมโยงโครงเลี้ยงเซลล์ ให้มีความต้านทานต่อสารละลาย SBF

2) ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ เปรอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ และการกระจายตัวของสารเชื่อมโยงแคลเซียมคลอไรด์ และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตด้วยเทคนิค SEM-EDS

3) ศึกษาสมบัติความว่องไวทางชีวภาพของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตในการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์

- โดยศึกษาผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นเมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) และ XRD รวมถึงศึกษาสัญญาณวิทยาที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วยเทคนิค SEM-EDS

4) ศึกษาเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ (%Water content) และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร (%Volume change) ที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน และเปอร์เซ็นต์การเสียดัง (%Degradation) และเปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือ (%Solid remain) ที่เวลา 28 วัน เมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5) ศึกษาสมบัติเชิงกลโดยทดสอบแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยเครื่องทดสอบวัสดุอนุกรมประสงค์ (Universal testing machine, UTM) ในโหมดการทดสอบแรงกดอัด (Compressive test)

6) ศึกษาพฤติกรรมกรรมการปลดปล่อยยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสารละลายจำลองของเหลวในร่างกายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ยาไดโคลฟีแนคเป็นยาต้นแบบ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry

7) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจินต/คาร์ราจีแนน และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

2) สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวัสดุจากพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถทดแทนกระดูกได้

3) สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาพฤติกรรมในการปลดปล่อยยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระดูก (Bone) [24-25]

กระดูกเป็นอวัยวะที่สำคัญคือเป็นโครงร่างของร่างกาย โดยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างที่เกาะของกล้ามเนื้อและเอ็น ทำให้ร่างกายสามารถเคลื่อนไหวไปได้ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ป้องกันอวัยวะส่วนอื่นที่มีความสำคัญ เช่น สมองและไขสันหลัง (Spinal cord) ซึ่งถูกปกป้องโดยกะโหลกศีรษะ และกระดูกสันหลังตามลำดับ

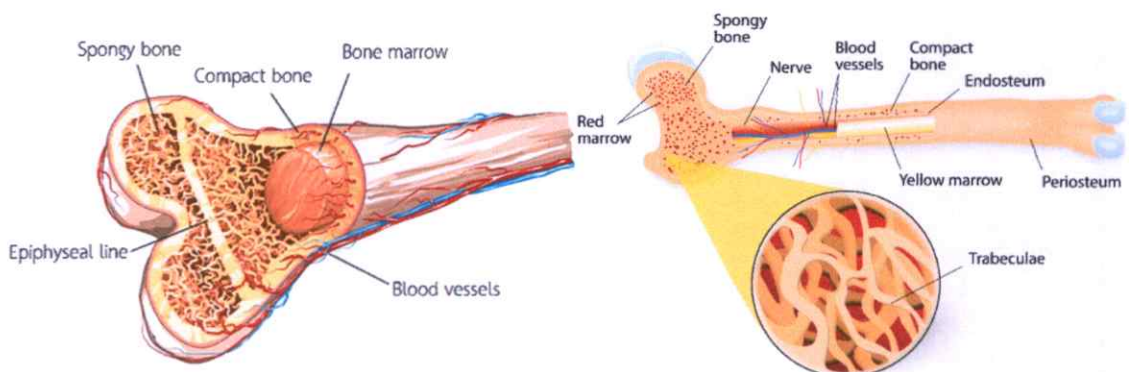
2.1.1 โครงสร้างของกระดูก (Bone structure)

กระดูกของมนุษย์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. กระดูกอ่อน (Cartilage bone) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte) สารระหว่างเซลล์ และเส้นใยชนิดต่าง ๆ โดยทั่วไปกระดูกอ่อนได้รับอาหารโดยการแทรกซึมผ่านสารระหว่างเซลล์ เนื่องจากกระดูกอ่อนไม่มีหลอดเลือดฝอยมาหล่อเลี้ยง

2. กระดูกโครงสร้างที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหรือกระดูกอ่อน ประกอบด้วยเซลล์กระดูก (Osteocyte) เส้นใยชนิดต่าง ๆ และสารระหว่างเซลล์ ซึ่งมีลิกไฮดรอกซีอะพาไทต์มาเสริมทำให้กระดูกมีความแข็งแรงมากกว่ากระดูกอ่อน

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาโครงสร้างภายในของกระดูกพบว่ากระดูกประกอบด้วยกระดูกเปลือกนอก (Cortex) หรือกระดูกแน่นทึบ (Compact bone) ซึ่งอาหารไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปเลี้ยงเซลล์กระดูกได้ บริเวณนี้จึงมีหลอดเลือดแทรกเข้าไปทางช่องที่เรียกว่า Haversian canal โดยจะทอดไปตามความยาวของกระดูก กระดูกเปลือกนอกมีปริมาณสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาแน่น ความแข็งแรงและความคงทนสูงกว่ากระดูกร่างแห ส่วนบริเวณตรงกลางของกระดูกเป็นกระดูกร่างแห (Cancellous bone) หรือกระดูกเนื้อโปร่ง (Trabecular bone) ที่มีลักษณะโปร่งและเป็นโพรงคล้ายฟองน้ำ (Spongy bone) มีความยืดหยุ่นมากกว่ากระดูกเปลือกนอก โดยกระดูกร่างแหเป็นที่อยู่ของไขกระดูก (Bone marrow) ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวให้แก่ร่างกาย [26]



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกระดูก [27]

2.1.2 องค์ประกอบของกระดูก (Bone component) [24]

กระดูกประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ทางชีวภาพและสารอนินทรีย์ ส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ คอลลาเจน (เนื้อเยื่อกระดูกมีส่วนประกอบหลักเป็นคอลลาเจนประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์) โกลโคโปรตีนที่ไม่มีคอลลาเจน ฟอสโฟโปรตีน โปรตีโอไลปิด มิวโคพอลิแซคคาไรด์ และไขมัน เป็นต้น โดยสารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งจะกลายเป็นกระดูกที่มีลักษณะแข็งในเวลาต่อมา ส่วนองค์ประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์หรือเกลือแร่ นั้น ส่วนใหญ่เป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งมีผลึกขนาดใหญ่ไม่ละลายน้ำ โดยระยะแรกจะฝังตัวอยู่ในส่วนพื้นสารอินทรีย์ ต่อมาภายหลังจะแปรสภาพเป็นผลึกของแคลเซียมฟอสเฟต นอกจากนี้ในกระดูกยังมีธาตุและไอออนอื่น ๆ ด้วย เช่น คาร์บอน แมกนีเซียม โซเดียม แคลเซียม และฟลูออไรด์ เป็นต้น ซึ่งมีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของร่างกาย

2.1.3 การซ่อมแซมกระดูก

การซ่อมแซมกระดูกสามารถอธิบายพอสังเขปได้ดังนี้

1. เมื่อกระดูกหักจะมีเลือดไหลออกมาที่บริเวณของเนื้อเยื่อกระดูกที่ถูกทำลาย และใช้เวลาหลายชั่วโมงในกระบวนการแข็งตัวเพื่อหยุดการไหลของเลือด ซึ่งจะเกิดแถบของก้อนเลือด (Hematoma) ปิดตรงรอยหัก

2. จากนั้นเซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์กระดูกอ่อนเข้าสู่บริเวณที่กระดูกหักและมีการสร้างแคลลัส (Callus)

3. ออสติโอเจนิค เซลล์แบ่งตัวและพัฒนาอย่างรวดเร็ว และมีการสร้างทราเบคิวลา (Trabeculae) หรือแคลลัสที่เป็นกระดูก (Bony callus) ของกระดูกใหม่เพื่อประสานกระดูกที่หักเข้าด้วยกัน และมีการสร้างกระดูกอ่อนมาปกคลุมชั้นนอก (Outer collar) ของรอยหัก

4. กระดูกอ่อนถูกทดแทนด้วยกระดูกร่างแห ส่วนบริเวณรอยหักมีการซ่อมแซมโดยการสร้างกระดูกแน่นที่บวมและมีเซลล์สลายกระดูกมาช่วยสลายกระดูกส่วนเกินออกไปให้กระดูกมีรูปร่างคงเดิม

ประสิทธิภาพของการซ่อมแซมกระดูกขึ้นอยู่กับการมีเลือดมาเลี้ยงเซลล์อย่างเพียงพอ ประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดในการสร้างกระดูกใหม่ การมีวิตามินและแร่ธาตุเพียงพอ แม้ว่ากระดูกมีความสามารถในการสร้างเซลล์กระดูกใหม่ได้หรือสามารถงอกออกมาใหม่ได้ด้วยตัวเองในอัตราที่แน่นอนโดยไม่มีรอยแผลเป็นเกิดขึ้น แต่ในหลาย ๆ สภาวะ จำเป็นต้องใช้วัสดุปลูกถ่ายทดแทนกระดูก (Bone grafts) หรือวัสดุชีวทางการแพทย์เพื่อทดแทนกระดูกที่เกิดความบกพร่อง ตัวอย่างเช่น ถ้าเกิดความบกพร่องเล็กน้อย กระดูกสามารถงอกออกมาใหม่ได้ด้วยตัวเองภายในเวลา 2-3 สัปดาห์ และติดสนิทประมาณ 4-6 เดือน ดังนั้นจึงไม่ต้องทำการผ่าตัด ส่วนในกรณีที่มีความบกพร่องอย่างรุนแรงและมีการสูญเสียกระดูกส่วนใด ๆ ไปนั้น กระดูกจะไม่สามารถรักษาตัวเองได้ จึงจำเป็นต้องใช้วัสดุปลูกถ่ายทดแทนกระดูกหรือวัสดุชีวทางการแพทย์เพื่อซ่อมแซมการทำงาน โดยต้องไม่สร้างความเสียหายต่อเนื้อเยื่อโดยรอบ [28]

2.1.4 สมบัติเชิงกลของกระดูก [29]

สารอนินทรีย์ส่วนใหญ่ในกระดูกเป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งทำให้กระดูกมีความแข็งแรง ส่วนสารอินทรีย์นั้นมีความเหนียวสูง ค่ามอดูลัสต่ำ และมีสมบัติอื่น ๆ ที่เป็นลักษณะเฉพาะของพอลิเมอร์ โดยความเหนียวของกระดูกนั้นมาจากคอลลาเจนเนื่องจากกระดูกมีการเรียงตัวของคอลลาเจนที่มีรูปแบบเฉพาะ และโครงสร้างจุลภาคของไฟเบอร์ที่มีความสลับซับซ้อน กระดูกจึงจัดเป็นวัสดุผสมของ

เซรามิกและสารอินทรีย์ ซึ่งกระดูกมีลักษณะพิเศษคือมีน้ำหนักเบาแต่มีความแข็งแรงมากในการรับน้ำหนัก ซึ่งแม้ดูเหมือนว่ากระดูกเป็นส่วนของร่างกายที่ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง แต่จริง ๆ แล้วกระดูกแต่ละชิ้นมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอยู่ตลอดเวลา และการปรับรูป (Remodeling) ของกระดูกมีการดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เหมาะสมกับหน้าที่ในแต่ละส่วนของร่างกาย นอกจากนี้กระดูกยังถือเป็นแหล่งสะสมแคลเซียมที่สำคัญของร่างกาย และมีบทบาทอย่างมากในการช่วยสนับสนุนการควบคุมระดับแคลเซียมในเลือดให้อยู่ในระดับปกติ

2.2 วัสดุทดแทนกระดูก [25, 30]

กระดูกปลูกเป็นกระดูกที่ตัดออกมาจากอวัยวะส่วนอื่นของผู้ป่วย (Autograft bone) กระดูกที่ได้รับบริจาคจากผู้อื่น (Allograft bone) และกระดูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Xenograft bone) (เช่น กระดูกวัว) ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าสามารถใช้เพื่อแก้ปัญหาการเชื่อมติดของกระดูก (Bone union) หรือใช้เพื่อเติมลงในส่วนที่บกพร่องของกระดูกได้ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นมักเป็นในกรณีที่ต้องใช้กระดูกปลูกจำนวนมากหรือมีชิ้นขนาดใหญ่ โดยเฉพาะการซ่อมส่วนที่หายไปของกระดูก ทำให้ไม่สามารถหา Autograft ที่มีขนาดเหมาะสมมาใช้อย่างเพียงพอ ซึ่งการใช้ Allograft นั้นพอที่จะช่วยแก้ปัญหาเรื่องปริมาณและขนาดได้ แต่ยังมีปัญหาเกี่ยวกับปฏิกิริยาทางระบบภูมิคุ้มกันในผู้รับ ส่วน Xenograft bone นั้นอาจทำให้ผู้รับเสี่ยงต่อการติดเชื้อและเกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับ และปัญหาอีกหลายประการที่เกิดจากการใช้โลหะในร่างกายมนุษย์ ทำให้มีความพยายามในการแก้ปัญหาเหล่านี้ แนวทางหนึ่งคือศึกษาและพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกทั้งที่เป็นสารธรรมชาติ และสารสังเคราะห์ โดยพยายามให้มีโครงสร้างและสมบัติคล้ายกับกระดูกมากที่สุด

2.2.1 สมบัติของวัสดุทดแทนกระดูก [25, 31]

สารทดแทนกระดูกจำนวนมากที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันหรือกำลังมีการพัฒนาขึ้นมาใหม่ ล้วนแต่พยายามทำให้มีสมบัติที่ดี ดังนี้

1. ความสามารถที่เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของร่างกายซึ่งทำให้เนื้อเยื่อกระดูกสามารถเจริญเข้าไปภายในวัสดุทดแทนกระดูกจนเป็นเนื้อเดียวกันได้ โดยไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่เป็นผลให้มีการสร้างเนื้อเยื่อไฟเบอร์รอป ๆ วัสดุ

2. ความสามารถที่วัสดุค่อย ๆ สลายตัวโดยกลไกต่าง ๆ ภายในร่างกาย ซึ่งจะทำให้สารทดแทนกระดูกที่ใส่ค่อย ๆ ถูกกำจัดออกไปจากตำแหน่งที่ใส่หลังจากที่มีการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกเข้าไปแทนที่แล้ว จนในที่สุดเมื่อหมดหน้าที่แล้วสารทดแทนกระดูกที่ดีควรสามารถถูกร่างกายสลายและกำจัดออกไปจนหมด จุดสำคัญที่น่าสนใจคืออัตราการสลายตัวของสารทดแทนกระดูกต้องสอดคล้องกับอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกที่เข้าไปแทนที่ เพราะถ้าหากการสลายตัวเกิดขึ้นเร็วเกินไป จะทำให้บริเวณที่ใส่สารทดแทนกระดูกขาดความแข็งแรง และเกิดการแตกหรือหักได้เมื่อรับแรงกระทำ เนื่องจากการเจริญของกระดูกยังเข้าไปไม่มากพอที่จะทำหน้าที่แทน แต่ถ้าการสลายตัวเกิดขึ้นช้าหรือไม่มีการสลายตัว สารทดแทนกระดูกนั้นจะเป็นตัวขัดขวางการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกทำให้เนื้อเยื่อกระดูกไม่สามารถเจริญเข้าไปแทนที่ได้ ซึ่งมีผลต่อชีวกลศาสตร์ของกระดูกส่วนนั้นในระยะยาว

3. วัสดุทดแทนกระดูกต้องมีความแข็งแรง เนื่องจากวัสดุทดแทนกระดูกส่วนใหญ่ถูกพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาส่วนของกระดูกที่บกพร่องไป การใช้วัสดุทดแทนกระดูกต่างชนิดกันจึงต้องพิจารณาถึง

ความแข็งแรงของวัสดุที่ใช้ด้วย โดยเฉพาะเมื่อใช้ชิ้นงานขนาดใหญ่หรือใช้กับกระดูกที่ต้องรับน้ำหนัก สารทดแทนกระดูกที่มีสมบัติอื่น ๆ ดี แต่มีความเปราะอาจไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ เมื่อเทียบกับ สารอื่นที่มีความแข็งแรงของโครงสร้างดีกว่า

4. วัสดุทดแทนกระดูกต้องมี Osteoinductive capabilities หมายถึง ความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อกระดูกโดยรอบตรงตำแหน่งที่รับ (Recipient site) มีการเจริญเข้าไปในวัสดุทดแทนกระดูกที่ใช้ โดยความสามารถนี้เป็นจุดสำคัญจุดหนึ่งที่เป็นที่ต้องการ และมีความพยายามในการพัฒนาให้วัสดุทดแทนกระดูกมีสมบัติข้อนี้ ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญที่ทำให้กระดูก Autograft ดีกว่ากระดูกปลูกชนิดอื่น ๆ และวัสดุทดแทนกระดูก ความพยายามที่จะทำให้วัสดุทดแทนกระดูกมีความสามารถในการเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อกระดูกยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร จึงเป็นเหตุผลที่ต้องมีการผสมส่วนประกอบอื่น ๆ เข้ากับวัสดุทดแทนกระดูก เพื่อให้มีความสามารถในการขึ้นเนื้อ เช่น การใช้ Bone morphogenetic protein (BMP) หรือแม้แต่การใช้ไขกระดูกหรือส่วนประกอบบางส่วนจากไขกระดูกหรือเลือดของผู้รับ เป็นต้น [32]

5. วัสดุที่ใช้ต้องมีความเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นโดยง่าย สมบัติข้อนี้ทำให้สามารถผสมสารอื่นที่จำเป็น เช่น ผสมยาปฏิชีวนะเข้ากับสารทดแทนกระดูก โดยไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน

6. ง่ายต่อการเตรียม สามารถทำรูปแบบหรือขนาดได้ตามต้องการ และสามารถเก็บไว้ใช้ได้ นาน เป็นสมบัติปลีกย่อยที่บางครั้งทำให้มีผลต่อการเลือกใช้วัสดุทดแทนกระดูกบางชนิด

2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (Bone tissue engineering) [33]

วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเป็นวิธีที่กำลังได้รับความสนใจอย่างยิ่งในการฟื้นฟูและซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เป็นงานที่อาศัยความรู้หลากหลายสาขา (Multidisciplinary field) โดยจุดมุ่งหมายคือ การสร้างเครื่องมือหรือวัสดุชีวภาพ (Biomaterials) เพื่อซ่อมแซมหรือเปลี่ยนถ่ายอวัยวะที่ไม่สามารถทำงานได้ หลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อคือ การซ่อมแซม แทนที่ และการเกิดใหม่ (Regeneration) ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะจำเพาะที่สูญเสียไป โดยวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นความพยายามใด ๆ ที่จะสร้างหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อจำเพาะในตำแหน่งที่จำเพาะ โดยอาศัยการคัดเลือกและจัดการที่เหมาะสมกับเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ และโมเลกุลให้สัญญาณ ดังนั้นหลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนด้วยกัน คือ เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ และโมเลกุลให้สัญญาณ โดยการนำไปใช้งานสามารถเลือกใช้เพียงองค์ประกอบเดียวหรือมากกว่าก็ได้ ปัจจุบันมีการใช้หลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อในการพัฒนาให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน กระดูก และกระดูกตา เป็นต้น ซึ่งอาศัยหลักการเดียวกันของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ แต่จะแตกต่างกันที่การจัดการและการคัดเลือกองค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อันได้แก่ เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ และโมเลกุลให้สัญญาณให้เหมาะสมเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้อเยื่อที่ต้องการ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจินเนต/คาร์ราจีแนน และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต จึงขอกล่าวเฉพาะหัวข้อโครงเลี้ยงเซลล์

2.3.1 โครงเลี้ยงเซลล์หรือโครงค้ำยัน [25]

ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ส่วนมากผลิตมาจากวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและสามารถขึ้นรูปเป็นโครงสร้างสามมิติ ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอวัยวะที่จะนำไปใช้ทดแทนได้

2.3.1.1 หน้าที่ของโครงเลี้ยงเซลล์ [33]

1. ตัวรองรับทางกายภาพ (Physical support) ในตำแหน่งที่เกิดการสมานแผล (Healing site) เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อข้างเคียงยุบ (Collapse) เข้ามาในตำแหน่งที่มีบาดแผล (Wound site)

2. สิ่งกีดขวาง (Barrier) เพื่อจำกัดหรือยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cellular migration) ในลักษณะที่มีการคัดเลือกเซลล์ไว้แล้ว ซึ่งเป็นหลักการที่นำไปใช้ในการเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อคืนสภาพหรือจีทีอาร์ (Guided tissue regeneration, GTR) และการเหนี่ยวนำให้กระดูกคืนสภาพหรือ จีบีอาร์ (Guided bone regeneration, GBR)

3. โครงยึดชั่วคราว (Temporary matrices) หรือเมทริกซ์นอกเซลล์เทียม (Artificial extracellular matrix) โดยเป็นตัวรองรับเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณนั้นให้เกิดการยึดเกาะ (Attachment) เจริญเติบโตแปรสภาพและเกิดการพัฒนากลายเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ โครงค้ำยันหรือโครงเลี้ยงเซลล์อาจถูกปลูกฝัง (Implantation) เข้าไปเพียงอย่างเดียวเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณบาดแผลและเกิดเนื้อเยื่อใหม่ตามมา หรืออาจใช้โครงเลี้ยงเซลล์รองรับการเกาะของเซลล์ในห่อปฏิบัติการก่อนจะนำไปปลูกฝัง (Cell carrier) ซึ่งเซลล์จะเจริญเติบโตเป็นเนื้อเยื่อใหม่ทดแทนเนื้อเยื่อเดิม ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์จะทยอยสลายไป

4. ตัวปล่อยโมเลกุลให้สัญญาณตามเวลาที่กำหนด (Time-release mechanism for signaling molecules)

2.3.1.2 สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีควรมีสมบัติโดยสรุปดังนี้ [34-35]

1. โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกควรมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และไม่เป็นพิษ สามารถใส่เข้าไปในร่างกายโดยไม่เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันและต้องไม่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย

2. โครงเลี้ยงเซลล์ควรมีสมบัติเชิงกลเพียงพอที่จะรับความเค้นเชิงกล (Mechanical stress) ที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกที่ต้องรองรับแรง

3. เมื่อนำไปใส่ทดแทนเนื้อเยื่อหรือกระดูก ควรมีสมบัติเชิงกลที่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อหรือกระดูกนั้น

4. ในกรณีที่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์เป็นตัวรองรับเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณนั้นให้เกิดการพัฒนากลายเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ โครงเลี้ยงเซลล์ควรมีลักษณะเป็นรูพรุนประมาณ 150-500 ไมโครเมตร เพื่อเป็นที่อยู่ที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ที่จะเข้ามา และมีลักษณะที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ทั้งหมด (Fully interconnected geometry) คือมีโครงสร้างเป็นรูพรุนสามมิติ โดยรูพรุนสามารถเชื่อมต่อกันได้เพื่อความสะดวกในการเข้ามาของเลือด และช่วยในการแลกเปลี่ยนสารอาหาร และออกซิเจนเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตต่อได้

5. สมบัติพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ต้องเหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้ามายังบริเวณนั้น ๆ และต้องเหมาะสมกับการยึดเกาะและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์

6. โครงเลี้ยงเซลล์ควรย่อยสลายได้ในร่างกาย และสารที่สลายตัวต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย โดยต้องย่อยสลายในระยะเวลาที่เหมาะสมหรือมีอัตราการสลายตัวใกล้เคียงกับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ ซึ่งต้องนานเพียงพอที่จะให้เซลล์เป้าหมาย (Target cells) เกิดการสร้างและสะสมเมทริกซ์นอกเซลล์ได้มากเพียงพอ โดยถ้าโครงเลี้ยงเซลล์ย่อยสลายเร็วเกินไปจะทำให้เซลล์ไม่

สามารถสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์เพียงพอที่จะคงรูปร่างของเนื้อเยื่อบริเวณนั้นไว้ได้ แต่ถ้าโครงเลี้ยงเซลล์คงอยู่ตลอดไปจะขัดขวางการพัฒนาการของเนื้อเยื่อ ดังนั้นสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการหายของแผลและความสำเร็จที่จะตามมา และที่สำคัญเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์สลายแล้วต้องสามารถดูดซึมหรือขับถ่ายออกจากร่างกายได้

7. ต้นทุนต่ำ สามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ และขึ้นรูปได้ง่าย ไม่ซับซ้อนเหมาะกับการใช้งานทางแพทย์ นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ควรสามารถนำไปฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้งานได้โดยไม่เสียสภาพเดิมของวัสดุ

2.3.1.3 วัสดุชีวภาพ (Biomaterial) ที่ใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ [28, 33]

วัสดุชีวภาพที่นำมาผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มด้วยกันคือ พอลิเมอร์ (Polymers) เซรามิก (Ceramics) โลหะ (Metallics) และกลุ่มที่มีการผสมรวมกัน (Composites) [36]

1. กลุ่มพอลิเมอร์

กลุ่มพอลิเมอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ พอลิเมอร์จากวัสดุธรรมชาติ (Natural, Organic polymer) เช่น จากพืชหรือสัตว์ ซึ่งมีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ และเซลล์สามารถที่ยึดเกาะและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาติมีข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องจากมีสมบัติเชิงกลไม่เพียงพอ เช่น มีความแข็งแรงกดอัด (Compressive strength) และความแข็งแรงดึง (Tensile strength) ต่ำ ตัวอย่างของวัสดุกลุ่มนี้คือ คอลลาเจน (Collagen) ไคโตซาน (Chitosan) เจลาติน (Gelatin) และไฟบริน (Fibrin) เป็นต้น อีกกลุ่มหนึ่งคือ พอลิเมอร์หรือโคพอลิเมอร์สังเคราะห์ (Synthetic polymer/ Copolymer) เช่น พอลิแลคติกแอซิด (Poly(lactic acid), PLA) พอลิไกลโคลิกแอซิด (Poly(glycolic acid), PGA) พอลิแลคติกโคไกลโคลิกแอซิด (Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) พอลิคาโพรแลคโตน (Poly(ϵ -caprolactone), PCL) และพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (Polytetrafluoroethylene, PTFE) เป็นต้น โดยวัสดุพอลิเมอร์สังเคราะห์ต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกันในด้านลักษณะทางกายภาพ สมบัติเชิงกล เวลาที่ใช้ และวิธีการย่อยสลาย ซึ่งสามารถเลือกใช้ตามจุดมุ่งหมายของโครงเลี้ยงเซลล์นั้น ๆ ปัจจุบันมีรายงานการใช้วัสดุพอลิเมอร์ทั้งธรรมชาติและสังเคราะห์สำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

2. กลุ่มเซรามิก

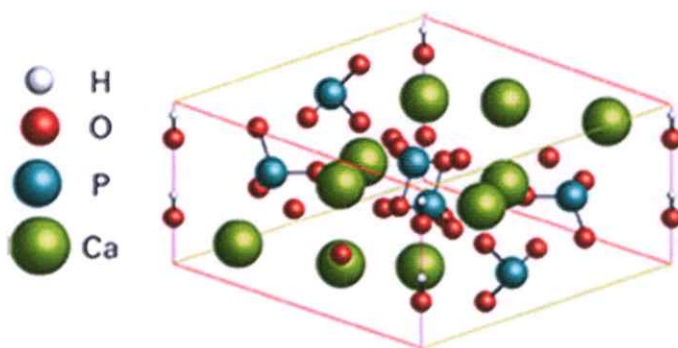
เซรามิกเป็นวัสดุที่ประกอบด้วยธาตุที่เป็นโลหะและอโลหะจับตัวด้วยพันธะไอออนิกและพันธะโควาเลนต์ ซึ่งการจับกันเช่นนี้ทำให้ไม่มีอิเล็กตรอนอิสระเหลืออยู่ เซรามิกจึงเป็นวัสดุที่นำไฟฟ้าและความร้อนได้ไม่ดี มีความโปร่งแสง มีความเสถียรสูงกว่าพอลิเมอร์ มีความทนแรงอัดสูง มีสภาพดึงยืด (Ductility) ต่ำ มีความต้านทานต่อการผิดรูป (Deformation resistance) สูง แต่เปราะ (Brittle) ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดความเสียหายได้เมื่อรับแรงที่มากเกินไป นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการสลายตัวของเซรามิกแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ซึ่งอาจเป็นอีกข้อจำกัดหนึ่งในการเลือกใช้วัสดุในกลุ่มนี้ โดยกลุ่มเซรามิกที่มีองค์ประกอบของแคลเซียม (Calcium-based ceramics) จะมีโครงสร้างเหมือนกับส่วนที่เป็นแร่ธาตุ (Mineral phase) ของกระดูก จากการศึกษพบว่าวัสดุกลุ่มเซรามิกสามารถกระตุ้นการตกตะกอนและการสร้างแคลเซียมฟอสเฟตได้ รวมถึงมีการรายงานการใช้วัสดุกลุ่มนี้สำหรับการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูก ตัวอย่างเซรามิกกลุ่มนี้ ได้แก่ แคลเซียมฟอสเฟต (เช่น

ไฮดรอกซีอะพาไทต์) แคลเซียมซัลเฟต (Calcium sulfates) และแก้วชีวกำมันต์หรือแก้วทางชีวภาพ (Bioactive glass) [25, 37]

Bioactive glass เป็นวัสดุที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาที่พื้นผิวได้อย่างรวดเร็ว โดยเป็นกลุ่มหนึ่งของวัสดุ Inorganic bioactive ซึ่งสามารถก่อให้เกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ เมื่อนำไปแช่ในสารละลาย SBF และของเหลวในร่างกาย โดยการเกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์นี้จะทำให้เกิดการเชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อได้ในอนาคต ตัวอย่าง Bioactive Glass เช่น แก้วไบโอแอคทีฟประเภทซิลิเกต (Silicate bioactive glass) แก้วไบโอแอคทีฟประเภทแก้วบอเรท (Borate Bioactive Glass) แก้วไบโอแอคทีฟประเภทแก้วฟอสเฟต (Phosphate Bioactive Glass) โดยมีการพบว่า ไอออนของของเหลวในร่างกายสามารถทำปฏิกิริยากับพื้นผิวของ Bioactive glass ได้ซึ่ง Bioactive glass สามารถเคลื่อนย้ายไอออนที่ละลายน้ำได้ เช่น ไอออนของซิลิกอน แคลเซียม ฟอสเฟส และ โซเดียมออกมาในระบบและทำให้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อตัวของกระดูกได้เร็วขึ้น [34, 38] ตัวอย่างกลุ่มเซรามิกที่นิยมใช้ ได้แก่

- ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite, HAP) [25, 39]

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ สูตรเคมีคือ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ เป็นแคลเซียมฟอสเฟต ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นเซรามิกที่ย่อยสลายได้ มีองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของกระดูก ไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถสังเคราะห์หรือสกัดมาจากกระดูกสัตว์ต่าง ๆ ได้ โดยเป็นสารเคมีที่มีการประยุกต์ใช้เป็นสารทดแทนกระดูกที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัย และมีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) กับร่างกาย ช่วยทำให้กระดูกใหม่เจริญได้เร็วขึ้น สามารถยึดติดกับกระดูกใหม่ได้โดยตรงโดยไม่ต้องอาศัยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นตัวกลาง โดยร่างกายจะสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมาสอดแทรกตามรูพรุนของวัสดุซึ่งช่วยในการเกิดกระดูกใหม่ที่มีความแข็งแรงใกล้เคียงกระดูกเดิม โดยทั่วไปแล้ววัสดุสังเคราะห์ไฮดรอกซีอะพาไทต์จะเป็นแบบไอโซทรอปิก (Isotropic) คือสมบัติไม่ขึ้นกับทิศทาง และส่วนใหญ่มีขนาดเกรน (Grain size) ที่ใหญ่กว่ากระดูกจริง และนอกจากนี้กระดูกจริงประกอบไปด้วยวัสดุผสมระหว่างสารอินทรีย์คอลลาเจน (Organic collagen) และสารอนินทรีย์อะพาไทต์ชีวภาพ (Biological apatite) ดังนั้นโครงสร้างของวัสดุสังเคราะห์ของไฮดรอกซีอะพาไทต์จึงต้องเข้ากันได้ดีกับองค์ประกอบของกระดูกจริงและต้องมีสมบัติเชิงกลที่ดีถึงจะสามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของวัสดุทดแทนกระดูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [25]

- สมบัติทางกายภาพ

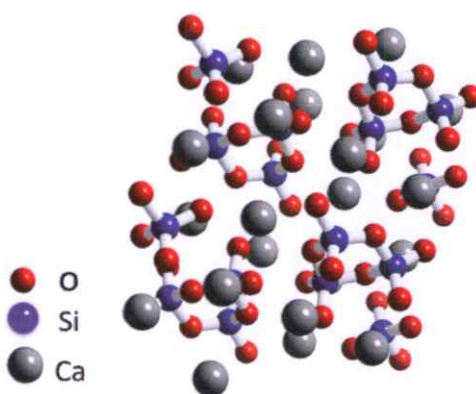
- ความหนาแน่นต่ำ
- มีเสถียรภาพทางเคมีสูง ไม่เป็นพิษ
- ต้านทานต่อการขีดสีสูง
- มีความเปราะ (Brittleness)

- การประยุกต์ใช้งานไฮดรอกซีอะพาไทต์

- อุตสาหกรรมการแพทย์นิยมนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารทดแทนกระดูก ใช้ในฟัน (เช่น รากฟันเทียม) ใช้ในระบบนำส่งยา (Drug delivery)

- แคลเซียมซิลิเกต [25, 38, 40-42]

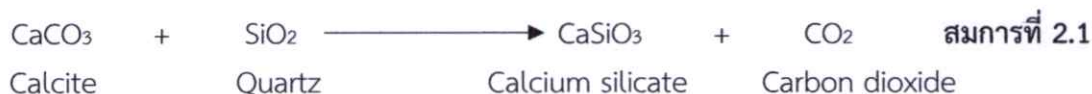
แคลเซียมซิลิเกต (CaSiO_3) หรือวอลลาสโทไนต์ (Wollastonite) เป็นสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตชนิดหนึ่งที่เป็นไบโอเซรามิกหรือไบโอแอคทีฟประเภทซิลิเกต ซึ่งเป็นสารที่มีความว่องไวทางชีวภาพ (Bioactivity) และมีความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์เนื้อเยื่อในร่างกาย ซึ่งพบว่าสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตมีความสามารถในการสร้างชั้นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้อย่างรวดเร็วหลังจากแช่ในสารละลาย SBF ซึ่งเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของไอออนอนินทรีย์คล้ายพลาสมาในเลือดมนุษย์ (Human blood plasma) นอกจากนี้ไอออนของแคลเซียมซิลิเกตยังสามารถส่งเสริมกระบวนการแบ่งเซลล์ของกระดูก โดยแปรสภาพจากการแสดงออกของยีนเซลล์ต้นกำเนิดไปยังเซลล์สร้างกระดูกได้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต [39]

แคลเซียมซิลิเกตสามารถยึดกับเนื้อเยื่อกระดูกที่มีชีวิตโดยผ่านชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สร้างขึ้นเมื่อสัมผัสกับสารละลาย SBF โดยแคลเซียมและซิลิเกตซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของแคลเซียมซิลิเกตจะเกิดการละลายเมื่อแช่ในสารละลาย SBF และก่อให้เกิดชั้นของซิลิกา (Silica-rich interlayer) บนผิวของแคลเซียมซิลิเกต จากนั้นจะสร้างชั้นของแคลเซียมฟอสเฟตที่มีรูปร่างอสัณฐาน (Amorphous calcium phosphate) และก่อตัวเป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งเกิดจากการก่อตัวของ Ca^{2+} , PO_4^{3-} และ OH^- จากสารละลาย SBF โดยแคลเซียมซิลิเกตมีทั้งหมด 3 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคอสัณฐาน (Amorphous- CaSiO_3) วัฏภาคที่อุณหภูมิต่ำ ($\beta\text{-CaSiO}_3$) ซึ่งมีลักษณะพื้นผิวขรุขระและมีรูพรุน และวัฏภาคที่อุณหภูมิสูง ($\alpha\text{-CaSiO}_3$) มีลักษณะพื้นผิวเรียบ

และมีความแข็งแรง โดยแคลเซียมซิลิเกตสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแคลไซต์ (Calcite; CaCO_3) กับซิลิกา (Silica; SiO_2) ดังสมการที่ 2.1 โดยอาศัยความร้อนในการเกิดปฏิกิริยา



แต่ในงานวิจัยนี้สารประกอบแคลเซียมซิลิเกตถูกเตรียมจากแคลเซียมไนเตรต (Calcium nitrate tetrahydrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) และเตตระเอทิลออร์โธซิลิเกต (Tetraethyl orthosilicate, $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}/\text{TEOS}$) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) เป็นสารที่ทำให้เกิดการตกตะกอนร่วมทางเคมี (Co-chemical precipitation) [21, 22]

● ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อผิวของแก้วไบโอแอกทีฟสัมผัสกับของเหลวในร่างกาย

ขั้นที่ 1 เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่าง Na^+ , Ca^{2+} ที่ผิวของแก้วกับ H^+ หรือ H_3O^+ ในสารละลายทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสของกลุ่มซิลิกาและเกิดเป็นกลุ่มของ Silanol (Si-OH) บนผิวแก้วขึ้น ดังสมการที่ 2.2



ดังนั้นค่า pH ของสารละลายจะสูงขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาของ H^+

ขั้นที่ 2 ค่า pH ของสารเพิ่มขึ้น (ความเข้มข้น OH^- เพิ่มขึ้น) ทำให้เกิดการละลายของซิลิกากลายเป็น Silicic acid ($\text{Si}(\text{OH})_4$) และเกิด Si-OH groups บนผิวแก้ว ดังสมการที่ 2.3



ขั้นที่ 3 เกิดการควบแน่น (Condensation) และต่อกันเป็นสายยาว (Polymerization) ของชั้นซิลิกา (Amorphous SiO_2 -rich layer) ที่มีความหนาประมาณ 1-2 ไมครอนบนผิวของแก้ว

ขั้นที่ 4 เกิดการละลายต่อไปและเกิดการเคลื่อนย้ายไอออน Ca^{2+} และ PO_4^{3-} ทำให้เกิดชั้นของแคลเซียมฟอสเฟต (Amorphous Calcium Phosphate (ACP) layer) บนชั้นของซิลิกา

ขั้นที่ 5 เกิดการละลายต่อไปเรื่อย ๆ โดยชั้น ACP จะรวมกับ OH^- และ CO_3^{2-} ในสารละลายทำให้เกิดชั้นของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HAp)

ดังนั้นเมื่อเกิดชั้นของ HAp แล้วจะทำให้เกิดการเชื่อมต่อของกระดูก โดยเกิดการเกาะ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเกิดการยึดเกาะของเนื้อเยื่อกระดูกในเวลาต่อมา และในขณะเดียวกันก็เกิดการสลายตัวของแก้วไบโอแอกทีฟด้วย

- สมบัติทางกายภาพ

- ผลิตเป็นสีขาว
- โครงสร้างผลึกเป็นไตรคลินิก (Triclinic)
- มีความถ่วงจำเพาะในช่วง 2.8-2.9
- มีค่าความแข็งอยู่ที่ 5-5.4 ในหน่วยโมห์ (Moh's scale)
- มีค่าสัมประสิทธิ์การขยายตัวทางความร้อนต่ำ
- วอลลอสโทไนต์บริสุทธิ์มีจุดหลอมเหลวประมาณ 1,540 องศาเซลเซียส

- สมบัติทางเคมี

- มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ
- เมื่อนำแคลเซียมซิลิเกตไปละลายน้ำให้อยู่ในรูปแขวนลอยจะมีค่า pH อยู่

ในช่วง 8-10

- องค์ประกอบของแคลเซียมซิลิเกตเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ

- การประยุกต์ใช้งานแคลเซียมซิลิเกต

- อุตสาหกรรมการแพทย์ มีการนำแคลเซียมซิลิเกตมาพัฒนาเป็นวัสดุชีวภาพ และอวัยวะเทียมเพื่อทดแทนกระดูกในร่างกายมนุษย์ เนื่องจากสามารถเหนียวน้ำให้เกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เมื่อแช่ในสารละลาย SBF ได้เร็วกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ เมื่อเปรียบเทียบในระยะเวลาที่เท่ากัน [21,22]

โดยในงานวิจัยนี้ใช้แคลเซียมซิลิเกตซึ่งเป็นไบโอแอคทีฟเซรามิกชนิดหนึ่งที่สามารถเหนียวน้ำให้เกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้เร็ว

3. โลหะ

โลหะเป็นกลุ่มวัสดุชีวภาพที่มีรายงานว่าใช้ในคลินิก เช่น ไทเทเนียม โลหะผสมโคบอลต์-โครเมียม (Co-Cr alloys) เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steels) และทอง โดยโลหะที่นิยมใช้คือ ไทเทเนียม ซึ่งมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ มีความต้านทานต่อการกัดกร่อน (Corrosion resistance) สูง แข็งแรง และไม่ย่อยสลาย นอกจากนี้ยังมีค่ามอดูลัสความยืดหยุ่น (Elastic modulus) ใกล้เคียงกับ Trabecular bone จึงนิยมนำมาใช้ในกรณีที่มีรอยวิการกระดูกขนาดใหญ่ โดยมากมักเตรียมในรูปของแผ่นไทเทเนียมหรือกรงตาข่ายไทเทเนียม (Titanium mesh cage) ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์แบบสามมิติ (Three-dimensional computed-tomography, 3D-CT) และใช้เทคนิคคอมพิวเตอร์ช่วยออกแบบ (Computer-aided design (CAD) technique) ในการสำรวจรอยวิการและออกแบบกรงตาข่ายไทเทเนียมให้พอดีกับรูปร่างและขนาดของรอยวิการที่ต้องการสร้างทดแทน ซึ่งเวลานำมาใช้ในการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูกมักใช้ไทเทเนียมร่วมกับวัสดุปลูกถ่ายชนิดต่าง ๆ เช่น กระดูกปลูกถ่ายของผู้ป่วย กระดูกปลูกถ่ายร่วมสายพันธุ์ กระดูกปลูกถ่ายต่างสายพันธุ์ และโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น ฟองน้ำคอลลาเจน อัลจินเนต และปีต้า-ทีซีพี [43] เป็นต้น

4. คอมโพสิต

เนื่องจากวัสดุในแต่ละกลุ่มมีทั้งข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป การผสมรวมกันของวัสดุต่างชนิดกันจะเป็นการลดข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้น้อยลง ขณะเดียวกันก็ยังคงรักษาข้อดีของวัสดุแต่ละชนิดไว้ เช่น การผสมรวมกันของพอลิเมอร์และเซรามิก โดยอาศัยสมบัติด้านความแข็งแรงและ

การมีองค์ประกอบเหมือนกับส่วนอนินทรีย์ของกระดูกของเซรามิก และอาศัยประโยชน์ของพอลิเมอร์ในด้านสมบัติเชิงกล เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย และโครงสร้างทางกายภาพที่แตกต่างกัน นอกจากการผสมเซรามิกเข้าไปในพอลิเมอร์จะเป็นการลดความเปราะโดยรวมของเซรามิกและเพิ่มความแข็งแรงให้กับพอลิเมอร์แล้ว เซรามิกยังลดความเป็นกรดที่เกิดจากการย่อยสลายของพอลิเมอร์ในกลุ่มเอสเทอร์อีกด้วย ตัวอย่างของวัสดุกลุ่มนี้ เช่น การผสมรวมกันของพอลิแลกไทด์โคพอลิไกล์โคไลด์ และแคลเซียม-ฟอสเฟต [44] การผสมรวมกันของไฮดรอกซีอะพาไทต์ คอลลาเจน พอลิแลคติกแอซิด และเส้นใยไคติน [45] การผสมรวมกันของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เจลาติน และแก้วไบโอแอกทิฟ [4] การผสมรวมกันของไฮดรอกซีอะพาไทต์ คอลลาเจน ไคโตซาน และท่อนาโนคาร์บอน [5] การผสมรวมกันของไคโตซาน และนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ [6] และการผสมรวมกันของพอลิคาโพรแลคโตน และไฮดรอกซีอะพาไทต์ เป็นต้น ซึ่งแต่ละคอมโพสิตจะใช้เทคโนโลยีหรือวิธีในการขึ้นรูปที่แตกต่างกัน

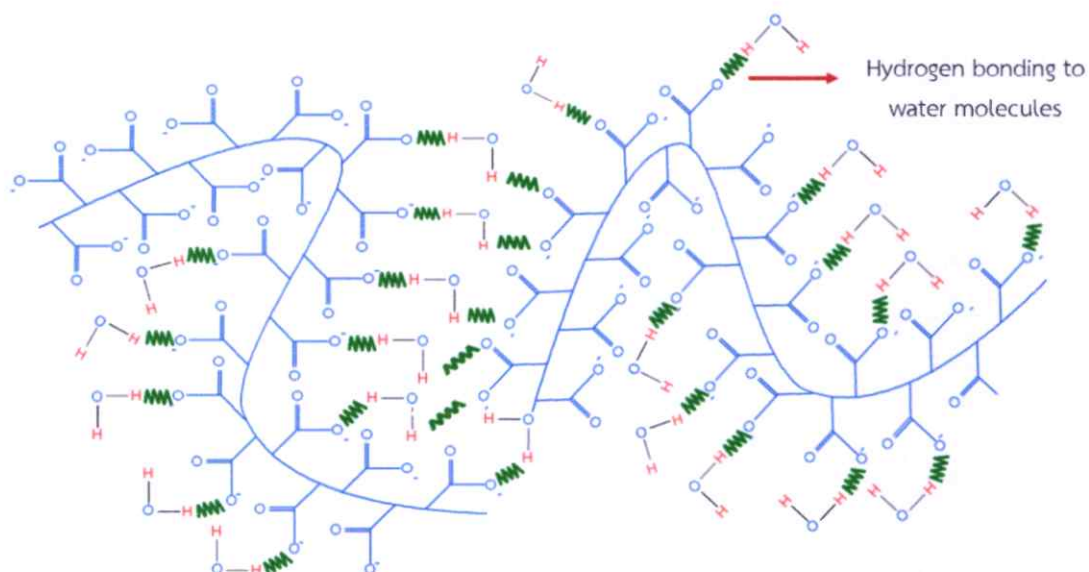
ปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่ใช้ผลิตโครงสร้างเซลล์ให้มีรูปร่างโครงสร้าง และรูปแบบตามที่ต้องการ รวมทั้งสามารถกำหนดสมบัติทางกายภาพของพื้นที่ผิว ความพรุนและขนาดรูพรุนภายในโครงสร้างเซลล์ได้ ซึ่งการผลิตโครงสร้างเซลล์มีหลายวิธีแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เทคโนโลยีที่ใช้ผลิตโครงสร้างเซลล์ [35, 46]

เทคโนโลยี	ขนาดรูพรุน (μm)	ความพรุน (%)
การหล่อ (Solvent casting)	30-300	20-50
เยื่อแผ่นบางแบบซ้อนทับ (Membrane lamination)	30-300	<85
การหลอม (Melt-molding)	50-500	<80
การรีด (Extrusion)	<100	<84
การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying)	<200	<97
ของไหลเหนือวิกฤต (Supercritical-fluid)	<100	10-30
การแยกเฟส (Phase separation)	-	-
Gas foaming	-	-
Particulate leaching	-	-
3D Printing (เช่น SLA, SLS และ FDM เป็นต้น)	-	-

2.4 ไฮโดรเจล (Hydrogel) [47-49]

ไฮโดรเจลเป็นพอลิเมอร์ประเภทไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic) ที่สามารถดูดซับน้ำไว้ได้ภายในโครงสร้าง โดยไม่เกิดการละลายในน้ำ เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นตาข่ายสามมิติ (Crosslinked network structure) และสามารถพองตัวหรือขยายตัวออกได้ รวมถึงยังสามารถหดตัวได้เมื่อมีการสูญเสียน้ำออกไป โครงสร้างของไฮโดรเจลประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ ส่วนที่สามารถเกิดอันตรกิริยา (Interaction) กับโมเลกุลของน้ำหรือเรียกว่าส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic group) เช่น หมู่ -OH, -CONH₂, -COOH, -CONH และ -SO₃H เป็นต้น และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic group) เช่น หมู่ -CH₂, -CH₃ เป็นต้น โดยระหว่างสายโซ่อาจมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ พันธะไฮโดรเจน และอันตรกิริยาระหว่างหมู่ต่าง ๆ ในสายโซ่ ซึ่งประกอบกันเป็นสายโซ่ยาวจำนวนมากและโมเลกุลมีการพันตัวกันหรือขดตัวกันอยู่ ทำให้ภายในโครงสร้างโดยรวมเกิดรูพรุนขนาดเล็ก ๆ



รูปที่ 2.4 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของน้ำกับสายโซ่พอลิเมอร์

2.4.1 ประเภทของไฮโดรเจลแบ่งตามวิธีการเชื่อมโยง [49-52]

ไฮโดรเจลสามารถแบ่งตามวิธีการเชื่อมโยงออกเป็น 2 ชนิด คือ ไฮโดรเจลที่มีการเชื่อมโยงทางเคมี (Chemical crosslink) และไฮโดรเจลที่มีการเชื่อมโยงทางกายภาพ (Physical crosslink)

- การเชื่อมโยงทางเคมีเป็นการเชื่อมโยงแบบถาวร ซึ่งไฮโดรเจลที่มีการเชื่อมโยงทางเคมีนั้นมีชื่อเรียกว่า Irreversible hydrogels เนื่องจากไฮโดรเจลชนิดนี้ไม่สามารถกลับไปละลายได้อีก

- การเชื่อมโยงทางกายภาพเป็นการเชื่อมโยงแบบชั่วคราวที่เกิดจากสายโซ่พอลิเมอร์เกี่ยวพันกันหรือมีอันตรกิริยาทางกายภาพขึ้นระหว่างสายโซ่ เช่น แรงระหว่างประจุ (Ionic interactions) พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonds) หรือแรงดึงดูดระหว่างกันของโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interactions) เป็นต้น ไฮโดรเจลที่เชื่อมโยงทางกายภาพมีชื่อเรียกว่า Reversible hydrogels เนื่องจากไฮโดรเจลชนิดนี้สามารถกลับไปละลายได้อีกเมื่อมีการเปลี่ยนอุณหภูมิ ตัวทำละลายหรือค่าความเป็นกรด-เบส

2.4.2 วิธีการเตรียมไฮโดรเจล (Preparation methods of hydrogels) [49-52]

วิธีการเตรียมไฮโดรเจลที่นิยม มีหลายวิธีดังนี้

2.4.2.1 การเตรียมไฮโดรเจลโดยการเชื่อมโยงทางเคมี

การเชื่อมโยงทางเคมีเป็นวิธีในการสร้างโครงข่าย Irreversible hydrogels โดยใช้พันธะโคเวเลนต์ระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ ซึ่งพันธะโคเวเลนต์มีความแข็งแรงส่งผลให้สมบัติเชิงกลมีเสถียรภาพที่ดี วิธีการเชื่อมโยงทางเคมีเกี่ยวข้องกับการเชื่อมโยงของมอนอเมอร์ภายในสายโซ่ของพอลิเมอร์ การเตรียมด้วยวิธีนี้จึงต้องอาศัยการเติมสารเชื่อมโยง (Crosslinking agent) เป็นตัวกลางในการเชื่อมต่อกันระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์สองสายโซ่เข้าด้วยกัน ทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย เช่น

- Small molecule crosslinker

สารโมเลกุลเล็กที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายทั้ง 2 ด้าน ถูกนำมาใช้เตรียมไฮโดรเจล โดยทำการเชื่อมโยงกับพอลิเมอร์ไฮโดรฟิลิกซึ่งพอลิเมอร์ไฮโดรฟิลิกควรมีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมสามารถทำปฏิกิริยากับสารเชื่อมโยงได้ ซึ่งข้อเสียหลักของวิธีนี้คือสารเชื่อมโยงหลายชนิดที่พบค่อนข้างมีความเป็นพิษ เพื่อป้องกันไม่ให้สารเชื่อมโยงที่ยังไม่ได้ทำปฏิกิริยาตกค้างอยู่และเข้าไปในร่างกายจะต้องทำให้ไฮโดรเจลสังเคราะห์บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้

- Polymer-polymer crosslinking

การพัฒนาใช้สายโซ่ Pre-functionalized polymer ทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันเพื่อจำกัดการใช้สารเชื่อมโยงในระหว่างการเกิดเจล (Gelation) ตัวอย่างเช่น ไฮโดรเจลจาก N-succinylated chitosan และ Aldehyde-terminated hyaluronic acid ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากการเชื่อมโยงผ่านปฏิกิริยา Schiff's base นอกจากนี้ไฮโดรเจลจากไคโตซานยังสามารถใช้ประโยชน์จากปฏิกิริยา Michael addition เพื่อสร้างการเชื่อมโยงระหว่างพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ ซึ่งกลุ่มอะมิโนในไคโตซานสามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มไวนิลของพอลิเมอร์อื่น ๆ ได้ [53] โดยวิธีนี้ได้รับความนิยมในการเตรียมไฮโดรเจลอย่างมาก เนื่องจากมีการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วและสามารถสร้างพันธะได้หลายรูปแบบ ซึ่งถึงแม้ว่าการเชื่อมโยงระหว่างพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์นั้นมีประโยชน์หลายประการแต่ก็มีข้อเสียคือมีกระบวนการเตรียมและการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน

- Photo-crosslinking

นักวิจัยได้พัฒนาพอลิเมอร์ที่สามารถเตรียมเป็นไฮโดรเจลโดยใช้หมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อแสง โดยการเพิ่มส่วนของหมู่ฟังก์ชันจากโมเลกุลที่ไวต่อแสงลงในพอลิเมอร์จึงสามารถก่อให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่างกันได้โดยการฉายแสงยูวี ตัวอย่างเช่น ไฮโดรเจลจาก Alginate methacrylated oxidized กับ Poly(ethylene glycol) (OMA/PEG) ที่เชื่อมโยงด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต [54] โดยมีการต่อหมู่ฟังก์ชันของกลุ่ม Aldehyde ลงบนอัลจินตด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับกลุ่มอะมิโนของ PEG ส่วนกรดอัลจินิก (Alginic acid) จะมีการเติมด้วย 2-aminoethylmethacrylate (AEMA) ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาประเภท Carbodiimide เพื่อช่วยในการเชื่อมโยงทางแสงของกลุ่ม Methacrylate ด้วยแสงยูวี และการเตรียมไฮโดรเจลจากไคโตซานที่เชื่อมโยงด้วยแสง โดยเตรียมไฮโดรเจลไคโตซานที่ไวต่อแสงได้ด้วยการต่อหมู่เอไซด์ (Azide groups) ลงบนพอลิเมอร์ หลังจากการฉายรังสียูวีหมู่เอไซด์จะถูกเปลี่ยนเป็นกลุ่มไนตรีน (Nitrene group) ทำปฏิกิริยาเชื่อมโยงกับกลุ่มอะมิโนอิสระของไคโตซานทำให้เกิดเป็นเจลภายใน 60 วินาที [55]

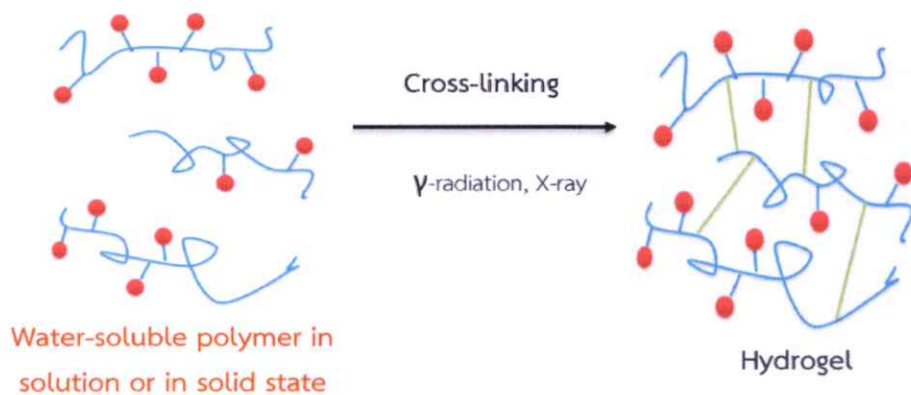
- Free-radical polymerization crosslinking

การเชื่อมโยงโดยผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันด้วยอนุมูลอิสระเป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อเตรียมไฮโดรเจลจากพอลิเมอร์ประเภท Acrylates และ Vinyl lactams นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจลด้วยพอลิเมอร์จากธรรมชาติ ซึ่งหมู่ฟังก์ชันบนแกนหลักของพอลิเมอร์หรือปลายสายโซ่ของพอลิเมอร์จากธรรมชาติทำหน้าที่เป็นหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันได้ การเตรียมไฮโดรเจลโดยวิธีนี้เกี่ยวข้องกับวิธีพอลิเมอร์ไรเซชันผ่านกลไกอนุมูลอิสระทั่วไป ซึ่งรวมถึงขั้นการริเริ่ม (Initiation) การขยายสายโซ่ (Propagation) การโอนย้ายสายโซ่ (Chain transfer) และการสิ้นสุดสายโซ่ (Termination) ในขั้นตอนการริเริ่มเกิดได้จากหลากหลายรูปแบบ เช่น ความร้อน แสง ตัวเร่งปฏิกิริยาอัลตราไวโอเล็ต และรีดอกซ์ ซึ่งสามารถใช้ในการสร้างอนุมูลอิสระ

ได้ โดยเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับมอนอเมอร์และเปลี่ยนเป็นรูปแบบที่มีหมู่ว่องไว หลังจากนั้นหมู่ว่องไวจะทำปฏิกิริยากับมอนอเมอร์ตัวอื่น ๆ ต่อไป ซึ่งในขั้นตอนการขยายสายโซ่ ผลของสายโซ่อนุมูลอิสระที่ยาวขึ้นจะเกิดการสิ้นสุดสายโซ่ด้วยการโอนย้ายสายโซ่หรือการรวมตัวกันของสายโซ่อนุมูลอิสระ 2 สายโซ่เข้าด้วยกัน

- Irradiation crosslinking

ไฮโดรเจลสามารถเตรียมได้ด้วยเทคนิคการฉายรังสีไอออไนซ์ (ionizing radiation techniques) แสดงดังรูปที่ 2.5 วิธีนี้สามารถใช้ได้กับพอลิเมอร์ทั้งแบบสังเคราะห์และแบบธรรมชาติ รังสีไอออไนซ์เป็นรังสีที่มีพลังงานเพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไอออนทั้งในอากาศหรือน้ำ ประเภทของการฉายรังสีมีทั้งการฉายรังสีของลำแสงอิเล็กตรอนและรังสีแกมมา ในระหว่างการฉายรังสีจะมีการสร้าง Reactive sites ขึ้นจำนวนมากตามแนวแกนหลักของพอลิเมอร์เมื่ออนุมูลอิสระเหล่านี้มารวมกันทำให้เกิดการเชื่อมโยงขึ้น ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่เชื่อมโยงด้วยวิธีการฉายรังสีคือ Gelatin/carboxymethyl chitosan [56] และไฮโดรเจลจาก Poly(vinyl alcohol)/carboxymethylated chitosan/honey [57] การเชื่อมโยงด้วยการฉายรังสีมีการใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีเป็นสารเติมแต่งหรือตัวเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามการใช้วิธีการฉายรังสีไม่แนะนำให้ใช้เตรียมไฮโดรเจลจากพอลิเมอร์บางชนิดที่สามารถย่อยสลายได้ภายใต้สภาวะการฉายรังสีไอออไนซ์



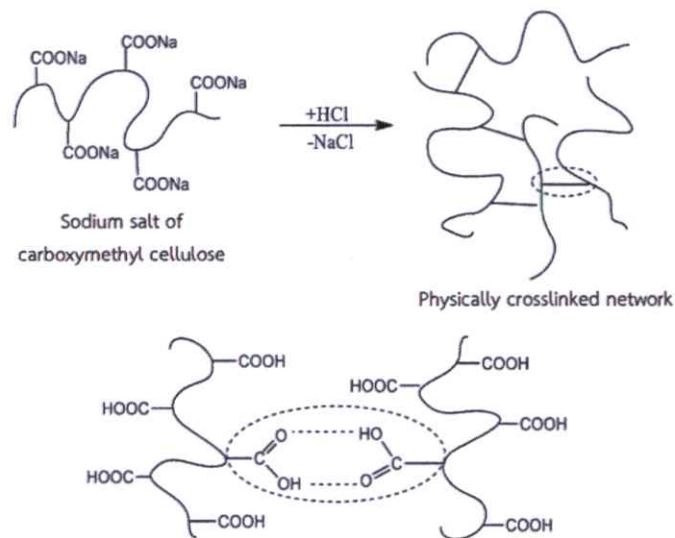
รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ไฮโดรเจลโดย Irradiation crosslinking [58]

2.4.2.2 การเชื่อมโยงทางกายภาพ [59]

วิธีการเตรียมไฮโดรเจลด้วยวิธีการเชื่อมโยงทางกายภาพสามารถเกิดขึ้นผ่านอันตรกิริยาทางกายภาพ โดยไฮโดรเจลที่ได้จากเทคนิคนี้มักถูกเตรียมภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ซึ่งการเกิดเจลโดยวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้โมเลกุลของตัวเชื่อมโยงโคเวเลนต์ที่เป็นพิษ ดังนั้นการนำไฮโดรเจลชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้จึงได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากสะดวก ทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้สารเชื่อมโยงซึ่งช่วยลดต้นทุนในการสังเคราะห์ไฮโดรเจล แต่ก็มีข้อจำกัดเนื่องจากมีความแข็งแรงเชิงกลที่ไม่ดีและการสลายตัวที่ไม่สามารถควบคุมได้ โดยการเตรียมไฮโดรเจลด้วยวิธีการเชื่อมโยงทางกายภาพมีหลายวิธี ได้แก่

- Hydrogen bonding

การเตรียมไฮโดรเจลวิธีนี้อาศัยการสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่ฟังก์ชันภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล เช่น การเตรียมไฮโดรเจลจาก Carboxymethyl cellulose (CMC) โดยการเชื่อมโยงโมเลกุลของ CMC ด้วยการลดค่าพีเอชของสารละลายพอลิเมอร์เพื่อให้สารละลายมีความเป็นกรดและเกิดการถ่ายโอนประจุของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก (-COOH) จากนั้นโมเลกุลของคาร์บอกซิลิกจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของคาร์บอกซิลิกด้วยตัวเอง จนเกิดการเชื่อมโยงและเป็นเจลในที่สุด [60] ซึ่งกลไกนี้เกี่ยวข้องกับการแทนที่โซเดียมใน CMC ด้วยไฮโดรเจนในสารละลายกรด เพื่อสนับสนุนให้เกิดพันธะไฮโดรเจน แสดงดังรูปที่ 2.6 โดยพันธะไฮโดรเจนนอกจากจะทำให้ความสามารถในการละลายของ CMC ในน้ำลดลงแล้วยังส่งผลต่อความยืดหยุ่นของไฮโดรเจลอีกด้วย

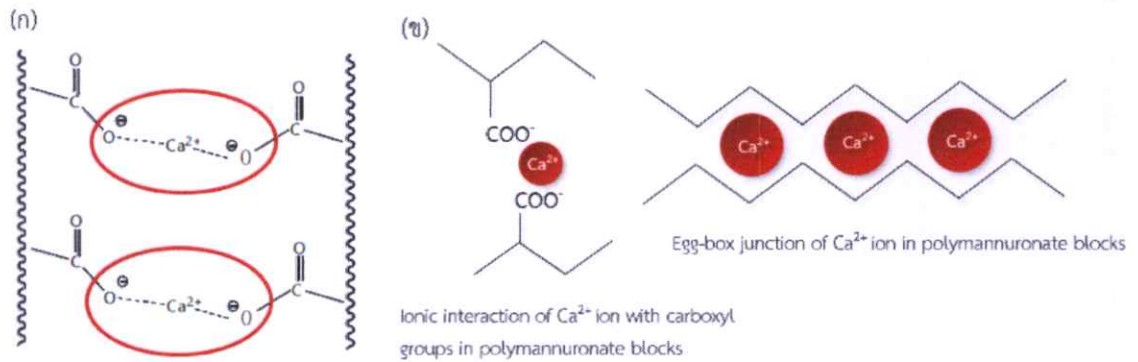


รูปที่ 2.6 การสร้างโครงข่ายไฮโดรเจลจากการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจนใน CMC ที่ pH ต่ำ [59]

- Ionic interaction [61]

การเตรียมไฮโดรเจลวิธีนี้อาศัยการเกิดอันตรกิริยาแบบไอออนิกระหว่างหมู่ฟังก์ชันภายในสายโซ่ของไฮโดรเจลกับสารเชื่อมโยงไอออน (รูปที่ 2.7 (ก)) เช่น การเตรียมไฮโดรเจลจาก Polymannuronate โดยใช้สาร CaCl_2 ที่สามารถแตกตัวเป็น Ca^{2+} ลงใน Polymannuronate ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นประจุลบ คือ COO^- จึงทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุบวกที่เป็นแคตไอออนและหมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุลบ และเกิดเป็นไฮโดรเจลที่มีลักษณะเป็นไอออนิกพอลิเมอร์ (รูปที่ 2.7 (ข)) นอกจากนี้ยังมีการเตรียมไฮโดรเจลจากไคโตซานที่มีประจุบวกเชื่อมโยงแบบไอออนิกด้วยไตรพอลิฟอสเฟส (Triphosphosphate, TPP) ที่มีประจุลบ [62] และการเตรียมไฮโดรเจลจากอัลจินेटที่มีประจุลบเชื่อมโยงแบบไอออนิกด้วย Ca^{2+} [63] หรือ Ba^{2+} [64] ที่มีประจุบวก เป็นต้น โดยวิธีนี้เหมาะสำหรับพอลิเมอร์และสารเชื่อมโยงที่มีประจุ ซึ่งวิธีการเตรียมสามารถทำได้ในน้ำจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นวิธีที่ง่ายสามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยปัจจัยที่มีผลต่อ

ขนาดของอนุภาคและประจุบนพื้นผิวของอนุภาคที่ได้ เช่น น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ซึ่งถ้า น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์มากอนุภาคที่ได้จะมีขนาดใหญ่ ขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ น้อยจะได้อนุภาคที่เล็กกว่า รวมถึงความเข้มข้น ปริมาตร อัตราส่วนของพอลิเมอร์กับสารเชื่อมโยง ค่า ความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย และอุณหภูมิ เป็นต้น

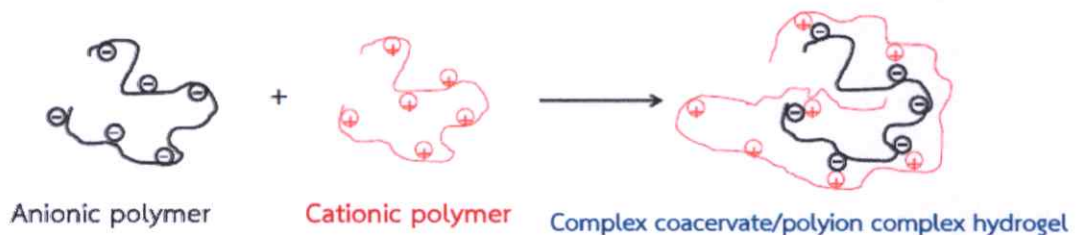


รูปที่ 2.7 (ก) การเกิดไฮโดรเจลโดยใช้สารเชื่อมโยงไอออนิก และ (ข) อันตรกิริยาระหว่างหมู่ COO^- ของ Polymannuronate และ Ca^{2+} [51, 64]

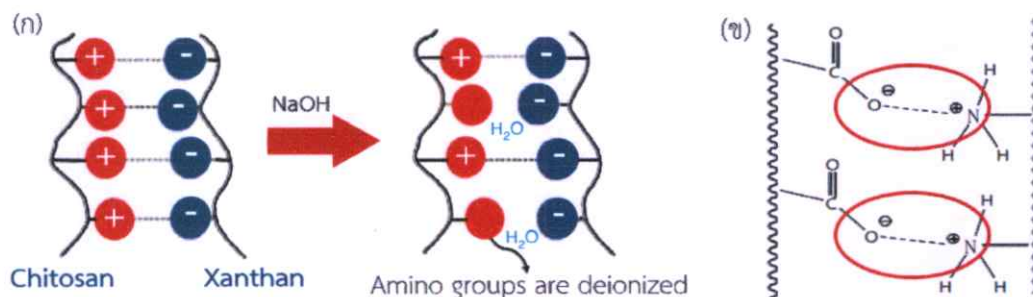
การเตรียมโครงข่ายไฮโดรเจลที่เชื่อมโยงด้วยพันธะไอออนิกนั้น พอลิเมอร์และสารเชื่อมโยงที่มีประจุตรงข้ามจะถูกแยกออกไปในตัวทำละลาย หลังจากนั้นจะเกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุขึ้น

- Complex coacervation

การเตรียมไฮโดรเจลวิธีนี้ทำโดยการนำพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก (Cationic polymer) มาเชื่อมโยงกับพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ (Anionic polymer) (รูปที่ 2.8) โดยหลักการพื้นฐานของวิธีนี้คือ พอลิเมอร์ที่ใช้เตรียมต้องมีประจุตรงข้ามกัน เมื่อนำมาผสมกันจะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน เช่น การเตรียมพอลิไอออนิกไฮโดรเจลโดยนำ Xanthan ซึ่งมีประจุลบมาเชื่อมโยงกับ Chitosan ซึ่งมีประจุบวกเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนพอลิไอออนิกไฮโดรเจล แสดงดังรูปที่ 2.9 (ก)



รูปที่ 2.8 สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Anionic polymer กับ Cationic polymer [59]



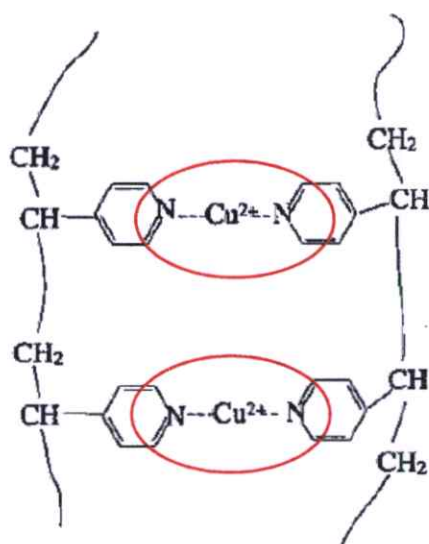
รูปที่ 2.9 (ก) การสังเคราะห์พอลิไอออนิกไฮโดรเจลของ Xanthan/Chitosan [49] และ (ข) การเกิดไฮโดรเจลโดยใช้พอลิอิเล็กโทรไลต์ที่มีประจุตรงข้ามกัน [51]

นอกจากนี้อาจกล่าวในแง่ของสารอิเล็กโทรไลต์ได้ว่าการผสมสารละลายพอลิอิเล็กโทรไลต์ (Polyelectrolyte) สองประเภทที่มีประจุตรงข้ามกันเป็นการเกิดไฮโดรเจลจากสารประกอบเชิงซ้อนพอลิอิเล็กโทรไลต์ (รูปที่ 2.9 (ข)) โดยไฮโดรเจลที่เกิดขึ้นจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของอิเล็กโทรไลต์จะไม่ละลายในน้ำและความเสถียรของพันธะอิเล็กโทรไลต์ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-เบสของระบบ

- Coordination bonding

Coordination bonding เป็นวิธีการเตรียมไฮโดรเจลด้วยการยึดเกาะระหว่างประจุบวกของโลหะกับหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่พอลิเมอร์ เช่น กรดคาร์บอกซิลิกหรือหมู่อะมิโนสามารถใช้ไอออนโลหะได้หลากหลายชนิดในการเตรียมไฮโดรเจล เช่น Ag^+ [66], Cu^{2+} [67] และ Fe^{3+} [68] เป็นต้น ตัวอย่างการเกิด Coordination bonding แสดงดังรูปที่ 2.10 ซึ่งเป็นการเตรียมไฮโดรเจลโดยใช้วิธี Coordination bonding ระหว่างหมู่อะมิโนของพอลิเมอร์กับ Cu^{2+} [52]

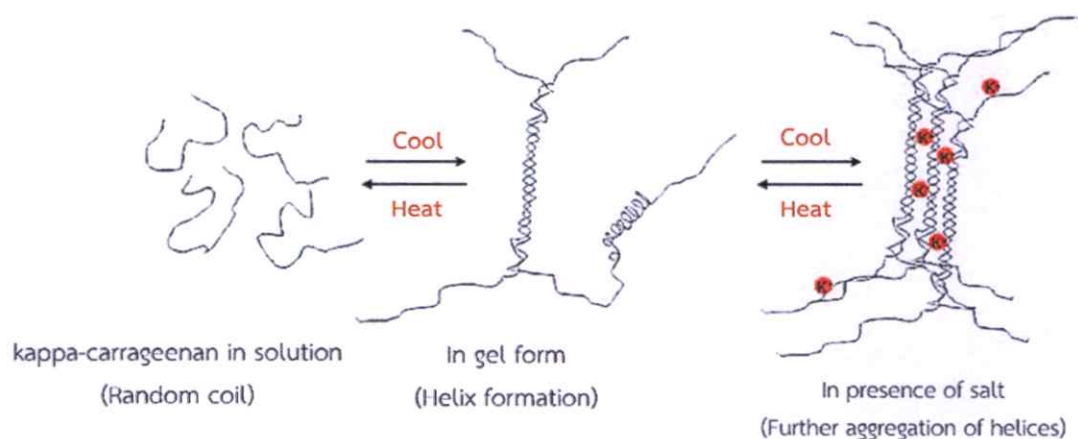
Coordination bonding มีความแข็งแรงมากกว่าพันธะที่พบระหว่างพอลิอิเล็กโทรไลต์และสารเชื่อมโยงไอออนิก โดยพันธะนี้จะเกิดขึ้นผ่านโมเลกุลของ Hydrating water มากกว่าการยึดเกาะโดยตรงระหว่างไอออนโลหะและคีเลต ซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างรัศมีของไฮเดรตไอออน (Hydrating ions) และความแข็งแรงของพันธะ โดยรัศมีของ Hydration ที่มีขนาดเล็กนั้นจะทำให้เกิดเป็นเจลง่ายขึ้น เนื่องจากมีอันตรกิริยาระหว่างประจุเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเกิดเจลยังขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ความเข้มข้น และชนิดของสารละลายที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมโยง



รูปที่ 2.10 การเกิด Chelation ในสารประกอบเชิงซ้อนของ Copper-poly(4-vinyl pyridine) [52]

- Helix formation

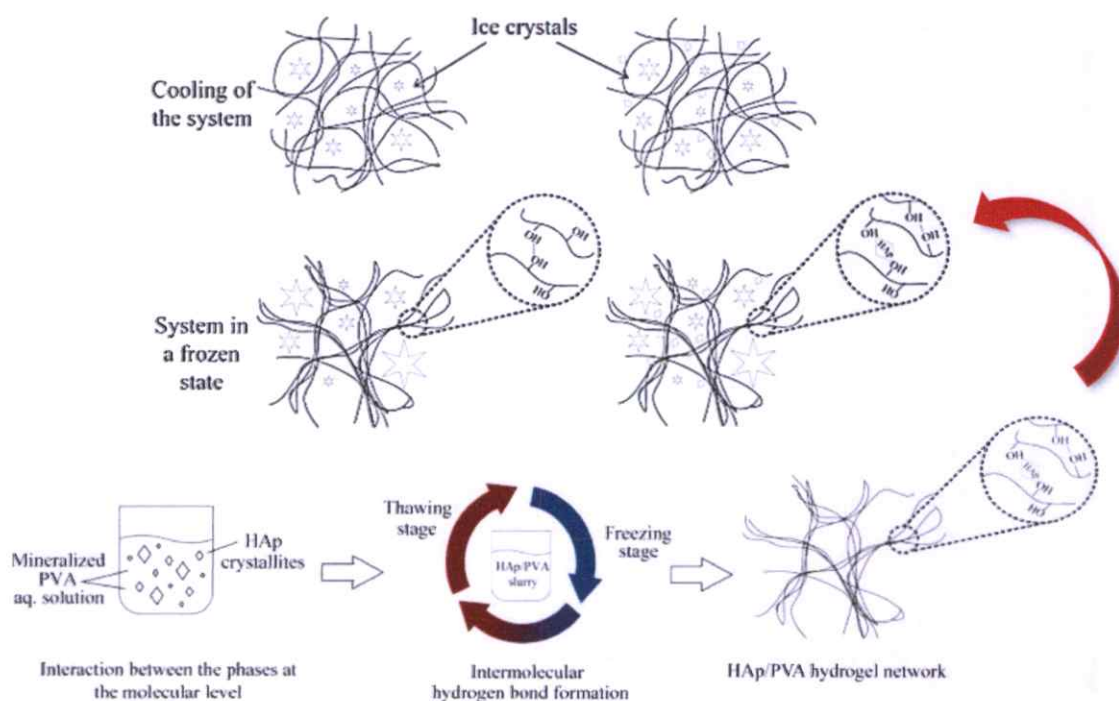
ไฮโดรเจลของอะการ์ (มาจาก Agarose และ Agaropectin) เจลาติน และคาร์ราจีแนน สามารถเกิดขึ้นได้ด้วยการสร้างเกลียว (Helix) [52] โดยเจลที่ได้เกิดจากการถูกความร้อนเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะจากสารละลายกลายเป็นเจล ตัวอย่างเช่น Kappa-carrageenan ในน้ำที่อุณหภูมิมากกว่า 70 องศาเซลเซียส สายโซ่พอลิเมอร์จะอยู่รวมกันในรูปแบบสุ่ม (Random coil) เมื่อทำให้สารละลาย Kappa carrageenan เย็นตัวลงถึงอุณหภูมิหนึ่งสายโซ่พอลิเมอร์เกิดการรวมตัวกลายเป็นเกลียวคู่แทน และเมื่อมีไอออน เช่น โพแทสเซียมไอออนปนอยู่ เกลียวคู่ของ Kappa-carrageenan จะเกิดการรวมเข้าด้วยกันเป็นหน่วยใหญ่ที่เรียกว่า Helices aggregates โดยโพแทสเซียมสามารถทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมภายในโครงสร้างโมเลกุลเกิดอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิตกับอะตอม Sulfate esters และอะตอม Anhydro-oxygen ของ Kappa-carrageenan แสดงดังรูปที่ 2.11 [59]



รูปที่ 2.11 การเกิดเจลของ Kappa-carrageenan (การรวมตัวเป็นเกลียวขณะที่สารละลายร้อนเย็นตัวลงของ Kappa-carrageenan) [59]

- Freeze-thawing

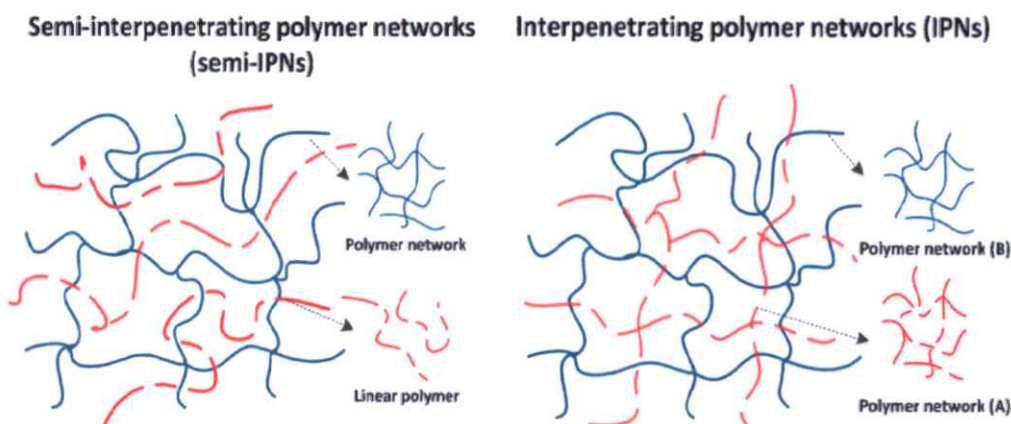
ไฮโดรเจลสามารถเตรียมได้โดยใช้วิธีการ Freeze-thaw โดยกลไกการเกิดเจลเกี่ยวข้องกับกำกับการก่อตัวของ Microcrystals ในโครงสร้างเนื่องจากการทำ Freeze-thawing ตัวอย่างของเจลประเภทนี้คือ ไฮโดรเจลจาก Poly(vinyl alcohol) [69] โดยรูปที่ 2.12 เป็นภาพจำลองของกระบวนการ Freeze-thawing ของไฮโดรเจลจาก Poly(vinyl alcohol) และ HAp



รูปที่ 2.12 Freeze-thawing ของไฮโดรเจลจาก Poly(vinyl alcohol) และ HAp [69]

- Interpenetrating polymer networks (IPNs) [70-76]

ประสิทธิภาพของไฮโดรเจลสามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยเทคนิค Interpenetrating polymer networks (IPNs) เมื่อนำมาใช้ในการทำโครงข่ายไฮโดรเจลเรียกว่า ไฮโดรเจลโครงข่ายตาข่ายพอลิเมอร์ชนิดแทรกสอด (Interpenetrating Network Hydrogel, IPN) โดยเป็นการรวมกันของสองพอลิเมอร์ ซึ่งอยู่ในลักษณะที่เป็นโครงข่ายตาข่ายโดยอย่างน้อยต้องมีโครงข่ายตาข่ายหนึ่งเกิดขึ้นมาก่อนหรือถูกสังเคราะห์ขึ้นมาก่อน จากนั้นสายโซ่ของพอลิเมอร์อีกตัวหนึ่งจะเข้าไปแทรกสอดแล้วสร้างเป็นโครงข่ายตาข่ายขึ้น ซึ่ง IUPAC ได้ให้คำจำกัดความของ IPNs ว่าเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยโครงข่ายสองโครงข่ายหรือมากกว่าซึ่งมีการซ้อนทับกันอย่างน้อยหนึ่งส่วนในระดับโมเลกุล แต่ไม่เกิดพันธะโควาเลนต์ต่อกันและไม่สามารถแยกออกจากกันได้เว้นแต่มีการแตกออกของพันธะเคมี ซึ่งหากมีการเชื่อมโยงกันเพียงโครงข่ายเดียวจะเรียกว่า Semi-IPNs ซึ่ง IUPAC ให้คำจำกัดความของ Semi-IPNs คือ พอลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยโครงข่ายหนึ่งโครงข่ายหรือมากกว่ากับพอลิเมอร์เส้นตรงหรือกิ่งหนึ่งตัวหรือมากกว่าโดยมีการแทรกซึมในระดับโมเลกุลของโครงข่ายอย่างน้อยหนึ่งโครงข่ายด้วยบางส่วนของโมเลกุลพอลิเมอร์เส้นตรงหรือกิ่ง แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 ตัวอย่างแบบจำลองของ Semi-IPNs และ IPNs [71]

ข้อดีของ IPNs เป็นการนำสมบัติที่ดีของพอลิเมอร์แต่ละส่วนประกอบของ IPNs มารวมกัน นำไปสู่ระบบใหม่ที่มีสมบัติที่ดีขึ้นซึ่งแตกต่างจากสมบัติของพอลิเมอร์แต่ละตัว นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมกันของสมบัติในระบบต่าง ๆ โดยสามารถใช้การรวมกันและการเสริมกันของสมบัติเพื่อปรับเปลี่ยนและปรับแต่งลักษณะของวัสดุที่เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความต้องการเฉพาะได้ ซึ่งขั้นตอนที่นิยมใช้ในการสร้าง IPNs คือ การเตรียมสารตั้งต้น (มอนอเมอร์หรือพอลิเมอร์) ผสมในสารละลายก่อนทำการเชื่อมโยง ในกรณีของ IPNs การเกิดการเชื่อมโยงของทั้งสองโครงข่ายสามารถเกิดขึ้นได้พร้อมกันหรือเกิดตามลำดับกัน ในกรณีที่เกิดขึ้นพร้อมกันปฏิกิริยาที่นำไปสู่การเชื่อมโยงโครงข่ายต้องเกิดแบบตั้งฉากกันเพราะอาจเกิดการทำปฏิกิริยาข้ามโครงข่ายกัน (เช่น การเกิดโคพอลิเมอร์) ได้ ส่วนการสร้างโครงข่ายของ Semi-IPNs ประการแรกคือการเตรียมโครงข่ายพอลิเมอร์ชนิดที่หนึ่ง และต่อมามอนอเมอร์หรือพอลิเมอร์ตัวที่สองถูกโหลดเข้าสู่โครงข่ายที่บวมตัวอยู่ เกิดเป็น Semi-IPNs เมื่อพอลิเมอร์ที่ใส่ลงไปถูกเชื่อมโยงเพื่อสร้างโครงข่ายที่สอง Semi-IPNs จะถูกแปลงเป็น IPNs

2.4.3 สมบัติที่สำคัญของไฮโดรเจล [77-78]

2.4.3.1 การดูดซับน้ำของไฮโดรเจล

ไฮโดรเจลสามารถดูดซับน้ำได้โดยการเกิดปฏิกิริยาหรืออันตรกิริยาทางเคมีระหว่างหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำกับโมเลกุลของน้ำ ซึ่งในระหว่างการดูดซับน้ำไฮโดรเจลสามารถคงรูปร่างอยู่ได้โดยไม่ละลายน้ำ เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีเป็นโครงร่างตาข่าย เช่น การดูดซับน้ำของ Poly(sodium acrylate) hydrogel โดยการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลสามารถเกิดขึ้นโดยการเกิดปฏิกิริยาหรือการสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลของน้ำกับคู่อิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Lone pair electron) ของอะตอมออกซิเจนในหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก ($-COOH$) จากนั้นโมเลกุลของน้ำจะดึงดูดน้ำโมเลกุลอื่น ๆ เข้ามาเก็บไว้ในโครงร่างตาข่ายของไฮโดรเจลโดยการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของน้ำด้วยตัวเอง

ไฮโดรเจลที่ดูดซับน้ำได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวมเรียกว่า Super absorbent ซึ่งเป็นไฮโดรเจลที่สามารถดูดซับน้ำได้มาก ไฮโดรเจลมีสมบัติพิเศษคือเมื่ออยู่ในน้ำปริมาณที่มากพอจะมีการพองตัวโดยการดูดซับน้ำเข้าไปในโครงร่างตาข่าย แต่ถ้ามีการระเหยน้ำออกจนได้ไฮโดรเจลที่มีลักษณะแห้งจะเรียกว่า ซีโรเจล (Xerogel) หรือ Dry gel ซึ่งในกระบวนการ

การระเหยน้ำออกโดยไม่มี การรบกวนต่อโครงสร้างของเจลจะได้เจลที่มีลักษณะรูพรุน โดยจะเรียกไฮโดรเจลที่มีลักษณะแห้งนี้ว่า แอร์โรเจล (Aerogel) หรือ สปอนจ์ (Sponge) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อปริมาณการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ ความแรงของประจุ สนามไฟฟ้า ตัวทำละลาย ความดัน และชนิดของเกลือ โดยปัจจัยเหล่านี้จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเจลซึ่งจะเรียกว่า Volume collapse หรือ Volume phase transition นอกจากนี้ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเหล่านี้

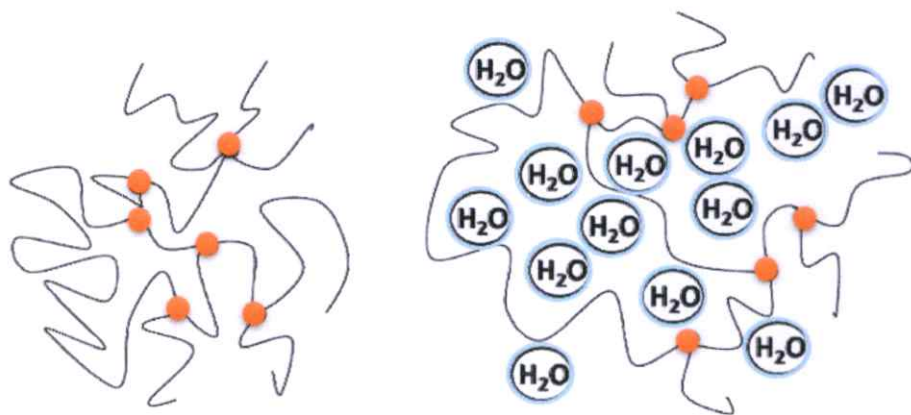
1. ปริมาณของหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำ โดยถ้ามีหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำมาก ไฮโดรเจลจะยิ่งดูดซับน้ำได้ดีขึ้น

2. แรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ปริมาณน้ำภายในและภายนอกโครงสร้างไฮโดรเจลจะมีไม่เท่ากันทำให้เกิดความแตกต่างของแรงดันออสโมติก ถ้าแรงดันออสโมติกแตกต่างกันมาก โมเลกุลน้ำจะสามารถแพร่เข้าไปในไฮโดรเจลได้มากขึ้นทำให้ไฮโดรเจลสามารถดูดซับน้ำได้เพิ่มขึ้น

3. รูพรุนระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ในไฮโดรเจล ถ้าช่องว่างหรือรูพรุนในโครงสร้างมีมากจะทำให้น้ำแพร่เข้าสู่ไฮโดรเจลได้มากขึ้น

2.4.3.2 การบวมตัวและปัจจัยที่ส่งผลต่อการบวมตัวของไฮโดรเจล [78]

สมบัติเฉพาะของไฮโดรเจลคือสามารถบวมตัวแต่ไม่ละลายในน้ำ เนื่องจากไฮโดรเจลมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำประกอบอยู่ด้วยกัน เมื่อนำไฮโดรเจลไปแช่ในน้ำ โมเลกุลของน้ำสามารถแพร่ผ่านเข้าไปแทรกอยู่ภายในบริเวณที่ว่างหรือรูพรุนภายในโครงสร้างสามมิติของไฮโดรเจลได้เนื่องจากมีแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) เกิดขึ้น โมเลกุลของน้ำบางส่วนเกิดอันตรกิริยากับสายโซ่พอลิเมอร์แล้วผลักให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการขยายตัวหรือเกิดการบวมตัวออก ซึ่งเป็นการเปลี่ยนโครงสร้างของไฮโดรเจลให้เกิดสมดุลใหม่ ไฮโดรเจลเมื่อบวมตัวเต็มที่จะไม่แยกหลุดออกจากกัน เนื่องจากโครงสร้างภายในไฮโดรเจลประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่มีความยาวและมีการยึดกันด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยมีสารเชื่อมโยง (Crosslinker) เป็นตัวช่วยยึดสายโซ่พอลิเมอร์เข้าไว้ด้วยกัน การขยายตัวของสายโซ่พอลิเมอร์ในขณะที่ไฮโดรเจลเกิดการบวมตัว แสดงดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 การขยายตัวของสายโซ่พอลิเมอร์ในขณะที่ไฮโดรเจลเกิดการบวมตัว [78]

ปัจจัยที่มีผลต่อการบวมตัวของไฮโดรเจล ได้แก่

1. แรงดันออสโมติก เนื่องจากปริมาณน้ำที่อยู่ภายในและภายนอกของไฮโดรเจลมีไม่เท่ากัน ทำให้แรงดันออสโมติกเกิดความแตกต่างกัน ดังนั้นน้ำจากภายนอกจึงมีการแพร่เข้าไปภายในช่องว่างหรือรูพรุนของไฮโดรเจลนั้น ซึ่งถ้ามีแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกันมากน้ำก็จะสามารถเคลื่อนที่เข้าไปภายในไฮโดรเจลได้มากขึ้น และเกิดการบวมตัวของไฮโดรเจลได้มากขึ้น
2. แรงกระทำระหว่างไฮโดรเจลกับโมเลกุลของน้ำ ถ้าพอลิเมอร์นั้นมีโครงสร้างทางเคมีที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้มาก เช่น สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนหรือแรงดึงดูดระหว่างขั้วได้ ทำให้สามารถเหนี่ยวนำให้โมเลกุลของน้ำแพร่เข้าสู่ไฮโดรเจลได้มากจนเกิดการบวมตัวของไฮโดรเจล
3. ช่องว่างระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ ถ้าไฮโดรเจลมีรูพรุนหรือช่องว่างระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์อยู่มาก น้ำจะสามารถแพร่เข้าไปได้มาก
4. ความยืดหยุ่นของสายโซ่พอลิเมอร์ ถ้าสายโซ่พอลิเมอร์มีความยืดหยุ่นที่ดีจะทำให้แรงต้าน (Resistance force) ของการแพร่โมเลกุลน้ำเพื่อเข้าสู่สมดุลใหม่มีค่าลดลง ส่งผลให้โมเลกุลของน้ำแพร่ผ่านเข้าสู่ไฮโดรเจลได้มาก
5. ความหนาแน่นของการเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ ถ้ามีความหนาแน่นของการเชื่อมโยงมากจะส่งผลให้แรงต้านทานในการขยายตัวของไฮโดรเจลมีค่าเพิ่มขึ้นทำให้ความสามารถในการบวมตัวลดลง

นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในไฮโดรเจล (%Water content, WC) สามารถคำนวณหาได้จากสมการที่ 2.4 [79] และเปอร์เซ็นต์การบวมตัว (% Swelling, %S) หาได้จากสมการที่ 2.5 [80]

$$\%Water\ content = \frac{(\text{น้ำหนักพอลิเมอร์ที่ดูดซับน้ำ} - \text{น้ำหนักพอลิเมอร์ที่แห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักพอลิเมอร์ที่ดูดซับน้ำ}} \quad \text{สมการที่ 2.4}$$

$$\%Swelling = \frac{(\text{น้ำหนักพอลิเมอร์ที่ดูดซับน้ำ} - \text{น้ำหนักพอลิเมอร์ที่แห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักพอลิเมอร์ที่แห้ง}} \quad \text{สมการที่ 2.5}$$

2.4.3.3 ความหนาแน่นของพันธะร่างแห (Crosslinking density)

ความหนาแน่นของพันธะร่างแหของไฮโดรเจลจะมีความสัมพันธ์กับสมบัติอื่น ๆ เช่น การบวมตัวของไฮโดรเจล โดยความหนาแน่นของพันธะร่างแหนี้จะมีสมบัติที่สำคัญ เช่น ความแข็งแรงของโครงสร้าง และการให้อากาศและของเหลวซึมผ่านได้ เป็นต้น ซึ่งความแข็งแรงของโครงสร้างไฮโดรเจลจะมีพื้นฐานที่สำคัญมาจากองค์ประกอบและโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่จะนำมาเตรียม ไฮโดรเจลทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะตาข่ายสามมิติ โดยถ้าความหนาแน่นของพันธะร่างแหน้อย เจลสามารถดูดซับน้ำได้ในปริมาณที่มาก แต่ถ้าความหนาแน่นของพันธะร่างแหมาก เจล

สามารถดูดซับน้ำได้ในปริมาณที่น้อย ซึ่งสามารถปรับปรุงความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลได้ตามต้องการ โดยการเพิ่มหรือลดความหนาแน่นของพันธะ

2.4.3.4 การย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradation)

ไฮโดรเจลสามารถย่อยสลายตัวมันเองได้อย่างช้า ๆ และสลายตัวได้ในร่างกาย ทำให้มีการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านระบบนำส่งยา โดยมีการพัฒนาไกลย่อยสลายนี้เพื่อควบคุมการปลดปล่อยยา (Drug release) และใช้ทางด้าน Tissue-engineering ซึ่งการย่อยสลายนี้ สามารถย่อยสลายด้วยการไฮโดรไลซิสอย่างง่ายหรือการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการไฮโดรไลซิสพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น โคลิซาน พอลิแลคติกแอซิด และอัลจินต เป็นต้น

2.4.3.5 ความยืดหยุ่น (Elasticity)

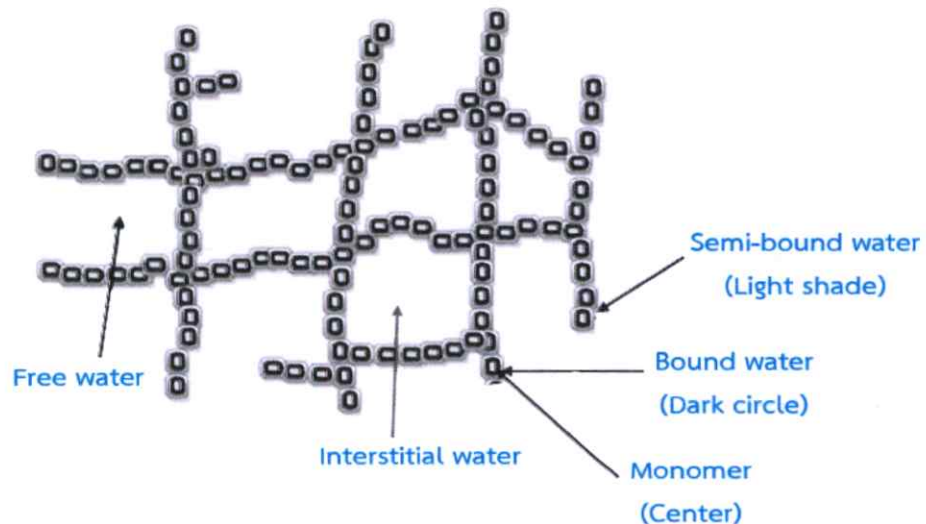
ค่าสัมประสิทธิ์ของการยืดหยุ่นนั้นจะอ้างถึงการคืนตัวกลับมาของเจล หรือกล่าวคือ เมื่อมีการให้แรงดึงแล้วเจลที่ได้สามารถคืนตัวกลับมาได้ ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุลและการบวมตัวของไฮโดรเจลมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความยืดหยุ่นของเจล

2.4.4 โครงสร้างและโมเลกุลของน้ำในไฮโดรเจล [51, 81]

โมเลกุลของน้ำที่อยู่ภายในไฮโดรเจลมีบทบาทสำคัญ โดยโมเลกุลของน้ำสามารถสร้างพันธะหรือเกิดอันตรกิริยากับโครงสร้างไฮโดรเจลได้แสดงดังรูปที่ 2.15

ประเภทโมเลกุลของน้ำที่เกี่ยวข้องกับไฮโดรเจล ได้แก่

1. Bound water (Primary และ Secondary)
2. Semi-bound water
3. Free water หรือ Bulk water
4. Interstitial water



รูปที่ 2.15 โครงสร้างโมเลกุลของโครงข่ายไฮโดรเจลกับโมเลกุลของน้ำ [81]

เมื่อไฮโดรเจลสัมผัสกับน้ำจะเกิดการดูดซับน้ำเข้าสู่เมทริกซ์ขึ้น โดยโมเลกุลของน้ำโมเลกุลแรกเมื่อเข้าสู่เมทริกซ์จะเกิดการยึดติดกับกลุ่ม Hydrophilic เรียกว่า Bound water หรือ Primary

bound water ซึ่งทำให้โครงร่างตาข่ายสามมิติของพอลิเมอร์เกิดการบวมตัวเพราะเกิดการ Hydration ที่สมบูรณ์ของกลุ่ม Hydrophilic และเมื่อ Primary bound water เกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำแล้ว จะทำให้เกิด Hydrophobically-bound water หรือ Secondary bound water โดย Primary และ Secondary bound water เรียกรวมกันว่า Bound water ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างไฮโดรเจล และมีการเกาะจับกับไฮโดรเจลด้วยพันธะทางเคมี โดยโมเลกุลน้ำที่เกิดพันธะกับสายโซ่นั้นจะเกิดการเคลื่อนที่ภายในโครงสร้างของไฮโดรเจลได้ยาก และต้องมีการใช้ความร้อนปริมาณหนึ่งในการระเหยโมเลกุลของน้ำลักษณะนี้ออกหรือให้สภาวะที่รุนแรงเท่านั้นในการแยกหรือกำจัดส่วน Bound water ออกจากโครงสร้างไฮโดรเจล

เมื่อโมเลกุลของน้ำเกิดพันธะกับกลุ่ม Hydrophilic จนอิ่มตัวแล้ว น้ำอีกจำนวนหนึ่งที่ถูกดูดซับไว้ในโครงสร้างไฮโดรเจลเนื่องจากแรงดันออสโมติกจะถูกเรียกว่า Free water หรือ Bulk water ซึ่งเป็นโมเลกุลของน้ำที่ไม่มีการเกิดอันตรกิริยากับสายโซ่พอลิเมอร์ และเป็นโมเลกุลน้ำอิสระ โดยสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ ระเหยได้ง่าย และส่งผลต่อสมบัติของไฮโดรเจลไม่มากนัก นอกจากนี้ยังมีชั้น Semi-bound water เป็นชั้นถัดมาจาก Bound water และ Interstitial water ซึ่งเป็นชื่อเรียกโมเลกุลของน้ำที่อยู่ภายในโครงร่างตาข่ายสามมิติของไฮโดรเจลแบบกายภาพ ไม่ได้ทำพันธะใด ๆ กับโครงร่างตาข่ายสามมิติของไฮโดรเจล

2.4.5 ชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจล [82-83]

พอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจลส่วนใหญ่จะเป็นวัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเคมีและที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาตินั้นจะไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต (Non-toxic) โดยส่วนใหญ่พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติจะเป็นจำพวกพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) และพอลิเมอร์ชนิดที่นำมาเตรียมไฮโดรเจลนั้นจะมีหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำ และน้ำหนักโมเลกุลต่างกันขึ้นอยู่กับการใช้งาน ในปัจจุบันได้มีการนำพอลิเมอร์ชนิดนี้มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มากขึ้น ดังนั้นจำเป็นต้องไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม เช่น ไคโตซาน อัลจินेट ไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans, (GAGs)) เดรกแทน (Dextran) และคาร์ราจีแนน เป็นต้น ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจล แสดงดังตารางที่ 2.2

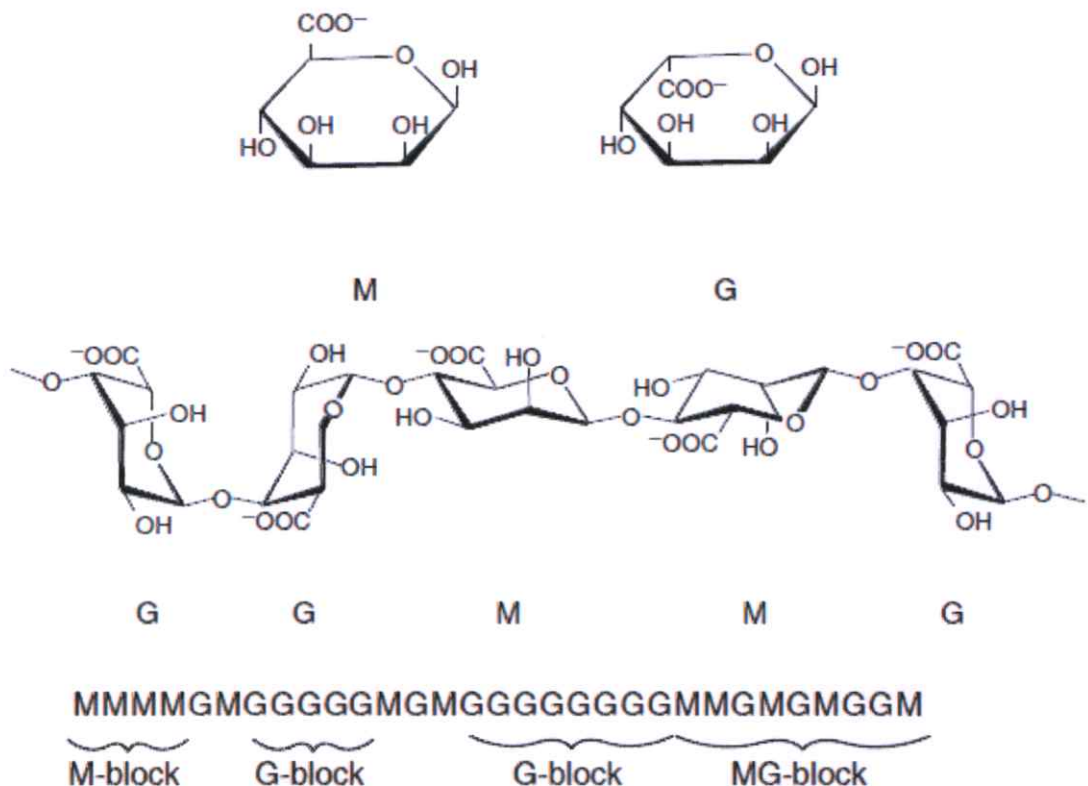
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจล

ประเภทพอลิเมอร์	ตัวอย่าง
Synthetic polymer	Poly(vinyl alcohol) Poly(<i>N</i> -isopropyl acrylamide) Poly(ethylene glycol)
Natural polymer	Chitosan Alginate Cellulose Carrageenan
Semi-synthetic polymer	Poly(vinyl alcohol)/alginate Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/dextrin Polyester/alginate

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการเตรียมไฮโดรเจลจากพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดอัลจินเต และคาร์ราจีแนน เพื่อเตรียมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ จึงขออธิบายเพียงพอลิเมอร์ธรรมชาติจากอัลจินเต และคาร์ราจีแนน

2.4.5.1 อัลจินเต [84-88]

อัลจินเตเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติประเภทเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (Heteropolysaccharide) พบมากในสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (*Phaeophyceae*) และแบคทีเรียดิน เช่น *Macrocystis pyrifera* *Laminaria digitata* และ *Laminaria hyperborean* เป็นต้น โดยอัลจินเตเป็นพอลิแซคคาไรด์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของมอนอแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ 1,4- β -D-manuronic acid (M) และ α -L-guluronic acid (G) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยภายในโมเลกุลประกอบด้วย Homopolymeric regions ของ M และ G ที่เรียกว่า M-block และ G-block ตามลำดับ และมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks แสดงดังรูปที่ 2.16 ซึ่งสัดส่วนของ Copolymer เป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจินเต โดยพอลิเมอร์ที่มีปริมาณของ G-blocks ในโครงสร้างสูง จะมีสมบัติเป็นเจลที่แข็งและทนความร้อนได้ดี แต่ถ้าพอลิเมอร์มีปริมาณของ M-blocks ในโครงสร้างสูง จะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่มและมีความยืดหยุ่นมากกว่าสายโซ่พอลิเมอร์ที่มีปริมาณ G สูง ซึ่งอัลจินเตที่ใช้ในทางการค้ามีหลากหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติการละลายน้ำที่ต่างกัน แต่โดยทั่วไปมักอยู่ในรูปสารประกอบของเกลือ เช่น Ca^{2+} , K^+ , Na^+ และ NH_4^+ ของกรดอัลจินิก เป็นต้น ซึ่งสามารถละลายในน้ำได้



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของอัลจินเตชนิดต่าง ๆ [86]

- ความสามารถในการละลาย

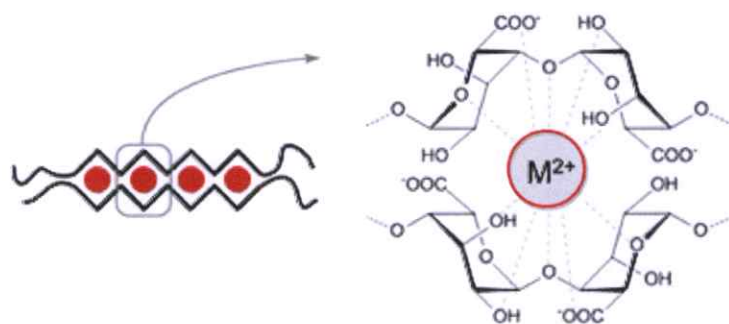
ความสามารถในการละลายน้ำของอัลจินตขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ ค่าพีเอชของตัวทำละลาย ความแข็งแรงไอออนิกของตัวกลาง และการมีไอออนที่ทำให้เกิดเจลในตัวทำละลาย การทำให้อัลจินตละลายได้จำเป็นต้องมีค่าพีเอชมากกว่าค่าวิกฤตซึ่งทำให้หมู่คาร์บอกซิลิกในโครงสร้างเกิดการ Deprotonated ได้ โดยค่าคงที่ในการแตกตัวของมอนอเมอร์ (pKa) Mannuronic acid และ Guluronic acid เท่ากับ 3.38 และ 3.65 ตามลำดับ อัลจินตสามารถละลายได้ในตัวกลางน้ำที่มีสถานะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เป็นกลาง และสามารถก่อเจลได้อย่างรวดเร็วกับสารที่มีประจุสองบวกเมื่ออยู่ในสถานะความเป็นกรด-ด่างที่มีค่ามากกว่า 6 เช่น Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} และ Zn^{2+} เป็นต้น โดยโครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (Egg box) โดยมีประจุบวกเกาะอยู่กับสายโซ่พอลิเมอร์ แสดงดังรูปที่ 2.17 การเปลี่ยนแปลงความแข็งแรงของไอออนิกในสารละลายอัลจินตมีผลต่อการขยายสายโซ่ของพอลิเมอร์และความหนืดของสารละลาย ซึ่งถ้าความแข็งแรงของไอออนิกสูงความสามารถในการละลายของอัลจินตจะลดลง นอกจากนี้การละลายของอัลจินตจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายที่ปราศจากไอออนที่สามารถเกิดการเชื่อมโยงกับอัลจินตได้

- ความหนืดของอัลจินต

ความหนืดของอัลจินตลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของความหนืดกับค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าความหนืดในช่วง pH มากกว่า 5 ความหนืดคงที่ ความหนืดในช่วง pH ต่ำกว่า 4.5 ความหนืดเพิ่มขึ้น และถ้าอยู่ในช่วง pH เท่ากับ 3 จะเริ่มมีผลึกของกรดอัลจินิกเกิดขึ้น

- ความสามารถในการสลายตัว

อัลจินตมีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงหรือใช้ในร่างกายมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย ย่อยสลายได้ ไม่เป็นพิษ Non-thrombogenic และ Non-immunogenic จึงได้รับการอนุมัติจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) สำหรับการใช้งานทางการแพทย์ต่าง ๆ



รูปที่ 2.17 การเกิดเจลของอัลจินตด้วย Multivalent cations ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของเจลที่มีลักษณะคล้ายกล่องไข่ [87]

- การเกิดเจล

ไฮโดรเจลจากอัลจินเตสามารถเตรียมได้โดยการเชื่อมโยงทางเคมีหรือทางกายภาพของสายโซ่พอลิเมอร์ สมบัติของไฮโดรเจลจากอัลจินเตขึ้นกับชนิดของการเชื่อมโยง ความหนาแน่นของการเชื่อมโยง และน้ำหนักโมเลกุลกับองค์ประกอบของอัลจินเต วิธีที่ใช้กันทั่วไปในการเตรียมไฮโดรเจลจากอัลจินเตคือ การเตรียมโดยทำการเชื่อมโยงด้วย Multivalent cations ซึ่งวิธีนี้สามารถเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงทำให้เหมาะสำหรับการกักเก็บสารที่มีความว่องไว โดยการเกิดเจลของอัลจินเตเกิดขึ้นจากการแลกเปลี่ยนไอออนโซเดียมจากหน่วย Guluronic acid กับ Multivalent cations ทำให้มีการซ้อนกันของบล็อก G เกิดเป็นโครงสร้างของเจลที่มีลักษณะคล้ายกล่องไข่ ซึ่งแต่ละสายโซ่สามารถเชื่อมโยงกับโซ่อื่น ๆ อีกมากมายนำไปสู่การก่อตัวของโครงร่างตาข่ายสามมิติ

การเกิดเจลของสารละลายอัลจินเตด้วย Multivalent cations สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเกิดเจลภายนอก (External gelation) และการเกิดเจลภายใน (Internal gelation)

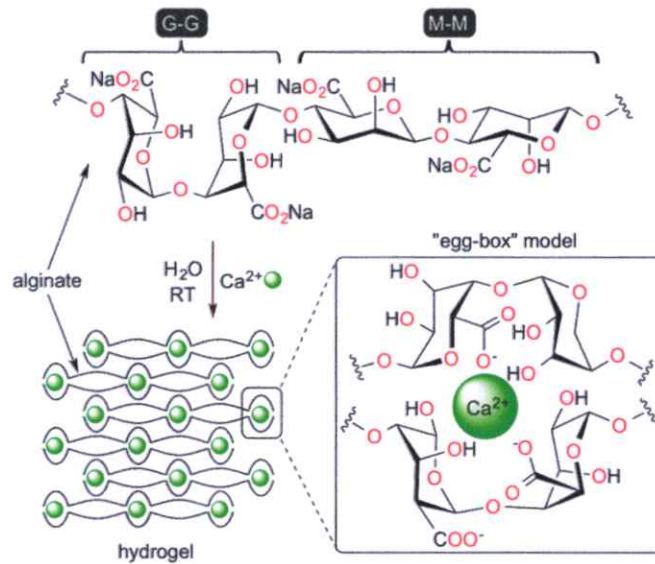
● External gelation

สารละลายอัลจินเตมักถูกหยดลงในสารละลายที่มีประจุบวกอยู่ เช่น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายแบเรียมซัลเฟต เป็นต้น โดยไอออนบวกจะแพร่จากสารละลายภายนอกเข้าสู่ภายในของหยดอัลจินเต และเกิดเป็นอัลจินเตไฮโดรเจลขึ้น ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า วิธีการแพร่ (Diffusion method)

● Internal gelation

สารละลายอัลจินเตจะมีการผสมกับเกลือของแคลเซียมที่ไม่ละลายน้ำ (เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต) ก่อน แล้วแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะถูกปล่อยออกมาจากภายในของสารอัลจินเต โดยการลดค่า pH ของระบบหรือเพิ่มความสามารถในการละลายของแหล่งแคลเซียม ทำให้เกิดอัลจินเตไฮโดรเจลขึ้น

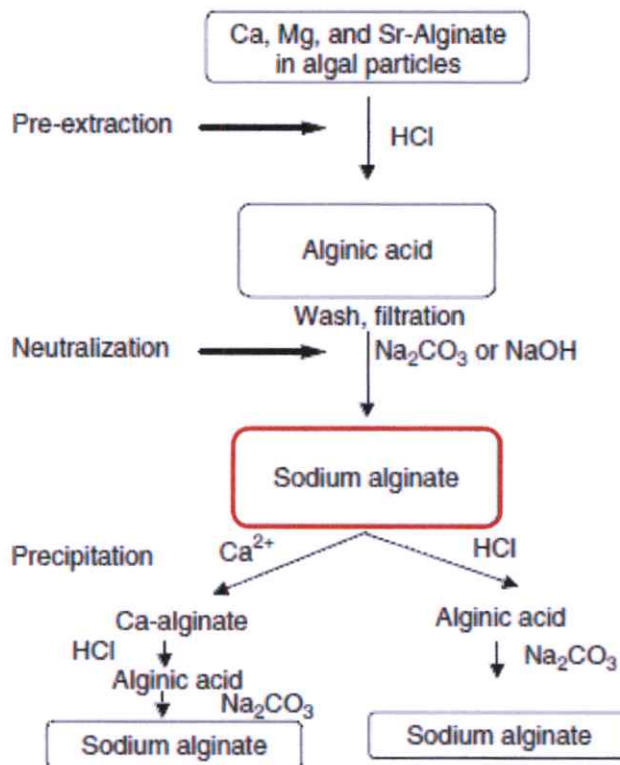
นอกจากนี้เมื่อค่าพีเอชของสารละลายอัลจินเตลดลงต่ำกว่าค่า pKa จะเกิดเป็นเจลของกรดอัลจินิกแทน โดยเจลชนิดนี้จะมีเสถียรภาพก็ต่อเมื่อเกิดการเชื่อมโยงไฮโดรเจลระหว่างโมเลกุล โดยทั่วไปใช้สองวิธีในการผลิตเจลของกรดอัลจินิก สำหรับวิธีแรกเป็นการนำสารกลุ่มแลคโตนมาใช้เป็นตัวไฮโดรไลซิสโซเดียมอัลจินเตอย่างช้า ๆ ตัวอย่างเช่น การเติม Glucono delta lactone (GDL) ลงในสารละลายโซเดียมอัลจินเต และสำหรับวิธีที่สองเป็นการเปลี่ยนเจลของแคลเซียมอัลจินเตไปเป็นเจลของกรดอัลจินิกโดยใช้การแลกเปลี่ยนโปรตอน ซึ่งสมบัติที่ดีของอัลจินเตเมื่อเกิดเป็นเจลคือเจลที่ได้จะไม่สามารถผันกลับได้ (Irreversible) เมื่ออยู่ในน้ำเย็นที่มีแคลเซียมไอออน การเกิดเจลของอัลจินเตโดยใช้แคลเซียมไอออนแสดงดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 การเกิดเจลของอัลจิเนตโดยใช้แคลเซียมไอออน [89]

- วิธีการสกัดอัลจิเนตจากสาหร่ายทะเล

ขั้นตอนการสกัดอัลจิเนตจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลทำได้โดยสกัดสาหร่ายด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำไปล้าง กรอง และทำให้เป็นกลางด้วยด่าง เช่น NaOH และ Na_2CO_3 เป็นต้น จากนั้นตกตะกอนโซเดียมอัลจิเนตด้วยแอลกอฮอล์ ดังแผนภาพในรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 ขั้นตอนการสกัดโซเดียมอัลจิเนตจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล [84]

- การประยุกต์ใช้งานของอัลจินเตต [90]

เนื่องจากอัลจินเตตเป็นพอลิเมอร์ที่มาจากธรรมชาติซึ่งมีสมบัติในการเกิดเจล และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ อัลจินเตตจึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น

- อุตสาหกรรมอาหาร เช่น อัลจินเตตถูกใช้เป็นสารทำให้เกิดเจล สารข้นในซูป เครื่องดื่ม ไอศกรีม และเยลลี่ รวมถึงเติมในอาหารกระป๋องบางชนิดเพื่อใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด และ สารเพิ่มความคงตัว นอกจากนี้เอสเทอร์อัลจินเตตยังใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) และ อิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifiers) เป็นต้น

- อุตสาหกรรมเวชสำอาง อัลจินเตตถูกใช้เป็นสารข้นในการผลิตเครื่องสำอาง

- อุตสาหกรรมการแพทย์ เช่น การขึ้นรูปเจลสำหรับวัสดุการพิมพ์ทันตกรรม การเตรียมแคปซูลปลดปล่อยยาจากอัลจินเตต การนำมาประยุกต์ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และการทำแผ่นปิดแผลไฟไหม้ซึ่งช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น และช่วยลดอาการบาดเจ็บได้ดีกว่าแผ่นปิดแผลแบบดั้งเดิม รวมถึงเมื่อถึงออกจะทำให้ผู้ป่วยรู้สึกเจ็บน้อยกว่าแผ่นปิดแผลแบบดั้งเดิม เป็นต้น [1,9]

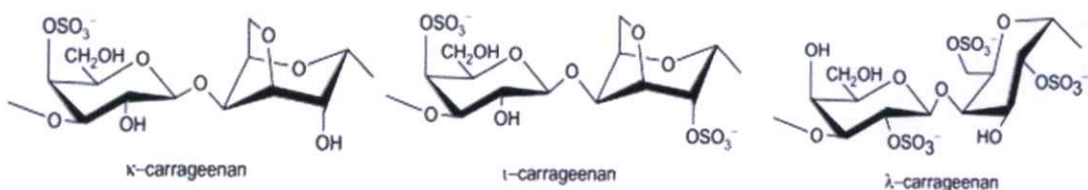
2.4.5.2 คาร์ราจีแนน [11, 84]

คาร์ราจีแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์เชิงเส้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (คาร์ราจีแนนเกรดการค้าโดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 ถึง 1,000,000) โดยคาร์ราจีแนนมีโครงสร้างบิดเป็นเกลียว (Helical) ซึ่งโครงสร้างของคาร์ราจีแนนเป็นองค์ประกอบร่วมของพวก Galactans ที่มีหมู่ของ Half-ester sulfate โดยเชื่อมโยงด้วย 1,3-linked- β -galactose และ 1,4-linked- α - galactose โดยคาร์ราจีแนนสกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีแดง (Red seaweed) ในกลุ่ม *Rhodophyceae*

คาร์ราจีแนนสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้หลายชนิดตามจำนวนและตำแหน่งของกลุ่มเอสเทอร์ซัลเฟต (Ester sulphate) ได้แก่ Kappa, Iota และ Lambda แสดงดังรูปที่ 2.20 ซึ่งคาร์ราจีแนนทั้ง 3 ชนิดนี้ ประกอบด้วยโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์หลักที่ซ้ำ ๆ กันหลายหน่วย โดยคาร์ราจีแนนที่ใช้ทางการค้ามีหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติการเกิดเจล และการละลายน้ำที่ต่างกัน โดยทั่วไปมักอยู่ในรูปสารประกอบของเกลือ เช่น Ca^{2+} , K^+ และ Na^+ เป็นต้น ซึ่งละลายได้ในน้ำ เนื่องจากโมเลกุลของคาร์ราจีแนนมีหมู่ซัลโฟเนตอยู่มากทำให้มีความเป็นประจุลบสูง ซึ่งทำให้ไม่คงตัวในอุตสาหกรรมจึงต้องทำให้อยู่ในรูปของเกลือ

- ประเภทของคาร์ราจีแนน [91]

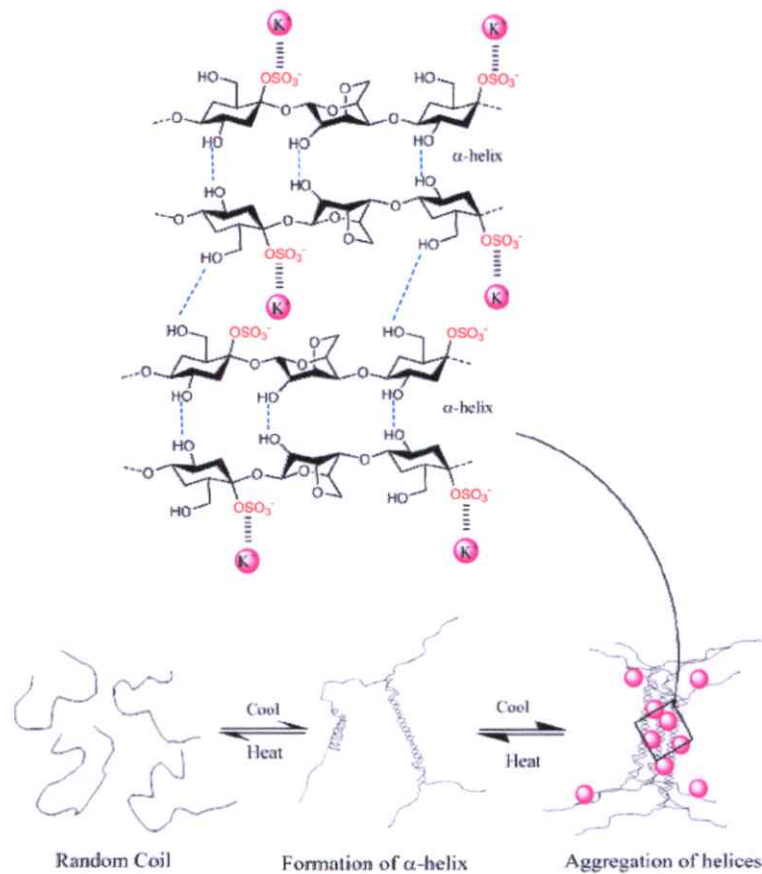
คาร์ราจีแนน แบ่งเป็นประเภทต่าง ๆ ดังนี้



รูปที่ 2.20 โครงสร้างแต่ละประเภทของคาร์ราจีแนน [91]

● Kappa-carrageenan

Kappa-carrageenan ประกอบด้วยน้ำตาลกาแล็กโทส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) ชนิดบีต้า-1,3 และมีกลุ่มซัลเฟตที่ตำแหน่งที่ 4 โดย Kappa-carrageenan นั้นละลายได้ดีในน้ำร้อน น้ำนมร้อน น้ำเชื่อม และน้ำเกลือที่ร้อน (ความเข้มข้นของน้ำตาลหรือเกลือต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเย็นตัวลงจะเกิดเจลประเภท Thermoreversible gel ซึ่งมีลักษณะใส เนื้อสัมผัสแข็ง แน่น แต่เปราะ โดย Thermoreversible gel คือเจลที่สามารถละลายได้เมื่อได้รับความร้อนและเกิดเจลอีกครั้งเมื่อเย็นตัวลง ซึ่ง Kappa-carrageenan ถูกใช้เป็น Stabilizing agent ในน้ำนม เนื่องจากแรงระหว่างประจุทำให้เคซีนไมเซล (Casein micelle) คงตัวอยู่ได้โดยไม่แยกชั้นออกจากเวย์ (Whey) ซึ่งเจลของ Kappa-carrageenan จะแข็งแรงขึ้นถ้ามี K^+ เป็นตัวเชื่อมโยงและจะคงตัวต่อกรดที่ค่า pH มากกว่า 3.8 โดยเจลจาก Kappa-carrageenan นั้นจะไม่ทนต่อการแช่เยือกแข็ง และ Freeze-thawing instability แต่ถ้าใช้ร่วมกับ Locust bean gum จะช่วยให้ทนต่อการแช่เยือกแข็งดีขึ้น ซึ่งการเกิดเจลของ Kappa-carrageenan เมื่อใช้ K^+ เป็นตัวเชื่อมโยงแสดงดังรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.21 การเกิดเจลของ Kappa-carrageenan เมื่อใช้ K^+ เป็นตัวเชื่อมโยง [92]

- **lota-carrageenan**

lota-carrageenan มีความสามารถในการเกิดเจลได้เมื่อสารละลายเย็นตัวลง โดยเกิดเจลประเภท Thermoreversible gel ซึ่งคาร์ราจีแนนประเภทนี้มีกลุ่มซัลเฟตที่ตำแหน่งที่ 2 และ 4 และมีจำนวนกลุ่มซัลเฟตมากกว่า Kappa ประมาณ 25-50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความว่องไวต่อ K^+ ลดลงมีผลทำให้ได้เจลที่อ่อนนุ่ม ยืดหยุ่น และทนต่อการแช่เยือกแข็งมากกว่า Kappa-carrageenan แต่ถ้ามีซัลเฟตตำแหน่งที่ 2 มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ว่องไวต่อ Ca^{2+} มากขึ้น

- **Lambda-carrageenan**

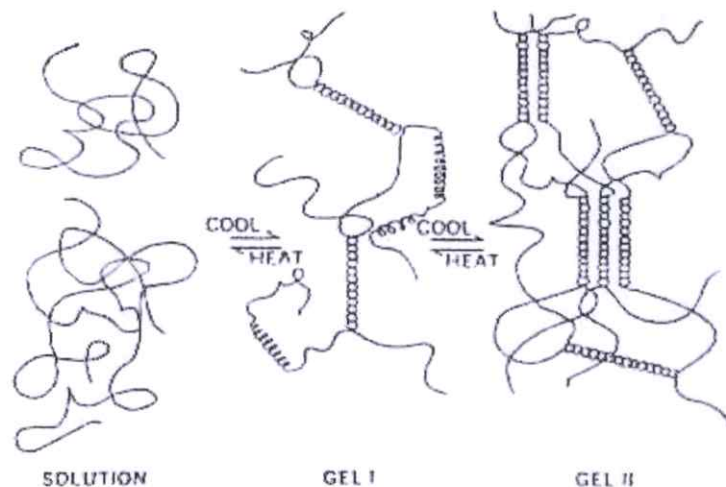
Lambda-carrageenan มีกลุ่มซัลเฟตที่ตำแหน่งที่ 2 และตำแหน่งที่ 6 และไม่เกิดการบิดวงที่คาร์บอนตำแหน่ง 3-6 จึงมีผลทำให้ไม่มีสมบัติในการเกิดเจล

- **ความสามารถในการละลาย**

คาร์ราจีแนนทุกชนิดสามารถละลายได้ในน้ำร้อน แต่บางชนิดเท่านั้นที่สามารถละลายได้น้ำเย็น เช่น เกลือโซเดียมของคาร์ราจีแนนชนิด Kappa และ lota สามารถละลายได้ในน้ำเย็น ในขณะที่เกลือของไอออนชนิดอื่น ๆ เช่น K^+ หรือ Ca^{2+} ไม่สามารถละลายได้อย่างสมบูรณ์ในน้ำเย็น ส่วนคาร์ราจีแนนชนิด Lambda จะละลายได้ในน้ำเย็นโดยไม่ขึ้นกับชนิดของไอออน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคาร์ราจีแนน และไอออนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งส่วนใหญ่คาร์ราจีแนนชนิด Kappa และ lota ต้องใช้อุณหภูมิในการละลายมากกว่า 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้คาร์ราจีแนนทุกชนิดจะไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่สามารถละลายในตัวทำละลายที่ละลายน้ำได้ เช่น แอลกอฮอล์ (Alcohol) และพรอพิลีนไกลคอล (Propylene glycol) เป็นต้น

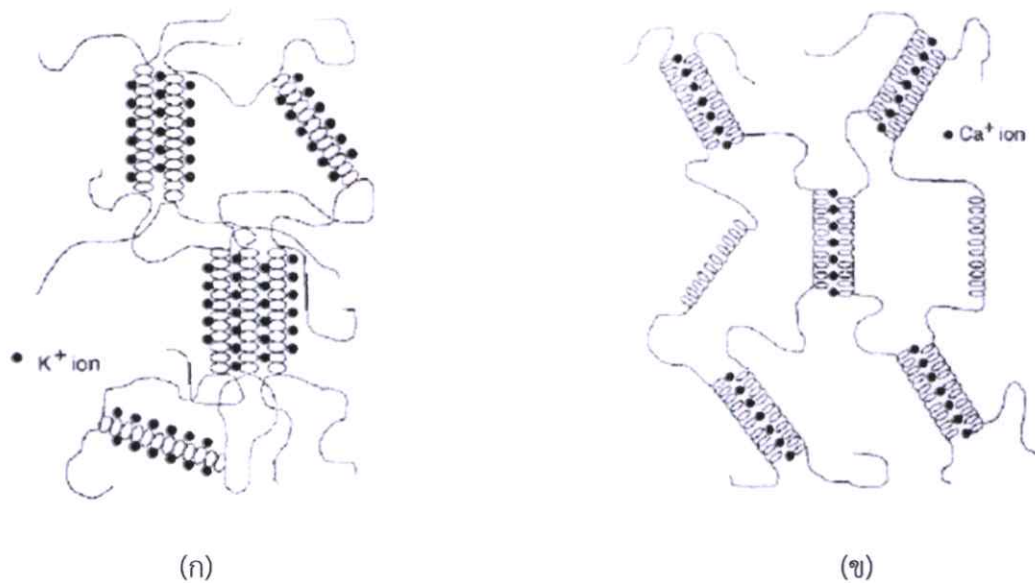
- **การเกิดเจล [93-94]**

คาร์ราจีแนนเมื่อให้ความร้อนและทำการปั่นกววนสายโซ่ของคาร์ราจีแนนจะอยู่ในรูปของ Random coil ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ และเมื่อลดอุณหภูมิลงจนถึงอุณหภูมิห้องสายโซ่ของพอลิเมอร์จะเกี่ยวพันกันในรูปของ Helix โดยแต่ละสายโซ่ของพอลิเมอร์จะรวมตัวเกิด Junction point (Gel I) และเมื่อปล่อยให้เย็นตัวลงอีกจะเกิดการเกาะกันของ Junction point (Gel II) มากขึ้น ทำให้เกิดการแข็งตัวของเจล แสดงดังรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 การเกิดเจลของคาร์ราจีแนน [94]

การเติมโลหะไอออนจะมีผลต่อการเกิดเจล เช่น Kappa carrageenan เมื่อเติม K^+ จะเกิดเจลขึ้นแสดงดังรูปที่ 2.23 (ก) แต่ถ้าเติม Ca^{2+} จะเกิด Rigid gel ส่วน Iota และ Lambda carrageenan ถ้าเติม K^+ จะเกิดเจลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ถ้าเติม Ca^{2+} จะเกิดอีลาสติกเจล (แสดงดังรูปที่ 2.23 (ข)) เฉพาะกับ Iota carrageenan แต่จะไม่เกิดเจลกับ Lambda carrageenan เป็นต้น นอกจากนี้การผสมคาร์ราจีแนนชนิด Kappa กับ Iota เข้าด้วยกันจะทำให้มีสมบัติในการเกิดเจลมากขึ้นและเจลที่ได้มีอีลาสติกเพิ่มขึ้น รวมถึงเกิด Syneresis น้อยลง



รูปที่ 2.23 การเกิดเจลของคาร์ราจีแนนชนิด Kappa และ Iota เมื่อทำปฏิกิริยากับแคทไอออน (ก) การเกิดเจลของคาร์ราจีแนนชนิด Kappa เมื่อทำปฏิกิริยากับ K^+ (ข) การเกิดอีลาสติกเจลของคาร์ราจีแนนชนิด Iota เมื่อทำปฏิกิริยากับ Ca^{2+} [93]

- วิธีการสกัดคาร์ราจีแนนจากสาหร่ายทะเล

คาร์ราจีแนนสามารถถูกสกัดจากสาหร่ายได้หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยสารละลายต่างแล้วเติมสารละลายที่มีประจุบวกเพื่อช่วยตกตะกอนออกมาหรือสกัดด้วยสารละลายกรดแล้วตกตะกอนด้วย 80 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้การแยกสกัด Lambda-carrageenan ออกจาก Kappa และ Iota-carrageenan ทำได้โดยเติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ซึ่งจะมี Lambda-carrageenan เท่านั้นที่ไม่ตกตะกอนลงมา ทำให้สามารถแยก Lambda-carrageenan ออกจากกลุ่มอื่นได้

- การประยุกต์ใช้งานของคาร์ราจีแนน [13, 85]

- อุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็น Thickening agent ทำให้เกิดความหนืด เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ช่วยให้น้ำมันและไขมันกับน้ำผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ดี เป็นสารก่อเจล (Gelling agent) ทำให้เกิดเจลจากคาร์ราจีแนนเป็นเจลชนิด Thermoreversible gel ใช้ในผลิตภัณฑ์ของหวานที่เป็นเจล (Dessert gel) อาหารสัตว์บรรจุกระป๋อง ผลิตภัณฑ์นม (Dairy product) และน้ำนมถั่วเหลือง (Soy milk) เป็นต้น

- อุตสาหกรรมการแพทย์ เช่น สามารถนำมาใช้ในการเตรียมแคปซูลแบบนิ่มและแข็ง โดยใช้ร่วมหรือทดแทนเจลาตินจากสัตว์ ใช้เป็นสารก่อเจลหรือเพิ่มความหนืดในยาลดกรด ใช้เพิ่มความคงตัวของอิมัลชันในตำรับยาที่ละลายน้ำยาก ใช้เพิ่มความคงตัวของยาสีฟัน โดยคาร์ราจีแนนจะทำหน้าที่เพิ่มความหนืดในวัฏภาคน้ำ และช่วยกระจายสารขัดฟันและน้ำมันหอมระเหยในยาสีฟัน นอกจากนี้คาร์ราจีแนน ยังใช้ยึดอายุเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน

- อุตสาหกรรมด้านเวชสำอาง นอกจากจะใช้คาร์ราจีแนนในการเพิ่มความคงตัวของตำรับยาแล้ว คาร์ราจีแนนยังช่วยรักษาความชุ่มชื้นของผิวหนังโดยการลดอุณหภูมิของผิวหนัง และลดการระเหยของน้ำจากผิวหนัง นอกจากนี้คาร์ราจีแนนยังใช้ในการปรับลักษณะเนื้อครีมได้อีกด้วย

2.4.6 การประยุกต์ใช้งานไฮโดรเจล [78, 95-99]

ไฮโดรเจลถูกนำมาประยุกต์ใช้งานในหลาย ๆ ด้าน ได้แก่

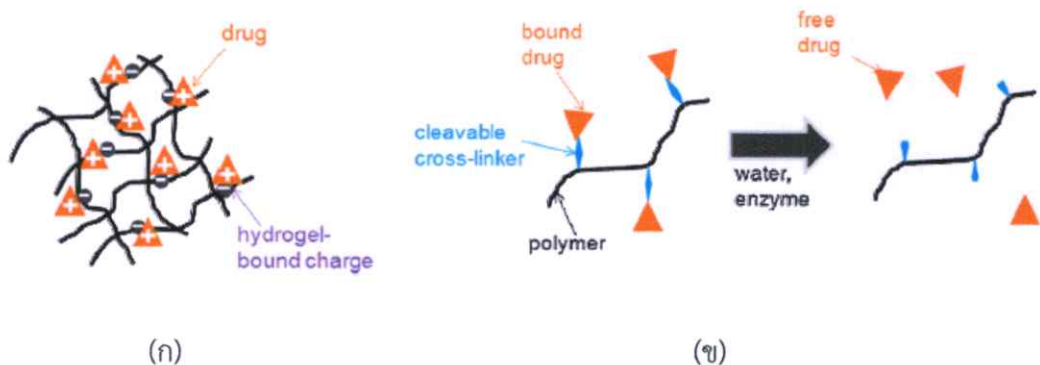
- ด้านการแพทย์ เช่น

- แผ่นปิดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก เนื่องจากไฮโดรเจลสามารถเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์ มีความชุ่มชื้นสูง และช่วยดูดซับน้ำเหลืองและของเหลวที่ไหลออกมาจากแผลได้ดี ในขณะที่เดียวกันออกซิเจนสามารถผ่านรูพรุนของเจลได้ ทำให้ร่างกายสามารถสร้างเนื้อเยื่อได้ดีกว่าปกติ และด้วยความใสทำให้สังเกตความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับแผลได้เป็นอย่างดี

- คอนแทคเลนส์ ที่ให้ความสบายต่อดวงตา ลดการระคายเคือง

- ไฮโดรเจลใช้แทนซิลิโคนในการศัลยกรรมตกแต่ง

- สารนำส่งยาด้วยสมบัติในการดูดซับของเหลวได้ดีจึงดูดซับยาเก็บไว้แล้วปลดปล่อยยาออกมาในปริมาณที่ต้องการได้ รวมถึงสามารถเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จึงมีการประยุกต์ใช้เป็นไฮโดรเจลเพื่อเป็นระบบนำส่งยา ซึ่งมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการใช้ไฮโดรเจลเป็นวัสดุปลดปล่อยยาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากวัสดุไฮโดรเจลแต่ละชนิดสามารถเกิดอันตรกิริยากับตัวยาบางชนิดได้ทั้งทางกายภาพและเคมีจึงทำให้มีความหลากหลายทางการศึกษา โดยแบบจำลองของการใช้ไฮโดรเจลเป็นวัสดุปลดปล่อยยาด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี แสดงดังรูปที่ 2.24



รูปที่ 2.24 วิธีทางกายภาพ (ก) และเคมี (ข) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอันตรกิริยาระหว่างยาที่บรรจุกับเจลพอลิเมอร์เพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยา [98]

- ไฮโดรเจลสามารถใช้เคลือบวัสดุที่ต้องการนำมาสัมผัสกับร่างกาย เช่น การใช้เคลือบอวัยวะเทียมที่ใช้ในร่างกาย เป็นต้น เนื่องจากมีสมบัติที่สามารถเข้ากันได้กับสารชีวภาพ เช่น เนื้อเยื่อ น้ำเหลือง และเลือด เป็นต้น
 - วิศวกรรมเนื้อเยื่อและกระดูก เช่น กล้ามเนื้อเทียม เนื่องจากไฮโดรเจลมีความสามารถในการขยายตัวและหดตัวได้ จึงสามารถนำมาสร้างกล้ามเนื้อเทียมได้ [99]
 - ผ้าอ้อมนาโนไฮโดรเจลเป็นองค์ประกอบของผ้าอ้อมสำเร็จรูป เนื่องจากสมบัติในการดูดซับที่ดี
- ด้านเกษตรกรรม
 - ใช้เม็ดไฮโดรเจลสำหรับการเพาะเมล็ดให้เป็นต้นอ่อน เนื่องจากไฮโดรเจลมีสมบัติดูดซับน้ำได้ดีจึงช่วยคงสภาพความชุ่มชื้นในดินให้แก่พืชในบริเวณเพาะปลูกที่แห้งแล้ง
- ด้านเวชสำอาง
 - แผ่นไฮโดรเจล เนื่องจากไฮโดรเจลมีส่วนประกอบของน้ำจึงคงความชุ่มชื้น รวมถึงยืดหยุ่น ยึดติดผิวได้ดี และสามารถระบายอากาศได้ดีจึงนำมาทำเป็นแผ่นไฮโดรเจล
- ด้านโรงงานอุตสาหกรรม
 - การดูดซับโลหะหนักในน้ำเสีย เนื่องจากสมบัติของไฮโดรเจลสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะ และสามารถเกิดกลไกการแลกเปลี่ยนไอออนได้โดยการคีเลตระหว่างไอออนโลหะหนักกับไฮโดรเจลจึงทำให้ไฮโดรเจลถูกนำไปประยุกต์ใช้งานด้านโรงงานอุตสาหกรรมในการดูดซับโลหะหนักในน้ำเสียหรือน้ำทิ้งจากโรงงาน

2.5 การปลดปล่อยยา (Controlled release, CR) [100]

ระบบนำส่งยา (Drug delivery system) คือ การเตรียมยาในรูปแบบต่าง ๆ ที่สามารถควบคุมให้ปลดปล่อยยาในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำยาไปยังอวัยวะหรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อทำให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น โดยพอลิเมอร์นับเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในระบบนำส่งยาที่สามารถช่วยควบคุมให้การปลดปล่อยยาเป็นไปตามต้องการ โดยทำหน้าที่ คือ เป็นสารช่วยควบคุมการปลดปล่อยให้เกิดช้า ๆ และคงที่ในปริมาณที่ต้องการ เป็นตัวช่วยป้องกัน และนำส่งยาไปยังบริเวณเป้าหมายในร่างกาย โดยไม่ทำให้ยาเกิดการปลดปล่อย หรือตัวยากถูกทำลายไปก่อน ทั้งนี้พอลิเมอร์ที่เลือกใช้ต้องมีสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญคือ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย

โดยทั่วไปแล้วในระบบปลดปล่อยยาที่ใช้พอลิเมอร์เป็นตัวควบคุม จะต้องคำนึงถึงชนิด และสมบัติพื้นฐานของพอลิเมอร์ รวมถึงชนิดของยาและระบบที่ใช้ควบคุมการปลดปล่อยยา โดยการควบคุมการปลดปล่อยให้อยู่ในอัตราและปริมาณที่ต้องการนั้น มีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าตัวยากที่ใช้ในการรักษา เนื่องจากการเตรียมยาเพื่อใช้ในการรักษาแบบเดิม ๆ นั้น ยาจะถูกปลดปล่อยออกมาจนถึงระดับที่ให้ผลในการรักษาโดยทันที และค่อย ๆ ลดระดับลงจนหมดฤทธิ์ จากนั้นผู้ป่วยต้องรับประทานยาใหม่ ทำให้ต้องเพิ่มความถี่ในการใช้ยา ในขณะที่การเตรียมยาในรูปแบบควบคุมการปลดปล่อย จะทำให้ระดับของยาในพลาสมาคงที่เป็นเวลานานตลอดช่วงการใช้ จึงไม่จำเป็นต้องใช้ยามากครั้ง

การควบคุมการปลดปล่อยยา เป็นการออกแบบการปลดปล่อยยาให้มีอัตราคงที่ และมีความเข้มข้นของยาที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อมีการดูดซับสาร การควบคุมการปลดปล่อย (CR) มีหลายรูปแบบ แต่ทั้งหมดเรียกรวมว่า Modified release โดยแบ่งออกเป็น 2 แบบดังนี้

2.5.1 Membrane controlled device

ยาทั้งหมดหรือบางส่วนถูกเก็บไว้อยู่ภายในส่วนกักเก็บยา (Drug reservoir) และมีการเคลือบหรือห่อหุ้มที่บริเวณผิวหน้าด้วยพอลิเมอร์ ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการควบคุมการปลดปล่อยยาออกสู่ภายนอก แบ่งออกเป็น

1. Membrane diffusion เป็นการใชพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถบวมตัวได้ ทำให้มีรูพรุนเกิดขึ้น เพื่อให้ยาแพร่ผ่านรูพรุนของพอลิเมอร์
2. Membrane dissolution เป็นการปลดปล่อยยาออกมาด้วยการละลายอย่างช้า ๆ ทำให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้ยาวนานขึ้น ทำได้โดยการนำสารที่ละลายเข้าไปเคลือบอนุภาคยา เมื่อผิวที่เคลือบไว้ละลายหมด ตัวยาจึงถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งการควบคุมอัตราเร็วในการละลายของยาขึ้นอยู่กับความหนาและความเร็วในการละลายของสารที่ใช้เคลือบ

2.5.2 Matrix device

ตัวยาคจะกระจายตัวอยู่ภายในเนื้อพอลิเมอร์ แบ่งเป็น

1. Matrix diffusion ตัวยามีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมออยู่ภายในส่วนกักเก็บยา (Drug reservoir) ที่เป็นพอลิเมอร์
2. Matrix dissolution มีการผสมพอลิเมอร์ที่ละลายได้ช้าเข้าเป็นส่วนประกอบในเม็ดยา เพื่อให้เม็ดยาละลายได้ช้าลง ส่งผลให้ตัวยาละลายออกอย่างช้า ๆ พร้อมกับการกร่อนหรือการละลายของพอลิเมอร์
3. Osmosis device เป็นการปลดปล่อยยาโดยอาศัยความดันออสโมซิสมาใช้เป็นแรงดันในการนำส่งยา โดยมีเยื่อเลือกผ่านและปริมาณตัวยากับเกลือต่าง ๆ ในระบบเป็นตัวควบคุมความดันออสโมซิส ซึ่งอัตราการปลดปล่อยขึ้นอยู่กับค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน ความหนาของเมมเบรน ขนาดของรูเปิด และความต่างของแรงดันออสโมติกทั้งในและนอกเม็ดยา
4. Compression coated tablet เป็นเม็ดยาที่อัดเป็นชั้น 2-3 ชั้น โดยให้ชั้นที่มียาที่ต้องการปลดปล่อยอยู่ตรงกลาง ส่วนชั้นบนกับล่างเป็นพอลิเมอร์ เพื่อควบคุมการปลดปล่อย
5. Rupturable pulsatile release tablet เป็นการปลดปล่อยยาให้ออกมาตามช่วงเวลาที่ต้องการ ซึ่งประกอบไปด้วย ชั้นที่แตกออก (Rupturable layer) ชั้นที่บวม (Swelling layer) และตัวยา (Drug core) ในปัจจุบันมีการนำระบบนี้มาใช้ นำส่งยาสู่ลำไส้ใหญ่ (Colon specific drug delivery system) ซึ่งช่วยในการปลดปล่อยยาเฉพาะตรงช่วงที่ร่างกายต้องการ และลดการเกิดผลข้างเคียงจากยาได้
6. Floating tablet เป็นยาที่ลอยได้ในกระเพาะอาหาร เนื่องจากมีความหนาแน่นน้อยกว่า Gastric fluid จึงสามารถออกฤทธิ์ได้นาน
7. Ion exchange resin ใช้เฉพาะกับตัวยามีประจุ โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีประจุตรงกันข้ามกับตัวยาคจับตัวยาคไว้ เมื่อยาอยู่ในกระเพาะอาหารเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างยากับไอออนในกระเพาะอาหาร เช่น H^+ , Cl^- เป็นต้น ทำให้พอลิเมอร์ปลดปล่อยยาออกมา แต่ยาต้องเดินทางผ่านพอลิเมอร์เมทริกซ์ทำให้ปลดปล่อยยาออกมาได้ช้าลง

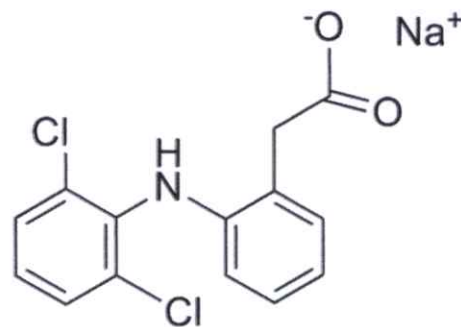
ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีตัวยาจากการกระจายตัวยาภายในเนื้อพอลิเมอร์ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์จะปลดปล่อยยาออกมาด้วยการละลายของยาอย่างช้า ๆ และการบวมตัวของพอลิเมอร์ ทำให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้ยาวนานขึ้น ซึ่งตัวยาที่ใช้ศึกษาคือ ยาไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

2.6 ยาไดโคลฟีแนค [101-102]

ยาไดโคลฟีแนคเป็นยาแก้ปวดในกลุ่มยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: NSAID) หรือที่เรียกกันว่า เอ็นเสด ช่วยในการบรรเทาอาการปวด บวม จากการอักเสบ ปวดตามข้อ ไขข้อกระดูก เช่น โรคข้อเสื่อม โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ปวดท้องจากประจำเดือน โรคข้ออักเสบ อาการตึงตัวของข้อ และรักษาอาการอักเสบภายหลังการบาดเจ็บหรือการผ่าตัด โดยตัวยาเข้าไปยับยั้งการสร้างสารโพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins) ในร่างกาย ซึ่งเป็นตัวก่อให้เกิดอาการบวมและอักเสบ ตัวยาถูกผลิตออกมาให้อยู่ในรูปแบบเกลือที่เรียกว่า Diclofenac Sodium และ Diclofenac Potassium โดย Diclofenac Potassium สามารถดูดซึมในร่างกายได้ไวกว่า จึงช่วยบรรเทาอาการปวดได้เร็วกว่า โดยตัวยาชนิดนี้มีการผลิตออกมาใช้และจำหน่ายอยู่ 2 รูปแบบหลัก ๆ ด้วยกัน คือ แบบเม็ด ขนาด 25 และ 50 มิลลิกรัม แบบฉีด และแบบเจลสำหรับทาภายนอก ขนาดยาไดโคลฟีแนคที่ใช้โดยทั่วไป คือ 75 ถึง 150 มิลลิกรัมต่อวัน โดยแบ่งให้วันละ 3 ครั้ง

- ยาเม็ด 25 มิลลิกรัม ครั้งละ 1-2 เม็ด วันละ 3 ครั้ง
- ยาเม็ด 50 มิลลิกรัม ครั้งละ 1 เม็ด วันละ 3 ครั้ง
- ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 75 มิลลิกรัม วันละครั้ง หรือเพิ่มเป็นวันละ 2 ครั้ง หากมีอาการรุนแรง

ผลข้างเคียงและข้อควรระวังในการใช้ยาไดโคลฟีแนค คือ อาจทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ ดังนั้นจึงควรใช้ยาหลังอาหารและไม่ควรใช้ยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน หรือควรใช้ยาเพื่อป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร



รูปที่ 2.25 โครงสร้างของไดโคลฟีแนค

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Suebpong, *et al.* (2012) [21] ศึกษาการเตรียมวัสดุประกอบจากแคลเซียมซิลิเกต/พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (CS/PET) โดยสังเคราะห์ผ่าน Ring-Opening polymerization (ROP) และใช้ Dibutyltin oxide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลการวิจัยพบว่าค่าความแข็งแรงกดอัดของวัสดุประกอบ CS/PET ที่ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 250 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน CS:PET เป็น 50:50 โดยน้ำหนัก มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ CS ที่ไม่มี PET โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 4.8 MPa เป็น 31.0 MPa และผลของการทดสอบในระบบจำลองสภาวะร่างกาย (*In vitro* test) เมื่อแช่ชิ้นงานในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค SEM และ XRD พบว่ามีการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวของวัสดุประกอบภายใน 7 วัน ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าวัสดุประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์/พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (HAp/PET) ที่ใช้เวลา 28 วัน ในการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ [22] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ CS เป็นส่วนประกอบนั้นมีความไวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์มากกว่าการใช้ HAp

Yan, *et al.* (2013) [7] ศึกษาการเตรียมวัสดุประกอบจากแคลเซียมซิลิเกต/ไซเตียมอัลจินเตต (CS/SA) โดยเตรียมเป็นไฮโดรเจลแบบฉีดยาเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งเตรียมโดยผสม CS 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ กับสารละลายอัลจินเตต และใช้วิธี Internal gelling โดยใช้ Ca^{2+} ที่ปลดปล่อยมาจาก CS หลังจากเติม D-gluconic acid δ -lactone (GDL) เป็นสารช่วยให้เกิดเจลของอัลจินเตต จากการทดลองพบว่าเวลาในการเกิดเจล ความแข็งแรงต่อการกดอัด และการบวมตัวของวัสดุประกอบสามารถควบคุมได้จากปริมาณ CS และ GDL โดยเวลาในการเกิดเจลลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ CS และ GDL เนื่องจากการเพิ่มปริมาณ Ca^{2+} ในระบบซึ่งช่วยให้อัลจินเตตเกิดเจลได้เร็วขึ้น และเมื่อทดสอบความแข็งแรงต่อการกดอัดพบว่ามีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ GDL แต่มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ CS และเมื่อพิจารณาการบวมตัวของชิ้นงานพบว่ามีความแข็งแรงลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ GDL เนื่องจากการเพิ่มปริมาณ GDL เป็นการเร่งการปลดปล่อย Ca^{2+} จาก CS ดังนั้นปริมาณ Ca^{2+} ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในระบบจึงมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเชื่อมโยงของอัลจินเตตเป็นเจลที่แข็งแรงมากขึ้น และเมื่อนำสูตร 5 เปอร์เซ็นต์ของ CS/SA ไปตรวจวัด SEM พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนมีค่าอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครเมตร การทดสอบในระบบจำลองสภาวะร่างกายในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และ SEM พบว่าการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนชิ้นงานขึ้น รวมถึงเมื่อทดสอบในสิ่งมีชีวิต (*In vivo* test) พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะ และเจริญเติบโตบนชิ้นงานได้ งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าวัสดุประกอบ CS/SA สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้

Cijun, *et al.* (2017) [20] ศึกษาการปรับปรุงโครงสร้างเซลล์ของ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ด้วยแคลเซียมซิลิเกต (CS) โดยขึ้นรูปด้วยเทคนิค Selective laser sintering (SLS) แล้วนำไปทดสอบสมบัติเชิงกล พบว่าค่าความแข็งแรงต่อการกดอัดของชิ้นงานมีค่ามากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ CS แต่ลดลงเมื่อปริมาณ CS มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (แต่ยังคงมากกว่าชิ้นงานที่มีเพียง PHBV เป็นองค์ประกอบ) และสำหรับการทดสอบ MTT พบว่าเซลล์ MG63 สามารถเจริญเติบโตได้ และมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation rate) ที่สูงกว่าชิ้นงานที่มีเพียง

PHBV และเมื่อทดสอบ XRD พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ CS ส่งผลให้ความเข้มของพีค CS เพิ่มขึ้น แต่ความเข้มของพีค PHBV ลดลง เนื่องจาก CS มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า PHBV ทำให้ขัดขวางการเกิดผลึกของ PHBV ซึ่งการที่ปริมาณผลึกของ PHBV ลดลงยังส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อพิจารณาผลการทดสอบในระบบจำลองสภาวะร่างกายในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยตรวจวัดด้วยเทคนิค SEM พบว่ามีผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น

Pitchaya. *et al.* (2014) [103] ศึกษาฟิล์มไฮโดรเจลจากไฮดรอกซีเอทิลอะคริลิก โคโตะซาน/อัลจินเนต (HC/SA) ที่เชื่อมโยงด้วย CaCl_2 เพื่อใช้ในทางทางการแพทย์ โดยเมื่อนำไปทดสอบ SEM-EDS เพื่อดูการกระจายตัว และปริมาณของ Ca^{2+} ในฟิล์ม พบว่า Ca^{2+} มีการกระจายตัวดี และปริมาณ Ca^{2+} ที่พบในฟิล์มเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย CaCl_2 และปริมาณ SA เนื่องจาก Ca^{2+} เชื่อมโยงเฉพาะ SA และเมื่อทดสอบการบวมตัวในน้ำกลั่น และ Phosphate buffer solution (PBS, pH=7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าฟิล์มมีการบวมตัวใน PBS ถึง 14 เท่า ซึ่งมากกว่าในน้ำกลั่นที่มีการบวมตัวเพียง 6 เท่า เนื่องจาก Ca^{2+} ที่เป็นสารเชื่อมโยงไอออนิกสามารถจับกับ PO_4^{3-} ใน PBS ได้ดีกว่า SA จึงทำให้ Ca^{2+} ที่จับกับ Carboxylate groups ของอัลจินเนตหลุดออก ส่งผลให้ฟิล์มเกิดการบวมตัวมากกว่าการแช่ในน้ำกลั่น

Hong-Ru และ Yu-jen (2014) [104] ศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์จากโซเดียมอัลจินเนต/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (SA/HAp) โดยเตรียมด้วยวิธีการแยกวัฏภาค (Phase separation) แล้วทำให้แห้งโดยผ่านกระบวนการ Freeze drying ซึ่งสารละลาย SA ถูกผสมกับ HAp ที่อัตราส่วน 100:0, 75:25 และ 50:50 โดยน้ำหนัก เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกล และสมบัติการยึดเกาะโครงสร้างของเซลล์ (Cell Attachment properties) รวมถึงศึกษาการปรับเปลี่ยนสารเชื่อมโยง คือ CaCl_2 , Ca-gluconate และ SrCl_2 จากการศึกษาชั้นฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการตรวจวัด SEM พบว่าชั้นฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับ การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิระหว่างการเตรียมซึ่งส่งผลโดยตรงต่ออัตราการเย็นตัว (Cooling rate) และเมื่อพิจารณาค่าความแข็งแรงกดอัด พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ HAp และมีค่าความแข็งแรงกดอัดของชิ้นงานไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่ออุณหภูมิในการแช่แข็งต่ำลง ยกเว้นในไนโตรเจนเหลว พบว่าค่าความแข็งแรงกดอัดมีค่าน้อยที่สุด และเมื่อทดสอบการบวมตัวของชิ้นงาน โดยนำชิ้นงานมาเชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร และแช่ในสารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution) ที่มีค่า pH 7.4 เป็นเวลา 21 วัน พบว่าทุกสูตรมีแนวโน้มของกราฟที่เหมือนกันคือน้ำหนักของชิ้นงานค่อย ๆ ลดลง และคงที่ในวันที่ 14 ถึง 21 นอกจากนี้เมื่อทดสอบสมบัติการยึดเกาะโครงสร้างของเซลล์ โดยใช้เซลล์ของ Rat osteosarcoma UMR106 พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตใน SA/HAp ที่อัตราส่วน 75:25 และ 50:50 ได้ดีกว่าที่อัตราส่วน 100:0 โดยน้ำหนัก งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์จาก SA/HAp สามารถใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้

Ryo. *et al.* (2010) [105] ศึกษาการเตรียมไฮโดรเจลจาก Kappa-carrageenan และ Lambda-carrageenan โดยการเชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 และทำให้แห้งโดยผ่านกระบวนการ Freeze drying แล้วหาความสามารถในการกักผลึกของอะพาไทต์โดยการตรวจวัดด้วย SEM-EDX พบว่าเมื่อแช่ตัวอย่างในสารละลาย SBF นานขึ้น ปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสเฟตเพิ่มขึ้น รวมถึงเมื่อทดสอบ XRD พบว่าความเข้มพีคของอะพาไทต์มีความเข้มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป นอกจากนี้

พบว่าชิ้นงานที่ทำจาก Lambda-carrageenan มีการก่อก้อนผลึกอะพาไทต์มากกว่าและเร็วกว่า Kappa-carrageenan และเมื่อทดสอบหาความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในชิ้นงาน โดยแช่ชิ้นงานในสารละลาย Tris-NaCl buffer พบว่า Lambda-carrageenan มีการปลดปล่อย Ca^{2+} ออกมามากกว่า Kappa-carrageenan จึงทำให้ Lambda-carrageenan มีโอกาสเกิดการก่อก้อนผลึกอะพาไทต์ในสารละลาย SBF มากกว่า Kappa-carrageenan รวมถึงเมื่อทดสอบการบวมตัวใน SBF พบว่า Lambda-carrageenan มีการบวมตัวมากกว่า Kappa-carrageenan

Jhamak. *et al.* (2017) [14] ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุประกอบไหมไฟโบรอิน/kappa-carrageenan (SF/K-CG) สำหรับใช้ในการฟื้นฟูกระดูก แล้วทำให้แห้งโดยผ่านกระบวนการ Freeze drying จากนั้นนำไปทดสอบขนาดรูพรุน เพอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุน และสมบัติเชิงกล พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ CG ทำให้ขนาดและเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนมีค่าเพิ่มขึ้น แต่สมบัติเชิงกลมีค่าลดลง และเมื่อนำไปทดสอบในระบบจำลองสภาวะร่างกายในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปทดสอบ SEM-EDS พบว่ามีธาตุแคลเซียมและฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งแสดงถึงแคลเซียมฟอสเฟต (CaP) ที่เกิดขึ้นในชิ้นงาน โดยพบว่าอัตราส่วนระหว่างอะตอมแคลเซียมและฟอสเฟตมีค่าอยู่ในช่วง 1.31 และ 2.05 ซึ่งแสดงถึงไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยสอดคล้องกับการทดสอบ XRD ที่ปรากฏพีคที่แสดงถึงการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ขึ้น และเมื่อตรวจวัด Alkaline phosphatase (ALP) และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell Proliferation) ของเซลล์ MG 63 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของคาร์ราจีแนน เซลล์สามารถยึดเกาะกับโครงเลี้ยงเซลล์ และสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์จาก SF/K-CG เหมาะสมสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ แต่อย่างไรก็ตามสมบัติเชิงกลยังไม่เหมาะสมสำหรับการใช้งาน

Yong. *et al.* (2011) [17] ศึกษาการเตรียมไฮโดรเจลแบบฉืดที่มีความว่องไวต่ออุณหภูมิจาก Kappa-carrageenan โดยการปรับปรุงหมู่ซัลโฟนิคของ Kappa-carrageenan ด้วย KCl และ $CaCl_2$ และศึกษาผลของการเกิดเจล และการก่อก้อนของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ของ Kappa-carrageenan ปรับปรุง พบว่าอุณหภูมิการเกิดเจลของสารละลาย Kappa-carrageenan เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ K^+ (เมื่อปริมาณ Ca^{2+} คงที่) ซึ่งมีผลมากกว่าการเพิ่มปริมาณของ Ca^{2+} (เมื่อปริมาณ K^+ คงที่) และเมื่อทดสอบในระบบจำลองสภาวะร่างกายเพื่อดูการก่อก้อนของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ พบว่าเมื่อแช่ชิ้นงาน Kappa-carrageenan ที่ปรับปรุงด้วย Ca^{2+} ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการก่อก้อนของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ขึ้น เนื่องจาก Kappa-carrageenan มีหมู่ซัลโฟนิคเป็นองค์ประกอบ รวมถึง Ca^{2+} ใน Kappa-carrageenan สามารถปลดปล่อยออกมาในระบบได้ จึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อก้อนของผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่พื้นผิวชิ้นงาน งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลจาก Kappa-carrageenan ที่ปรับปรุงด้วย K^+ และ Ca^{2+} อาจนำไปใช้งานแบบฉืดสำหรับการฟื้นฟูกระดูกที่เสียหาย

Laura. *et al.* (2014) [23] ศึกษาการปลดปล่อยยาโซเดียมไดโคลฟีแนคซึ่งเป็นยาต้านอักเสบชนิดไม่มีสเตียรอยด์จากโครงเลี้ยงเซลล์ Poly(D,L-Lactic Acid-co-Glycolic Acid) (PLGA)/Poly (Ethylene Glycol) (PEG) ในระบบจำลองสภาวะร่างกาย โดยโครงเลี้ยงเซลล์ถูกเตรียมจากอนุภาค PLGA และ PEG ที่ผสมในอัตราส่วน 93.5:6.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับโซเดียมไดโคลฟีแนคในอัตราส่วน 1:0.6 โดยน้ำหนัก และปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไดโคลฟีแนคในช่วง

300, 450, 650, 800 และ 1000 ไมโครกรัม จากนั้นทำให้แข็งตัวด้วยการให้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง การวิเคราะห์การปลดปล่อยยาเมื่อเวลาผ่านไปแสดงให้เห็นถึงรูปแบบการปลดปล่อยยาที่เหมาะสมสำหรับการรักษาอาการอักเสบเฉียบพลัน โดยพบว่ามีการปลดปล่อยยา 80 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 4 วันแรก ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของไดโคโลฟีแนคเปลี่ยนแปลงไปรูปแบบการปลดปล่อยยามีรูปแบบคล้ายเดิม โดยการปลดปล่อยยาถูกวัดด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ 267 นาโนเมตร และเมื่อนำไปตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไดโคโลฟีแนคเพิ่มขึ้นปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่รอดมีเปอร์เซ็นต์ลดลง และเมื่อพิจารณาผลของการผลิต PEG₂ (Prostaglandin E2) ซึ่งเป็น Prostaglandins ที่ผลิตโดยเซลล์สร้างกระดูกเพื่อตอบสนองต่อการอักเสบ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีตัวยาไดโคโลฟีแนคเป็นองค์ประกอบมีการผลิต PEG₂ ที่น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่มีไดโคโลฟีแนค งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์จาก PLGA/PEG ที่มียาไดโคโลฟีแนคเป็นองค์ประกอบมีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบในงานวิศวกรรมกระดูกได้

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าวัสดุอัลจิเนต คาร์ราจีแนน และแคลเซียมซิลิเกต มีความสามารถในการเข้ากันได้กับร่างกาย และสามารถเตรียมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้ นอกจากนี้แคลเซียมซิลิเกต และคาร์ราจีแนนยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้เมื่อแช่ในสารละลาย SBF ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบวัสดุคอมโพสิตที่เตรียมจากอัลจิเนตและคาร์ราจีแนน โดยผสมแคลเซียมซิลิเกตเพื่อเพิ่มความแข็งแรงและความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และนำมาเชื่อมโยงกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เพื่อเพิ่มความคงทนและความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีตัวยาไดโคโลฟีแนค เพื่อศึกษาพฤติกรรมของการปลดปล่อยของยาในสภาวะจำลองของเหลวในร่างกาย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (Ethanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
2. เตตระเอทิลออร์โธซิลิเกต (Tetraethyl orthosilicate, $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$), SIGMA-ALDRICH Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
4. แคลเซียมไนเตรตเตตระไฮเดรต (Calcium nitrate tetrahydrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
5. ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน (Tris(hydroxymethyl)aminomethane, $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
6. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (Magnesium chloride hexahydrate, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
7. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
8. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, KCl), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
9. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate, NaHCO_3), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
10. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
11. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid, HCl), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
12. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride, CaCl_2), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
13. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate, Na_2SO_4), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
14. คาร์ราจีแนน (E407) SS60-0001, CHAILUCKSIRI Co., Ltd.
15. โซเดียมอัลจีเนต (Sodium alginate, SA), Acros Organics Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
16. แอมโมเนียมคาร์บอเนต (Ammonium carbonate, NH_4HCO_3), CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์
17. โซเดียมไดโคลฟีแนค (Diclofenac Sodium Salt, $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NNaO}_2$), มวลโมเลกุล 318.13, SIGMA-ALDRICH Co., Ltd., เกรดวิเคราะห์

18. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol, $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) CARLO ERBA REAGENTS Co., Ltd.,
เกรตวิเคราะห

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องแก้ว
2. เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง, Denver Instrument Co., Ltd., รุ่น SI-234
3. เครื่องให้ความร้อน (Heater), IKA Co., Ltd., รุ่น HS-7
4. เครื่องทดสอบอเนกประสงค์ (Universal Testing Machine), LLOYD Instrument Co., Ltd., รุ่น LR-5K
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ, Thermo Fisher Scientific Co., Ltd., รุ่น Isotemp
6. เครื่องทดสอบ Fourier Transform Infrared Spectrometer, Perkin Elmer Co., Ltd., รุ่น FTIR Spectrum GX
7. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning Electron Microscopy (SEM), JEOL Co., Ltd., รุ่น EVO@MA10
8. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermostat)
9. เครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก (Mechanical stirrer)
10. เดซิเคเตอร์ (Desiccator)
11. โกร่งบดสาร (Mortar and Pestle)
12. ตะแกรงร่อนคัดขนาด (Sieve) 45 ไมครอน (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 ตะแกรงร่อนคัดขนาด

13. เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Caliper) แบบอนาล็อก
14. หม้อบด (Pot mill) เซรามิก ขนาดความจุ 0.5 กิโลกรัม (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 หม้อบดสาร

15. ลูกบดดินเผาเนื้ออะลูมินา (Alumina ceramic ball) ขนาด 5, 10, 15 และ 20 มิลลิเมตร
16. เครื่องกรองลดความดัน (Pressure reducer)
17. แม่พิมพ์ซิลิโคนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร และความสูง 2 เซนติเมตร (รูปที่

3.3)

18. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
19. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer), CoolSafe™ Co., Ltd., รุ่น Chamber CC5300
20. เครื่องแช่แข็ง, Liebherr Co., Ltd., รุ่น LGT 2325
21. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH measurement), Analytics Co., Ltd.
22. เครื่องวัดขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร (Particle size analyzer), Partica LA-950V2 Co., Ltd.
23. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer รุ่น BlueStar B spectrophotometer
24. เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffractometer, XRD), Bruker Technology Co., Ltd., รุ่น D8 Advance
25. เครื่องวัดหาปริมาณธาตุโดยใช้รังสีเอ็กซ์ (X-ray fluorescence spectrometer, XRF), Bruker Technology Co., Ltd., รุ่น SRS 3400
26. กระดาษกรองเบอร์ 42, Whatman Co., Ltd.
27. ชามระเหยสาร (Evaporating dish)
28. มีดผ่าตัด (Scalpel)
29. ขวดยาพลาสติก
30. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Bar)



รูปที่ 3.3 แม่พิมพ์ซิลิโคน

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลต่อลิตร

1. ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 36.75 กรัม
2. ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตร

3.3.2 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลต่อลิตร

1. ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 73.51 กรัม
2. ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตร

3.3.3 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลต่อลิตร

1. ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 110.26 กรัม
2. ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตร

3.3.4 สารละลาย SBF

1. เตรียมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก 300-400 รอบต่อนาที
2. ใส่สารเคมีในตารางที่ 3.1 ตามลำดับ ยกเว้นสารลำดับที่ 6 จะแบ่งใส่สารเพียง 30 มิลลิลิตร โดยระหว่างการผสมสารละลายต้องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช
3. เมื่อถึงสารลำดับที่ 9 ให้ใส่สารลงไปทีละนิด จนกระทั่งสารละลายมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 แล้วจึงเติมสารลำดับที่ 6 ที่เหลือลงไปเพื่อปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 7.3 (ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ควรมีค่าเกิน 7.5 เพราะจะทำให้สารละลายที่เตรียมได้เกิดการตกตะกอน) ทำเช่นนี้สลับกันจนกระทั่งสารตัวที่ 9 หมดลง จะได้สารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.4
4. จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายเป็น 2,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย SBF

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณสารที่ใช้
1. NaCl	15.992 กรัม
2. NaHCO ₃	0.7 กรัม
3. KCl	0.448 กรัม
4. K ₂ HPO ₄	0.2656 กรัม
5. MgCl ₂ • 6H ₂ O	0.5969 กรัม
6. 1 M HCl	80 มิลลิลิตร
7. CaCl ₂	0.556 กรัม
8. Na ₂ SO ₄	0.144 กรัม
9. (CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	12.116 กรัม

3.4 การสังเคราะห์สารประกอบแคลเซียมซิลิเกตด้วยวิธีการตกตะกอน [21]

1. เตรียมเตตระเอทิลออร์โทซิลิเกต (TEOS) ปริมาณ 20.84 กรัม และแคลเซียมไนเตรด-เตตระไฮเดรตปริมาณ 23.78 กรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตร พร้อมทำการปั่นกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในบีกเกอร์พลาสติก
2. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.33 โมลต่อลิตร โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.94 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เมื่อครบ 2 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 12.5

3. จากนั้นหยุดปั่นกวน และทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารผสมตกตะกอน เมื่อครบ 30 นาที กรองสารละลายด้วยเครื่องกรองลดความดัน และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร
4. จากนั้นนำตะกอนที่เตรียมได้ใส่ในหม้อบดสาร และใส่เอทานอลเข้าไปเล็กน้อย บดให้ละเอียดด้วยหม้อบดสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เม็ดเซรามิกที่ใช้บดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 และ 20 มิลลิเมตร อย่างละ 30 ลูก และขนาด 5 และ 10 มิลลิเมตร อย่างละ 40 ลูก)
5. นำสารที่บดได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ชั่งน้ำหนัก และหาเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลอง
7. บดสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่เตรียมได้ให้ละเอียดด้วยโม่บดสารอีกครั้ง แล้วนำไปคัดขนาดอนุภาคสารด้วยตะแกรงร่อนคัดขนาด 45 ไมครอน

3.5 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจินต คาร์ราจีแนน และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต

1. กระจายตัวสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตปริมาณ 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พร้อมปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก จากนั้นเติมคาร์ราจีแนนปริมาณ 2 กรัม รอจนกระทั่งคาร์ราจีแนนละลายจนหมด แล้วจึงเติมโซเดียมอัลจินตปริมาณ 2 กรัม จากนั้นปั่นกวนต่อเป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง
2. เทสารผสมลงในแม่พิมพ์รูปทรงกระบอกให้มีน้ำหนักเท่ากับ 25 กรัม
3. รอให้สารผสมเซตเจลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
4. นำชิ้นงานใส่ถาด แล้วนำไปเข้าเครื่อง Freeze-dryer ที่อุณหภูมิ -110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน เพื่อทำให้ชิ้นงานแห้ง โดยการกำจัดน้ำด้วยกระบวนการระเหิดและทำให้เกิดรูพรุนบนชิ้นงาน ภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ จากนั้นเก็บชิ้นงานที่ได้ไว้ในเดซิเคเตอร์ความชื้นสัมพัทธ์ 5 ± 5 เปอร์เซ็นต์

3.6 การเชื่อมโยงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์

1. ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ขนาด $1\times 1\times 1$ ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้ววัดขนาดด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ จากนั้นนำไปเชื่อมโยงด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที ตามตารางที่ 3.2 (ในกรณีสูตร SC-0.5-60/1.5-60 ให้แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงนำมาแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1.5 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 60 นาที)
2. ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
3. จากนั้นแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในตู้แช่แข็งเป็นเวลาประมาณ 1 วัน ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส
4. นำไปเข้าเครื่อง Freeze-dryer ที่อุณหภูมิ -110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง (ขึ้นกับจำนวนโครงเลี้ยงเซลล์)
5. จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ความชื้นสัมพัทธ์ 5 ± 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรอการทดสอบ

ตารางที่ 3.2 สูตรการเชื่อมโยงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์

ลำดับ	สูตร	ความเข้มข้น CaCl ₂ (M)			เวลาการเชื่อมโยง (นาที)
		0.5	1.0	1.5	
1	SC-0.5-30	✓	-	-	30
2	SC-0.5-60				60
3	SC-0.5-120				120
4	SC-1.0-30	-	✓	-	30
5	SC-1.0-60				60
6	SC-1.0-120				120
7	SC-1.5-30	-	-	✓	30
8	SC-1.5-60				60
9	SC-1.5-120				120
10	SC-0.5-60/1.5-60	✓	-	✓	120
11	S-1.5-120	-	-	✓	120

หมายเหตุ : S = โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold)
 C = สารประกอบแคลเซียมซิลิเกต (Calcium silicate)
 0.5, 1.0, 1.5 = ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (โมลต่อลิตร)
 30, 60, 120 = เวลาที่ใช้ในการเชื่อมโยง (นาที)

3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์

3.7.1 ขนาดอนุภาคของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการตรวจวัดด้วยเทคนิค Dynamic light scattering

นำสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ผ่านการคัดขนาดด้วยตะแกรงร้อนมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยโดยใช้สารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.25 โมลต่อลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมกับสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต 0.2 กรัม แล้วนำไปปั่นกวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering เพื่อวัดขนาดและการกระจายของอนุภาค

3.7.2 ขนาดอนุภาคของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการตรวจวัดด้วยเทคนิค SEM

นำสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ผ่านการคัดขนาดด้วยตะแกรงร้อนมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำอนุภาคมากระจายในแผ่นคาร์บอน แล้วนำไปเคลือบด้วยทองคำ จากนั้นวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค SEM

3.7.3 วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค FT-IR

นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR เพื่อยืนยันพีคของหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตโดยใช้โหมด Transmittance ที่เลขคลื่น 4000 ถึง 400 cm⁻¹

3.7.4 วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค X-Ray fluorescence spectrometry (XRF)

นำสารที่สังเคราะห์ได้ทดสอบด้วยเทคนิค XRF เพื่อวิเคราะห์หาธาตุ และปริมาณธาตุในสารตัวอย่าง

3.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

3.8.1 ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์

1. ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีขนาด $1 \times 1 \times 1$ ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้ววัดขนาดด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์
2. ชั่งน้ำหนักชิ้นงานด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกผล
3. คำนวณหาความหนาแน่นตามสมการที่ 3.1

$$D = \frac{M}{V} \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

โดยที่ D = ความหนาแน่นของชิ้นงาน (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

M = น้ำหนักของชิ้นงาน (กรัม)

V = ปริมาตรของชิ้นงาน (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

3.8.2 เปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์

1. ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ขนาด $1 \times 1 \times 1$ ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้ววัดขนาดด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ จากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง กำหนดเป็น W_1
2. แช่โครงเลี้ยงเซลล์ลงในไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที (จนไม่สังเกตเห็นฟองอากาศ) แล้วทำการชั่งน้ำหนัก กำหนดเป็น W_2
3. จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ออกจากไอโซโพรพานอล แล้วบันทึกน้ำหนักของไอโซโพรพานอลหลังแช่โครงเลี้ยงเซลล์ กำหนดเป็น W_3
4. ทำการทดลองข้างต้น 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์
5. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ ตามสมการที่ 3.2

$$\% \text{Porosity} = \frac{W_2 - W_1 - W_3}{W_2 - W_3} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.2}$$

โดยที่ W_1 = น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ และไอโซโพรพานอล (กรัม)

W_3 = น้ำหนักของไอโซโพรพานอลคงเหลือหลังจากนำโครงเลี้ยงเซลล์ออกจากไอโซโพรพานอล (กรัม)

3.8.3 การกระจายตัวของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต และสารเชื่อมโยงในโครงเลี้ยงเซลล์

นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเชื่อมโยงมาตัดภาคตัดขวางภายใต้ไมโครเจนเทลว จากนั้นนำไปทดสอบด้วยเทคนิค SEM-EDS เพื่อดูการกระจายตัวของซิลิเกต และแคลเซียมบริเวณกึ่งกลางและขอบของโครงเลี้ยงเซลล์

3.8.4 วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค FT-IR

นำพอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR เพื่อตรวจหาหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างโดยใช้โหมด Transmittance ที่เลขคลื่น 4000 ถึง 400 cm^{-1}

3.9 การทดสอบหาค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ (%Water content, %WC)

1. ชั่งน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์หลังเชื่อมโยง (W_0) ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. เตรียมน้ำกลั่น และสารละลาย SBF 30 มิลลิลิตร ในขวดยาพลาสติก จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในขวดยาพลาสติก
4. เมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วันแล้ว ให้นำโครงเลี้ยงเซลล์มาซับน้ำส่วนเกินออก และชั่งน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ (W_5) ทำซ้ำข้อ 4 ทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน
5. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การบวมตัวจากสมการที่ 3.3

$$\%WC = \frac{W_5 - W_0}{W_5} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.3}$$

โดยที่ W_0 = น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลาย (กรัม)
 W_5 = น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลาย (กรัม)

3.10 การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร (%Volume change, %VC)

1. คำนวณปริมาตรโครงเลี้ยงเซลล์หลังเชื่อมโยงเป็น V_0 แล้วนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในสารละลาย SBF ตามข้อ 3.9
2. นำโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากซับน้ำส่วนเกินออกจากข้อ 3.9 มาทำการวัดขนาดเพื่อหาปริมาตรเป็น V_5 จากนั้นนำมาคำนวณดังสมการที่ 3.4

$$\%VC = \frac{V_5 - V_0}{V_0} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.4}$$

โดยที่ V_0 = ปริมาตรโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลาย (ลูกบาศก์เซนติเมตร)
 V_5 = ปริมาตรโครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลาย (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

3.11 การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือ (%Solid remain, %SR)

1. จากข้อ 3.9 เมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชิ้นครบ 28 วัน แล้วให้นำโครงเลี้ยงเซลล์มาแช่ในตู้แช่แข็งเป็นเวลาประมาณ 1 วัน ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Freeze-dryer ที่อุณหภูมิ -110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ (W_d)
2. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์จากสมการที่ 3.5

$$\%SR = \frac{W_d}{W_o} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.5}$$

โดยที่ W_o = น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลาย (กรัม)
 W_d = น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์แห้งหลังแช่ในสารละลาย (กรัม)

3.12 การหาเปอร์เซ็นต์การเสียสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ (%Degradation)

1. จากข้อ 3.9 เมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชิ้นครบ 28 วัน แล้วให้นำโครงเลี้ยงเซลล์มาแช่ในตู้แช่แข็งเป็นเวลาประมาณ 1 วัน ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Freeze-dryer ที่อุณหภูมิ -110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ (W_d)
2. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเสียสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์จากสมการที่ 3.6

$$\%Degradation = \frac{W_o - W_d}{W_o} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.6}$$

โดยที่ W_o = น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลาย (กรัม)
 W_d = น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์แห้งหลังแช่ในสารละลาย (กรัม)

3.13 การศึกษาสมบัติความว่องไวทางชีวภาพของสารประกอบแคลเซียมซิติเกตในการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์

1. ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีขนาด $1 \times 1 \times 1$ ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้ววัดขนาดด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์
2. ชั่งน้ำหนักชิ้นงานด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกผล
3. แช่โครงเลี้ยงเซลล์ในขวดยาพลาสติกที่มีสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน
4. ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในตู้แช่แข็งเป็นเวลาประมาณ 1 วัน ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

5. นำไปเข้าเครื่อง Freeze-dryer ที่อุณหภูมิ -110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบ FTIR, XRD และ SEM- EDS

3.13.1 วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค FT-IR

นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR เพื่อตรวจหาหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของสารโดยใช้โหมด Transmittance ที่เลขคลื่น 4000 ถึง 400 cm^{-1}

3.13.2 การทดสอบ SEM-EDS

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเคลือบด้วยทองคำ และวิเคราะห์การกระจายตัวของธาตุในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค EDS

3.13.3 การทดสอบ XRD

นำโครงเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยเครื่อง XRD โดยสแกนที่ช่วง 2θ เท่ากับ 20 ถึง 60 เพื่อยืนยันพีคของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลาย SBF

3.14 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับทดสอบแรงกดอัด

1. เลือกสูตรที่ดีที่สุดจากการทดสอบเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เริ่มต้น เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เปอร์เซ็นต์การเสียดสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ และ เปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือมาทดสอบแรงกดอัดเพื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่มีสารประกอบแคลเซียม-ซิลิเกต

2. เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เป็นรูปทรงกระบอก สำหรับใช้ทดสอบแรงกดอัดในสภาวะเปียก (Wet condition) และแห้ง (Dry condition) (สภาวะเปียกสามารถเตรียมได้โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทดสอบ) จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปทดสอบแรงกดอัด

3.14.1 การทดสอบแรงกดอัด (Compressive test)

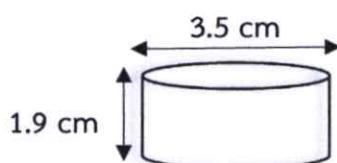
ทดสอบแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยเครื่องทดสอบอเนกประสงค์ที่มีสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.5 เซนติเมตร และความสูงประมาณ 1.9 เซนติเมตร (เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้แม่พิมพ์รูปทรงกระบอก แล้วทำการตัดแต่งให้โครงเลี้ยงเซลล์มีพื้นผิวเรียบในบริเวณหน้าตัดทั้งสองด้าน)

อัตราเร็วในการกดอัด 1 มิลลิเมตร/นาที

Load cell 1 กิโลนิวตัน

จำนวนโครงเลี้ยงเซลล์ 5 ชิ้น



รูปที่ 3.4 โครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงกระบอก

ค่าความแข็งแรงกดอัด และค่ามอดุลัสกดอัด สามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ความแข็งแรงกดอัด} = \frac{F}{A} \quad \text{สมการที่ 3.7}$$

$$\text{ค่ามอดุลัสกดอัด} = \frac{\text{ความเค้น (Stress)}}{\text{ความเครียด (Strain)}} \quad \text{สมการที่ 3.8}$$

โดยที่ F = แรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของความสูงเดิม (นิวตัน)

A = พื้นที่หน้าตัดของโครงเลี้ยงเซลล์ (ตารางเซนติเมตร)

3.15 การศึกษาพฤติกรรมการปลดปล่อยตัวยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

- การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

1. เตรียมสารละลายไดโคลฟีแนคในสารละลาย SBF ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ
2. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร
3. พล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไดโคลฟีแนคและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไดโคลฟีแนค

- การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไดโคลฟีแนคทั้งหมดที่ถูกปลดปล่อยจากโครงเลี้ยงเซลล์

1. โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีตัวยาไดโคลฟีแนคสามารถเตรียมได้จากการละลายตัวยาไดโคลฟีแนค 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แทนการใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ สูตร SC-1.5-120
2. หลังจากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์จำนวน 1 ชิ้น แช่ในสารละลาย SBF ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วทำการบดให้ละเอียด จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ให้แรงเขย่าเล็กน้อย) แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3500 รอบ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เก็บสารละลายปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของไดโคลฟีแนคที่ปลดปล่อยจากโครงเลี้ยงเซลล์มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นทั้งหมดของยาที่ปลดปล่อยออกมา

- การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไดโคลฟีแนคที่ถูกปลดปล่อยจากโครงเลี้ยงเซลล์

1. นำโครงเลี้ยงเซลล์จำนวน 4 ชิ้น แช่ในสารละลาย SBF ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C (ให้แรงเขย่าเล็กน้อย)
2. เก็บสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.4 มิลลิลิตรที่ 15, 30 และ 45 นาที จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง ที่ 1-4 ชั่วโมง และที่ 6, 8, 12, 16, 20 ชั่วโมง รวมถึงทุก ๆ 1 วัน ตั้งแต่วันที่ 1-7 และทุก ๆ 2 วัน ตั้งแต่วันที่ 9-17 (เติมสารละลาย SBF ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร แทนที่สารละลายตัวอย่างที่เก็บมา) แล้วปรับปริมาตรเป็น 4 มิลลิลิตร

3. จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของโดโคลฟีแนคที่ปลดปล่อยจากโครงเลี้ยงเซลล์มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของยาที่ปลดปล่อยออกมา

3.16 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay

1. เตรียมเซลล์ไลน์ Vero ในอาหาร DMEM เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
2. เตรียม Stock สารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อ หุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil) เพื่อป้องกันแสง
3. เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นสูงสุด 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (กรณีโครงเลี้ยงเซลล์ละลายหมด) ในสารละลาย PBS
4. ปลุกเซลล์ไลน์ Vero จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำงานเพาะเลี้ยงที่ปลุกเซลล์แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะเจริญเติบโตบริเวณก้นหลุม
5. นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้บ่ม จากนั้นดูดอาหารออกจากหลุมให้หมด แล้วเติมสารตัวอย่างความเข้มข้นที่กำหนด (กลุ่มควบคุมเป็นเซลล์ปกติ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เมื่อบ่มเซลล์ในสารตัวอย่างครบ 24 ชั่วโมง ให้ดูดสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุมที่ทดสอบ โดยใส่ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลาย MTT จะเข้าไปในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และถูกรีดิวซ์ให้อยู่ในรูปของผลึกฟอร์มาซาน ซึ่งเป็นผลึกสีม่วงไม่ละลายน้ำ
7. จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย DMSO:10% SDS อัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน จะได้สารละลายสีม่วง
8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครโตรีเตอร์ เพลท รีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร
9. คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ Cytotoxicity ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้

$$\% \text{Cytotoxicity} = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.9}$$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

10. ถ้าเปอร์เซ็นต์ Cytotoxicity มีค่าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่าชิ้นงานตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ถ้าเปอร์เซ็นต์ Cytotoxicity มีค่าสูงเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่าชิ้นงานตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

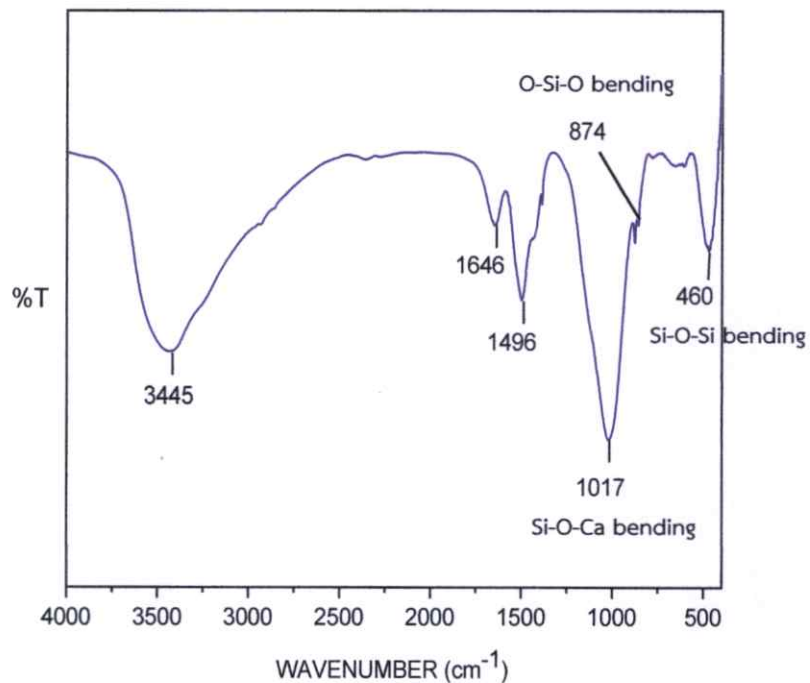
งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจิเนต คาร์ราจีแนน และแคลเซียมซิลิเกตเพื่อเพิ่มความแข็งแรงและความสามารถในการเหนียวนำการเกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยทำให้เกิดเป็นรูพรุนด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และนำมาเชื่อมโยงโครงสร้างด้วยสารละลาย CaCl_2 เพื่อเพิ่มความคงทนและความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยศึกษาที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ 30, 60 และ 120 นาที จากนั้นนำมาทดสอบสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ และการกระจายตัวของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตและสารเชื่อมโยง เป็นต้น ศึกษาการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ภายใต้สารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ และสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นอกจากนี้ยังศึกษาเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือ และเปอร์เซ็นต์การเสียดสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ รวมถึงศึกษาความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ พฤติกรรมการปลดปล่อยยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้ไดโพลพีแนคเป็นยาต้นแบบ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งรายละเอียดแสดงดังหัวข้อต่อไป

4.1 การตรวจวิเคราะห์ของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์

จากการสังเคราะห์สารประกอบแคลเซียมซิลิเกตด้วยวิธีการตกตะกอนทางเคมี แล้วนำมาตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR และ XRF พบว่าสเปกตรัม FTIR และเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุจากสารที่ได้จากการสังเคราะห์ประกอบด้วยธาตุและหมู่ฟังก์ชันหลักเช่นเดียวกับแคลเซียมซิลิเกต โดยสเปกตรัม FTIR ในรูปที่ 4.1 พบพีคการสั่นที่ 460 cm^{-1} , 874 cm^{-1} , 1017 cm^{-1} เป็นสัญญาณการสั่นของ Si-O-Si bending, O-Si-O bending และ Si-O-Ca bending ตามลำดับ [106] ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต และผลการทดสอบ XRF (ภาคผนวกตารางที่ ก-1) พบสัดส่วนของธาตุแคลเซียม ซิลิกอน และออกซิเจนเท่ากับ 31, 26 และ 43 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนโดยโมลของ Ca/Si ใกล้เคียง 1 ซึ่งสอดคล้องกับค่าทางทฤษฎีของแคลเซียมซิลิเกต [21]

สารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์ เมื่อนำมาบดด้วยหม้อบดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดด้วยโกร้งบดสาร และคัดขนาดด้วยตะแกรงร่อน 325 เมช หรือ 45 ไมครอน แล้วนำมาตรวจวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค Dynamic light scattering พบว่าขนาดอนุภาคมีค่าอยู่ระหว่าง 6-679 ไมครอน และขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ที่ 55 ไมครอน ซึ่งเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคที่ได้มีค่าในช่วงที่กว้าง และมีบางส่วนที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าเมชของตะแกรงร่อน ซึ่งอาจเกิดจากอนุภาคของสารที่สังเคราะห์ได้บางอนุภาคมีรูปร่างเป็นทรงยาว ทำให้สามารถผ่านตะแกรงร่อนได้ และในระหว่างการจัดเก็บสารก่อนนำมาวัดขนาดอาจมีความชื้นทำให้อนุภาคเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ (Agglomerate) รวมถึงในการเตรียมสารแขวนลอยเพื่อใช้ทดสอบในเทคนิค Dynamic light scattering อาจเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคได้ โดยรูปร่าง

และขนาดของสารที่สังเคราะห์ได้สามารถยืนยันได้จากภาพ SEM ดังภาคผนวกที่ ก-1 โดยพบว่ามีรูปร่างเป็นทรงยาวและมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าค่าที่วัดได้จากเทคนิค Dynamic light scattering

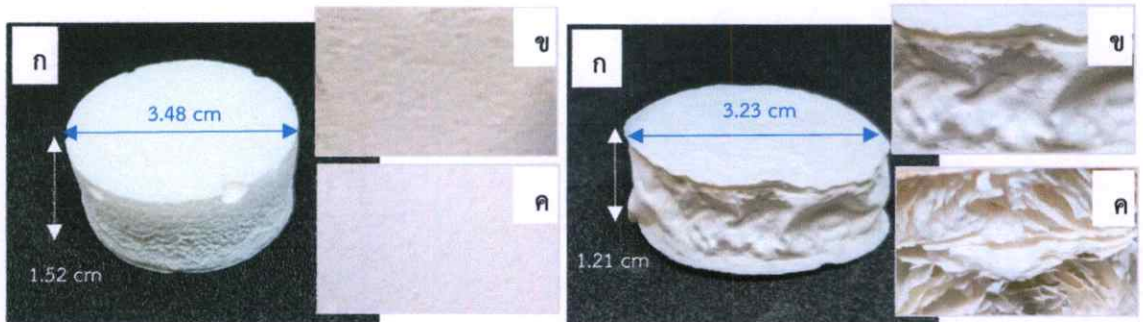


รูปที่ 4.1 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์

4.2 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์

ในขั้นตอนการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ ได้เริ่มต้นศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจินต เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่มาจากธรรมชาติ และมีการใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ผสมกับสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่มีความว่องไวในการก่อผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [21, 22] โดยทำการปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก พบว่าอนุภาคแคลเซียมซิลิเกตเกิดการนอนกันด้านล่าง บีกเกอร์เมื่อหยุดการปั่นกวน ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำมาเตรียมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ จึงเพิ่มสารที่ทำให้เกิดเจลคือ คาร์ราจีแนนเพื่อช่วยพยุงอนุภาคแคลเซียมซิลิเกต เนื่องจากคาร์ราจีแนนมีความสามารถในการเกิดเจลที่อุณหภูมิห้อง และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ [14, 15, 17, 18] จึงช่วยทำให้สารผสมเกิดการคงรูปเป็นเจลได้ก่อนที่อนุภาคแคลเซียมซิลิเกตจะเกิดการนอนกัน โดยจากการทดลองพบว่าคาร์ราจีแนนสามารถเกิดเจลได้ที่ 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร จึงนำมาผสมกับอัลจินตโดยปรับเปลี่ยนปริมาณอัลจินตเป็น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งพบว่าที่อัตราส่วน 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร เหมาะสมที่สุดในกระบวนการผสม (รูปที่ 4.2 (1)) เนื่องจากที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ระบบมีความหนืดที่ไม่เพียงพอและที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ระบบมีความหนืดมากเกินไป ทำให้ยากต่อการผสมและการละลายของสาร และในกรณีของสารผสมคาร์ราจีแนนผสมกับสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต (รูปที่ 4.2 (2)) ในปริมาณเนื้อสารที่เท่ากัน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีรูปร่างบิดเบี้ยวและหดตัว ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการใช้งาน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่เตรียมจากอัลจินต และคาร์ราจีแนน (รูปที่ 4.2 (3)) พบว่าการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละครั้งไม่มีความเสถียร เนื่องจาก

คาร์ราจีแนนมีสมบัติขึ้นรูปเป็นเจลที่อุณหภูมิห้องได้ ทำให้ในกระบวนการแช่แข็งโครงสร้างของคาร์ราจีแนนยังเกิดการหดตัวส่งผลให้อัลจิเนตเกิดการแยกชั้นออกมา ดังนั้นเมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงเห็นโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะตัน และมีการแยกชั้น รวมถึงอาจเกิดจากระบบของกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งอาจมีความดันไม่เพียงพอ (กรณีที่ใส่ชิ้นงานเป็นจำนวนมาก) ส่งผลให้การระเหิดของผลึกน้ำแข็งมีประสิทธิภาพต่ำ จึงอาจเกิดการละลายออกของผลึกน้ำแข็งและอัลจิเนต ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่เตรียมจากอัลจิเนต คาร์ราจีแนน และสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตเหมาะสมที่สุดในการศึกษา



(1) โครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจิเนต คาร์ราจีแนน และแคลเซียมซิลิเกต

(2) โครงเลี้ยงเซลล์จากคาร์ราจีแนน และแคลเซียมซิลิเกต



(3) โครงเลี้ยงเซลล์จากอัลจิเนต และคาร์ราจีแนน

รูปที่ 4.2 ตัวอย่างลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ (ก) ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ (ข) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ และ (ค) ภาควัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์

เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไม่มีความต้านทานต่อสารละลาย SBF และความแข็งแรงไม่เพียงพอ จึงนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้มาเชื่อมโยงด้วยสายละลาย CaCl_2 ซึ่งเป็นสารที่มีประจุบวกไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และสามารถเชื่อมโยงได้ทั้งอัลจิเนตและคาร์ราจีแนนซึ่งมีประจุลบ รวมถึงสามารถเกิดโครงสร้างของเจลที่มีลักษณะคล้ายกล่องไข่ได้เมื่อเชื่อมโยงกับอัลจิเนต [84] ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรง โดยในการศึกษาได้ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลาย CaCl_2 ที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลต่อลิตร และระยะเวลาในการเชื่อมโยงเป็น 30, 60 และ 120 นาที เพื่อหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการเชื่อมโยงโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความต้านทานต่อสารละลาย SBF ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อที่ 4.4

4.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

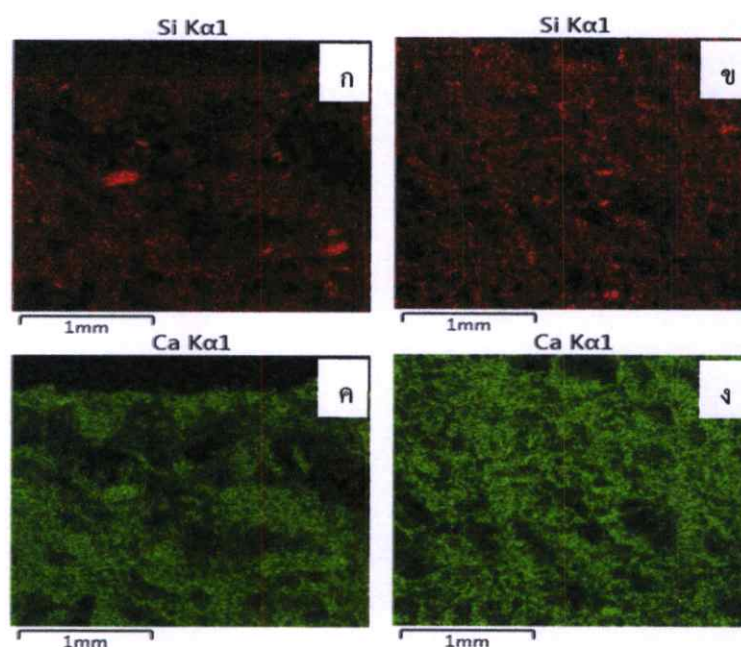
จากการทดสอบพบว่าความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าอยู่ในช่วง 0.1099-0.1844 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยเมื่อความเข้มข้นของสารเชื่อมโยงเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารเชื่อมโยง CaCl_2 เป็นการเพิ่มปริมาณไอออนของ Ca^{2+} ทำให้เพิ่มโอกาสที่สายโซ่ของพอลิเมอร์เกิดการเชื่อมโยงกันมากขึ้น ส่งผลให้ความหนาแน่นในการเชื่อมโยงมากขึ้น ซึ่งทำให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการหดตัว โดยสังเกตเห็นได้จากปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าลดลงเมื่อทำการเชื่อมโยง (แสดงดังภาคผนวกตารางที่ ข-2) การทดสอบด้วยเทคนิค SEM-EDS เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของธาตุ Ca ผลแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารเชื่อมโยง CaCl_2 มากขึ้น และระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย CaCl_2 ที่นานขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น CaCl_2 1.5 โมลต่อลิตร เปอร์เซ็นต์ของธาตุ Ca ที่ตรวจวัดได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งอนุมานได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการเชื่อมโยงกับไอออน Ca^{2+} เพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาสัดส่วนธาตุของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 150 เท่า แสดงดังภาคผนวกรูปที่ ข 1-11 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นรูพรุนต่อเนื่องไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเมื่อทำการวัดเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนพบว่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดลดลงเมื่อทำการเชื่อมโยง และมีแนวโน้มค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาและความเข้มข้นของสารเชื่อมโยงมากขึ้น แสดงดังภาคผนวกตารางที่ ข-3

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ของธาตุแคลเซียม และซิลิกอนในโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ

สูตร	ธาตุ (%โดยน้ำหนัก)			
	Ca		Si	
	กลางชิ้นงาน	ขอบชิ้นงาน	กลางชิ้นงาน	ขอบชิ้นงาน
SC-0.5-30	10.00	11.30	3.67	3.86
SC-0.5-60	13.02	13.10	3.47	3.95
SC-0.5-120	14.56	13.76	4.09	3.96
SC-1.0-30	13.60	13.75	2.85	3.60
SC-1.0-60	14.10	13.71	2.87	3.30
SC-1.0-120	13.44	12.11	3.16	3.20
SC-1.5-30	15.30	14.47	2.79	2.97
SC-1.5-60	16.94	16.57	3.16	3.30
SC-1.5-120	18.33	17.69	2.99	3.19
SC-0.5-60/1.5-60	16.99	16.10	2.55	3.08

เมื่อตรวจวัดการกระจายตัวของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต และสารเชื่อมโยงด้วยเทคนิค SEM-EDS ที่กำลังขยาย 500 เท่า โดยทำการตรวจวัดธาตุซิลิกอน (Si) เพื่อดูการกระจายตัวของ

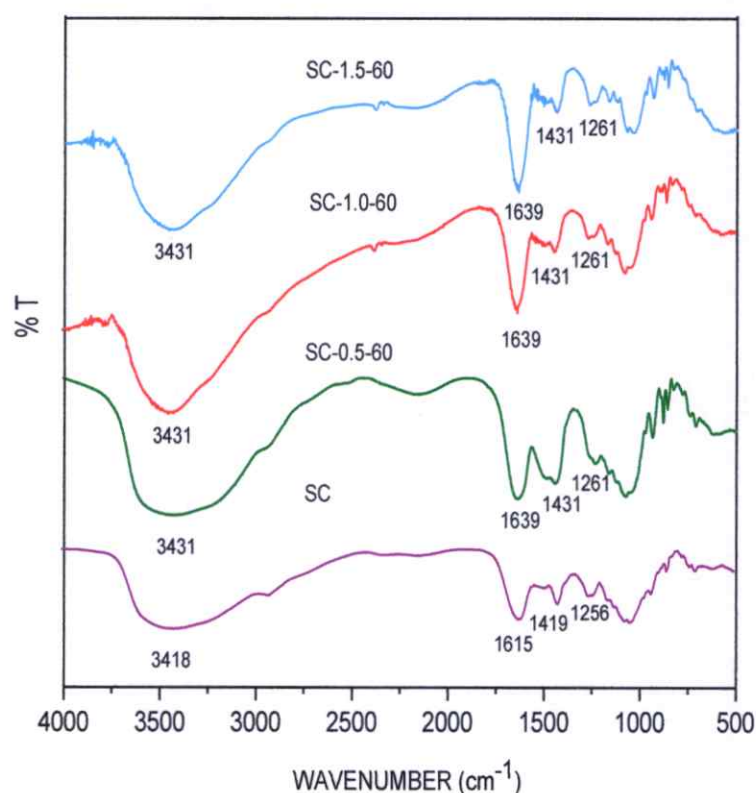
สารประกอบแคลเซียมซิลิเกต และตรวจวัดธาตุแคลเซียม (Ca) เพื่อดูการกระจายตัวของสารเชื่อมโยง CaCl_2 (เนื่องจากสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตและสารเชื่อมโยงมีองค์ประกอบของธาตุ Ca เหมือนกัน จึงทำให้ยากต่อการวิเคราะห์การกระจายตัว ดังนั้นจึงต้องดูการกระจายตัวของธาตุ Si ร่วมด้วย) โดยแสดงดังรูปที่ 4.3 และภาคผนวกรูปที่ ข 12-21 ซึ่งแสดงภาคตัดขวางบริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยจุดสีแดงแสดงถึงธาตุ Si (ธาตุในองค์ประกอบของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต) และจุดสีเขียวแสดงถึงธาตุ Ca (ธาตุในองค์ประกอบของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต และสารเชื่อมโยง CaCl_2) และพื้นผิวสีดำแสดงถึงวัฏภาคของพอลิเมอร์อัลจินต และคาร์ราจีแนน จากรูปพบว่าธาตุ Si มีการกระจายตัวทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ แต่มีบางสูตรที่มีการเกาะกลุ่มกันเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ (SC-0.5-120, SC-1.0-120, SC-1.5-120) ซึ่งอาจเกิดจากการรวมกลุ่มกันของอนุภาคในขั้นตอนการผสม เนื่องจากระบบมีความหนืดมาก และเมื่อพิจารณาธาตุ Ca พบว่ามีการกระจายตัวอย่างหนาแน่นทั่วพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ที่ตรวจวัดทั้งบริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ รวมถึงเมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ของธาตุ Ca ในบริเวณกึ่งกลาง และบริเวณขอบของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ตรวจวัดได้ (ตารางที่ 4.1) มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ จึงอาจกล่าวได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรมีการเชื่อมโยงกันอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์



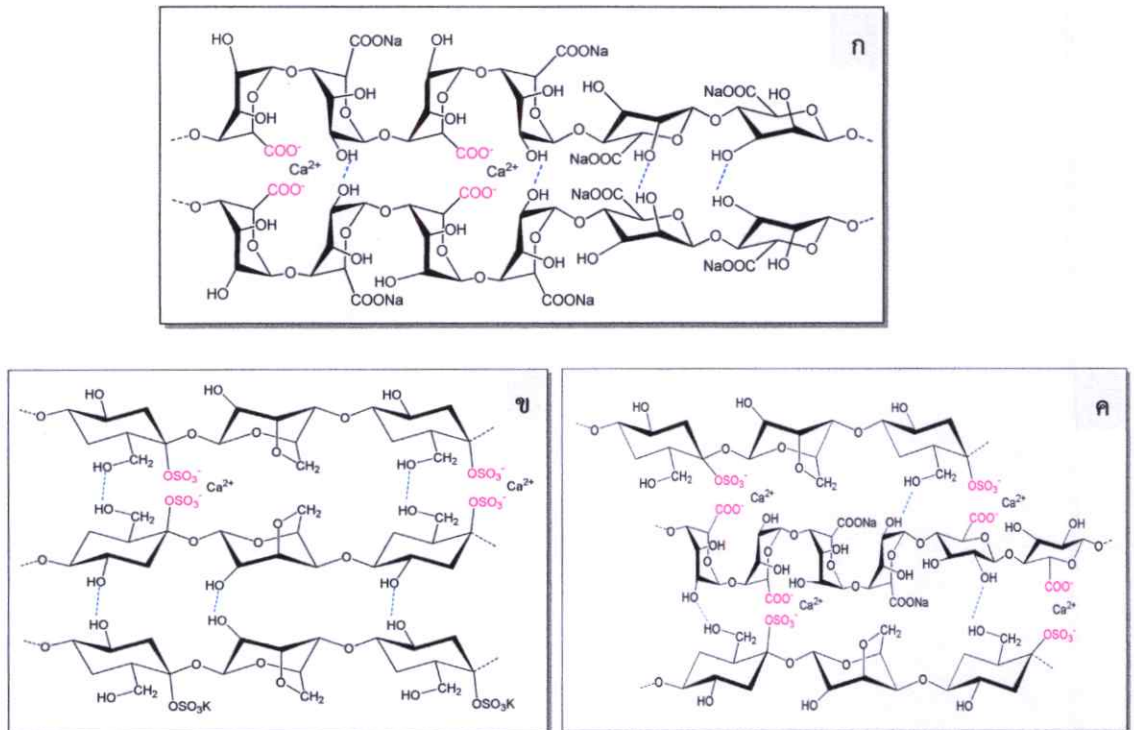
รูปที่ 4.3 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ

และเมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของพีคเมื่อเกิดการเชื่อมโยง และการเพิ่มความเข้มข้นของสารเชื่อมโยง CaCl_2 โดยทำการเปรียบเทียบ FTIR สเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC (โครงเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการเชื่อมโยง) กับ SC-0.5-60, SC-1.0-60 และ SC-1.5-60 ดังรูปที่ 4.4 (เลือกตัวแทนสูตรที่ความเข้มข้นสารเชื่อมโยงต่างกัน แต่เวลาในการเชื่อมโยงเท่ากันสำหรับการศึกษา) พบว่าสัญญาณพีคการสั่นของ $-\text{COO}^-$ asymmetric stretching และ $-\text{COO}^-$ symmetric stretching ของอัลจินตเลื่อนตำแหน่งไปที่เลขคลื่น (Wavenumber) ที่

เพิ่มขึ้น เมื่อทำการเชื่อมโยง โดยเลื่อนจากสัญญาณพีคประมาณ 1615 cm^{-1} และ 1419 cm^{-1} ไปเป็น 1639 และ 1431 cm^{-1} เช่นเดียวกับสัญญาณพีคการสั่นของ S=O stretching ของคาร์ราจีแนนที่เลื่อนไปที่เลขคลื่นที่เพิ่มขึ้น โดยเลื่อนจากสัญญาณพีคประมาณ 1256 cm^{-1} ไปเป็น 1261 cm^{-1} เมื่อทำการเชื่อมโยง เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิเลต ($-\text{COO}^-$) ของโซเดียมอัลจิเนต และหมู่ซัลโฟเนต (S=O stretching) ของคาร์ราจีแนนสามารถเกิดอันตรกิริยากับ Ca^{2+} ที่แตกตัวจากสารเชื่อมโยง CaCl_2 ได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพีคที่ตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิเลต และหมู่ซัลโฟเนต โดยเปลี่ยนแปลงพันธะไอออนิกของหมู่คาร์บอกซิเลตของโซเดียมอัลจิเนตจาก Na^+ ไปเป็น Ca^{2+} และหมู่ซัลโฟเนตของคาร์ราจีแนนจาก K^+ ไปเป็น Ca^{2+} แสดงดังรูปที่ 4.5 และเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของสารเชื่อมโยง CaCl_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ IR พบว่าทั้งสามสูตรมีค่าพีคการสั่นของ $-\text{COO}^-$ stretching และ S=O stretching ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นผลของการเพิ่มความเข้มข้นของสารเชื่อมโยง CaCl_2 อาจไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้จากการตรวจวัดสัญญาณ IR



รูปที่ 4.4 อินฟราเรดสเปกตราของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC, SC-0.5-60, SC-1.0-60 และ SC-1.5-60

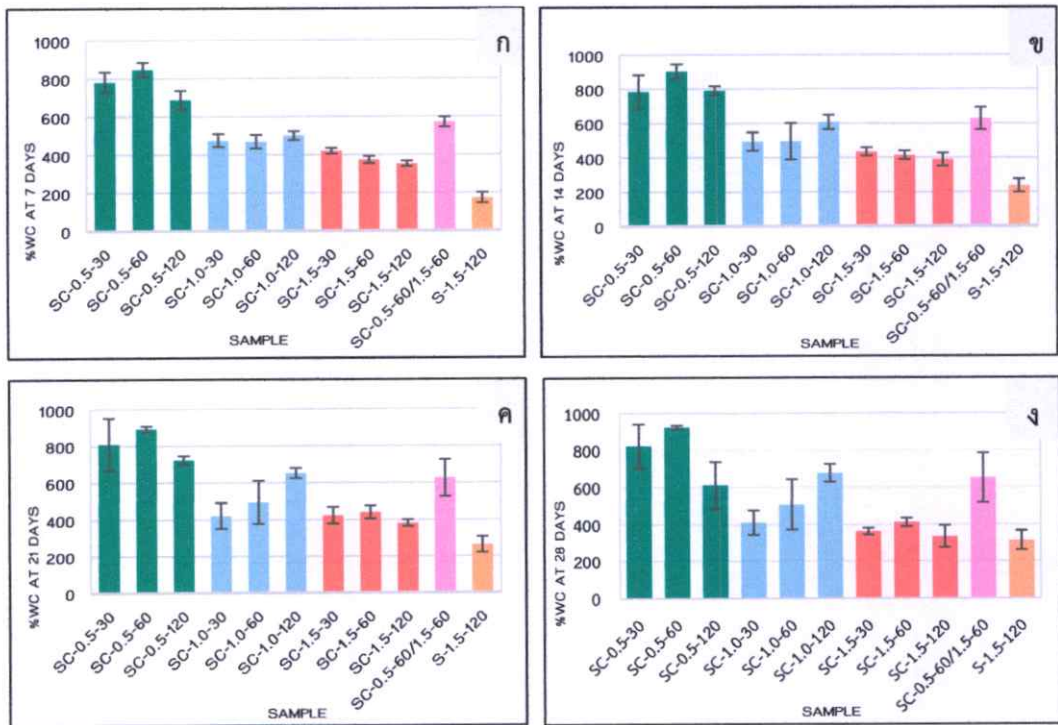


รูปที่ 4.5 โครงสร้างของ (ก) อัลจิเนต (ข) คาร์ราจีแนน และ (ค) อัลจิเนตและคาร์ราจีแนนเมื่อถูกเชื่อมโยงด้วย CaCl₂

4.4 ผลของการเชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl₂

4.4.1 เเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เเปอร์เซ็นต์การเสีสภาพ และเปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือ

เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เเปอร์เซ็นต์การเสีสภาพ และเปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือสามารถหาได้โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ แซในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6-4.8 ซึ่งเมื่อพิจารณาเฉพาะสูตร SC พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4.6) ของสูตรที่เชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl₂ เข้มข้น 1.5 โมลต่อลิตร มีค่าน้อยที่สุดซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 350-450 เเปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่เชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl₂ เข้มข้น 0.5 และ 1.0 โมลต่อลิตร ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ในช่วง 600-950 และ 400-700 เเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสูตรที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์น้อยที่สุดคือ สูตร SC-1.5-120 แต่มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร SC-1.5-30 และ SC-1.5-60 ซึ่งเตรียมโดยใช้เวลาในการเชื่อมโยงที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกันกับสูตรอื่น ๆ เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่เวลาต่างกันพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดมีค่าค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ 7 วัน



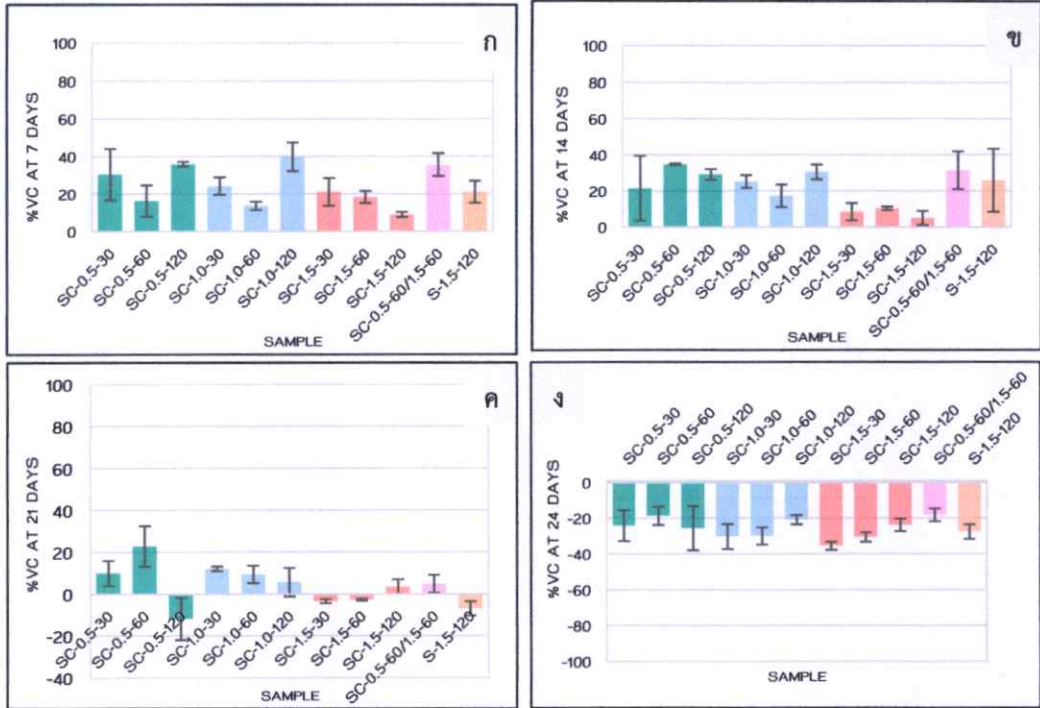
รูปที่ 4.6 เปอร์เซนต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลาย SBF หลังแช่เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน

เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร (รูปที่ 4.7) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรมีปริมาตรเพิ่มขึ้นในช่วงต้น และเริ่มเกิดการเสถียรภาพ (การละลาย และการกร่อน) หลังจากแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 21 วัน ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาตรลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น ซึ่งลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่และหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส แสดงในภาคผนวกรูปที่ ง-1 และ ง-2 อย่างไรก็ตามพบว่าสูตรที่เชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 เข้มข้น 1.5 โมลต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรน้อยที่สุด และเมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การเสถียรภาพและเปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือหลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน (รูปที่ 4.8) พบว่าสูตรที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การเสถียรภาพที่น้อยคือ สูตร SC-1.0-120 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือเท่ากับ 70) สูตร SC-0.5-30 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือเท่ากับ 66) และสูตร SC-1.5-120 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 35 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือเท่ากับ 65) โดยสูตรที่เหลือมีค่าเปอร์เซ็นต์การเสถียรภาพอยู่ในช่วง 40-60 (เปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลืออยู่ในช่วง 40-60) และเมื่อพิจารณาสูตร SC-0.5-60/1.5-60 ซึ่งคาดว่า เป็นการเชื่อมโยงที่ดี เนื่องจากใช้สารละลาย CaCl_2 สองความเข้มข้นคือ 0.5 และ 1.5 โมลต่อลิตร เพื่อให้สารเชื่อมโยงสามารถแทรก (Penetrate) เข้าไปเชื่อมโยงในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ และเพื่อหลีกเลี่ยงการเชื่อมโยงที่หนาแน่นเฉพาะบริเวณขอบของโครงเลี้ยงเซลล์ หากใช้ความเข้มข้นสารเชื่อมโยงที่มากในการเชื่อมโยงก่อน แต่ผลการทดลองพบว่าภาคตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งบริเวณขอบ และกึ่งกลางของทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์ปริมาณธาตุ Ca ที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 4.1 และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การ

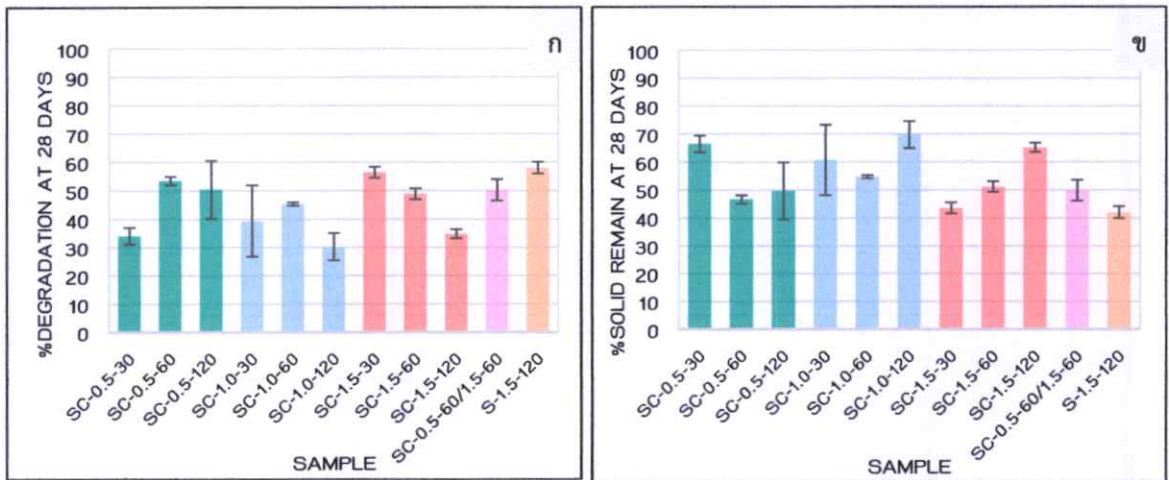
เปลี่ยนแปลงปริมาตรพบว่ามีความมากกว่าสูตรที่เชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 1.5 โมลต่อลิตร แต่น้อยกว่าสูตรที่เชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 0.5 โมลต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่ามีการทดลองทั้ง 4 หัวข้อ คือ เฟอร์เซนต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เฟอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เฟอร์เซนต์การเสียดสภาพ และเฟอร์เซนต์ปริมาณของแข็งคงเหลือใกล้เคียงสูตร SC-1.0-120 โดยอาจเป็นเพราะว่าการเชื่อมโยงที่เกิดขึ้นในครั้งที่สอง (สารละลาย CaCl_2 1.5 โมลต่อลิตร) อาจถูกขัดขวางจากการเชื่อมโยงที่เกิดจากการเชื่อมโยงในครั้งแรก (สารละลาย CaCl_2 0.5 โมลต่อลิตร) ทำให้ผลที่ได้ดีกว่าการเชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 0.5 โมลต่อลิตร เพียงความเข้มข้นเดียว แต่ไม่ดีเท่าการเชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 1.5 โมลต่อลิตร เพียงความเข้มข้นเดียว

ในการศึกษาผลของการใช้สารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่มีต่อสมบัติข้างต้นจึงเปรียบเทียบสูตร SC-1.5-120 กับสูตร S-1.5-120 พบว่าสูตร SC-1.5-120 มีค่าเฟอร์เซนต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่าสูตร S-1.5-120 ในวันที่ 7 และ 14 แต่มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญในวันที่ 21 และ 28 และมีเฟอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตรที่น้อยกว่า เนื่องจากสูตร SC-1.5-120 มีแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นอนุภาคของแข็งทำให้อาจขัดขวางการเชื่อมโยงของสายโซ่อัลจินต และคาร์ราจีแนน และการขยายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ ขณะที่สูตร S-1.5-120 มีเพียงอัลจินต และคาร์ราจีแนนซึ่งสัดส่วนของพอลิเมอร์เท่ากับสูตร SC-1.5-120 ทำให้ความหนาแน่นในการเชื่อมโยงมากกว่า การดูดซับน้ำได้ในโครงสร้างจึงมีค่าน้อยกว่า เฟอร์เซนต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์จึงน้อยกว่า และเนื่องจากสูตร S-1.5-120 มีเฟอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตรที่มากกว่าจึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ง่ายต่อการละลายออกเมื่อเวลาผ่านไป จึงส่งผลให้เฟอร์เซนต์การเสียดสภาพมากกว่าสูตร SC-1.5-120 รวมถึงค่าเฟอร์เซนต์ของแข็งคงเหลือที่น้อยกว่าสูตร SC-1.5-120 แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบทั้ง 4 หัวข้อนี้เป็นการทดสอบในสารละลาย SBF ซึ่งแคลเซียมซิลิเกตที่ผสมในโครงเลี้ยงเซลล์นี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ [21] ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักที่เกิดขึ้นเป็นผลของการดูดซับน้ำและการเสียดสภาพของพอลิเมอร์ รวมถึงน้ำหนักของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สามารถเกิดขึ้นได้

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวข้างต้นพบว่าสูตร SC-1.5-120 เป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นสูตรที่ใช้ความเข้มข้นที่มากและเวลาในการเชื่อมโยงที่นาน จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความหนาแน่นในการเชื่อมโยงที่มาก ส่งผลให้มีค่าเฟอร์เซนต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ และเฟอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตรที่น้อย รวมถึงมีเฟอร์เซนต์การเสียดสภาพและของแข็งคงเหลือที่มาก ถึงแม้ว่าสูตร SC-1.0-120 และสูตร SC-0.5-30 จะมีค่าเฟอร์เซนต์การเสียดสภาพที่น้อยกว่า รวมถึงเฟอร์เซนต์ของแข็งคงเหลือที่มากกว่าแต่มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามค่าเฟอร์เซนต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์และเฟอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของสูตร SC-1.0-120 และสูตร SC-0.5-30 มีค่ามากกว่าสูตร SC-1.5-120 ซึ่งอาจส่งผลต่อการใช้งานจริง เนื่องจากสามารถเกิดการขยายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์จนทำให้เกิดข้อบกพร่องในการรักษาได้ ดังนั้นจึงเลือกสูตร SC-1.5-120 เพื่อเป็นสูตรหลักในการทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป



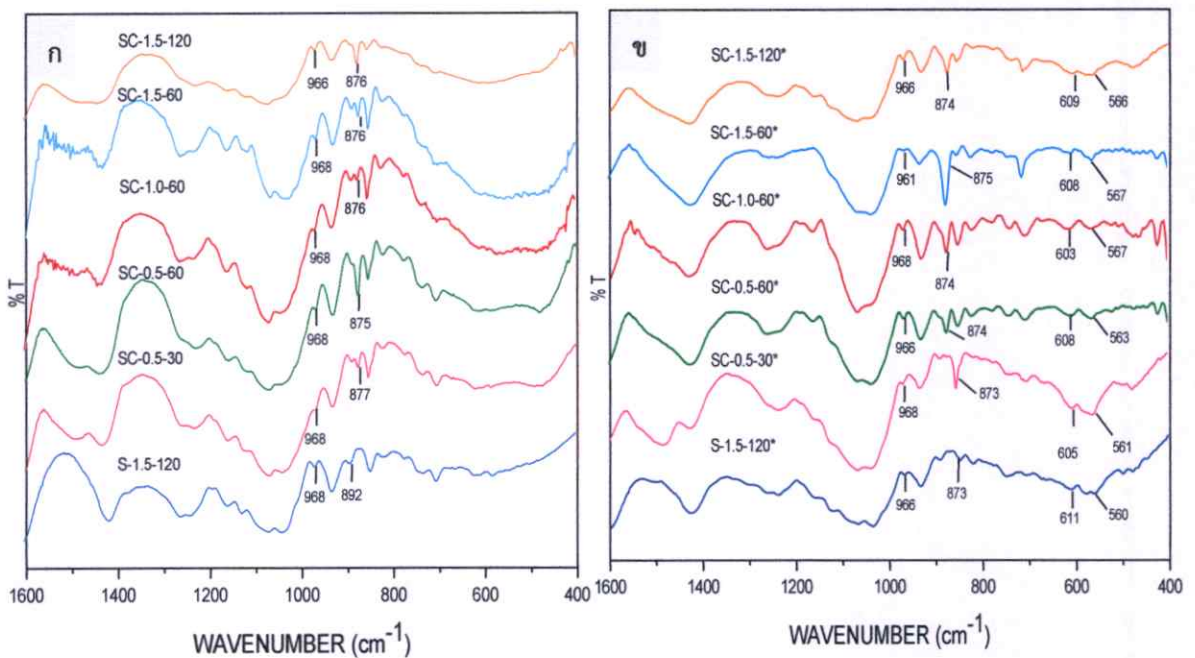
รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตรที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลาย SBF หลังแช่เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน



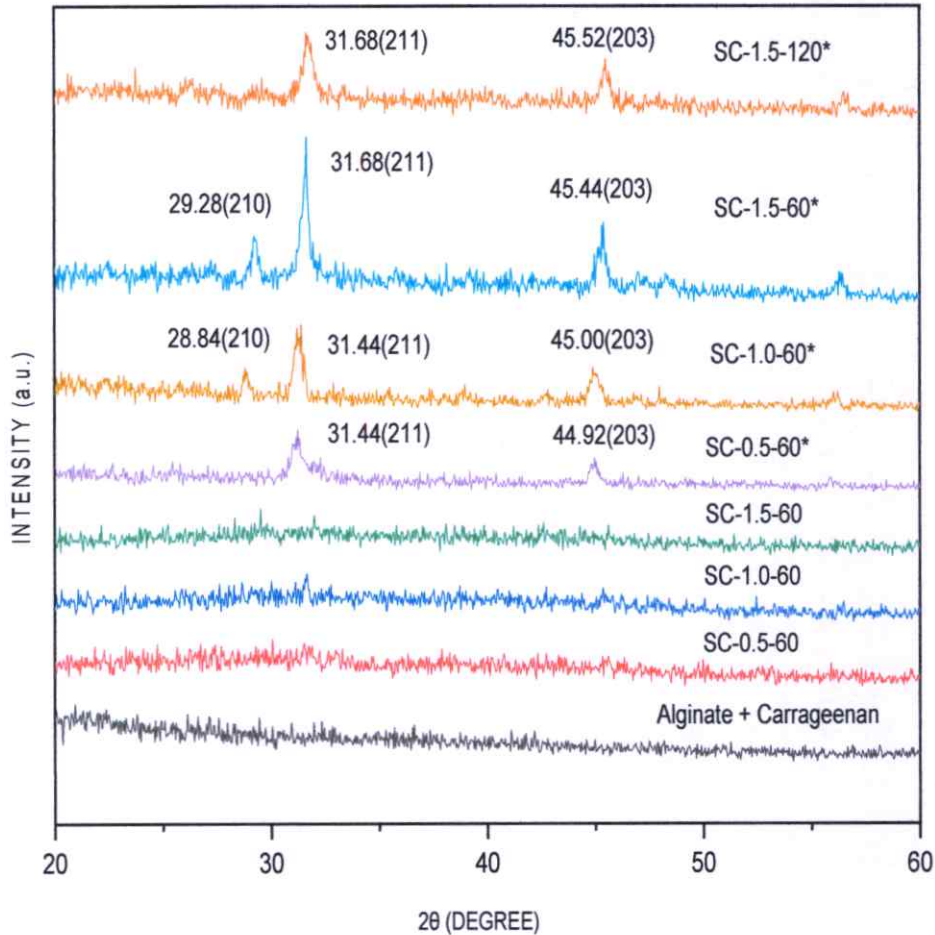
รูปที่ 4.8 (ก) เปอร์เซ็นต์การเสียดสภาพ และ (ข) เปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือเมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลาย SBF

4.5 การศึกษาสมบัติความว่องไวทางชีวภาพของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตในการเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค FTIR, XRD และ SEM-EDS

การศึกษาคความว่องไวทางชีวภาพของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์ สามารถทำได้โดยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ซึ่งในหัวข้อนี้จะทำการเลือกตัวแทนสูตรที่ศึกษาคือ S-1.5-120, SC-0.5-30, SC-0.5-60, SC-1.0-60, SC-1.5-60 และ SC-1.5-120 เพื่อศึกษาการเกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ และหลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน ด้วยเทคนิค FTIR ซึ่งแสดงสเปกตราดังรูปที่ 4.9 พบว่าสัญญาณ IR เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเกิดพีคใหม่ขึ้นที่ประมาณ $560-567\text{ cm}^{-1}$ และ $603-611\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นสัญญาณการสั่นของ PO_4^{3-} bending และที่ประมาณ $873-875\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นสัญญาณการสั่นของ HPO_4^{2-} bending [107, 108] เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าเกิดสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตขึ้นบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน และเพื่อยืนยันว่าสารประกอบที่พบเป็นผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์จึงทำการทดสอบด้วยเทคนิค XRD เพื่อหารูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์



รูปที่ 4.9 อินฟราเรดสเปกตรากของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120, SC-0.5-30, SC-0.5-60, SC-1.0-60, SC-1.5-60 และ SC-1.5-120 โดย (ก) โครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ และ (ข) โครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน

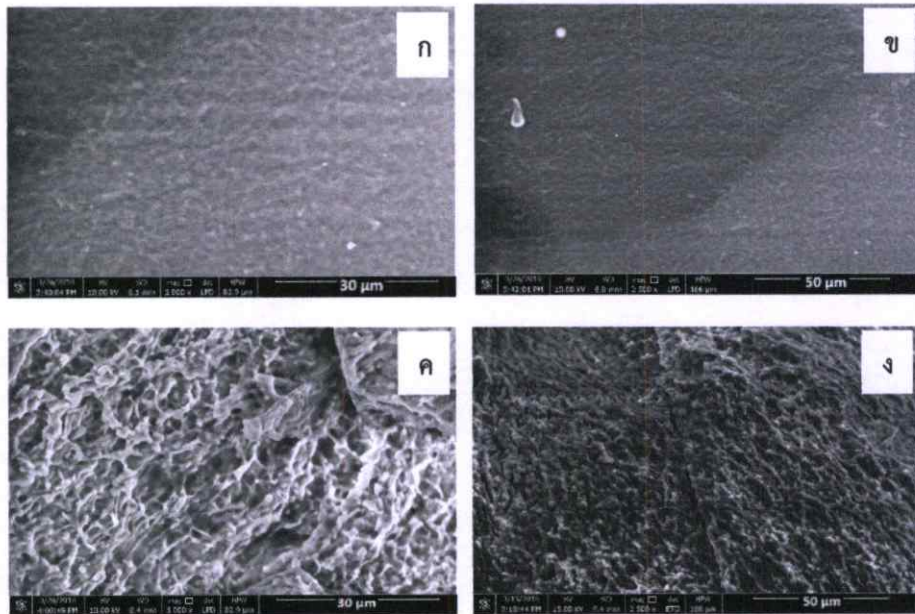


รูปที่ 4.10 รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์

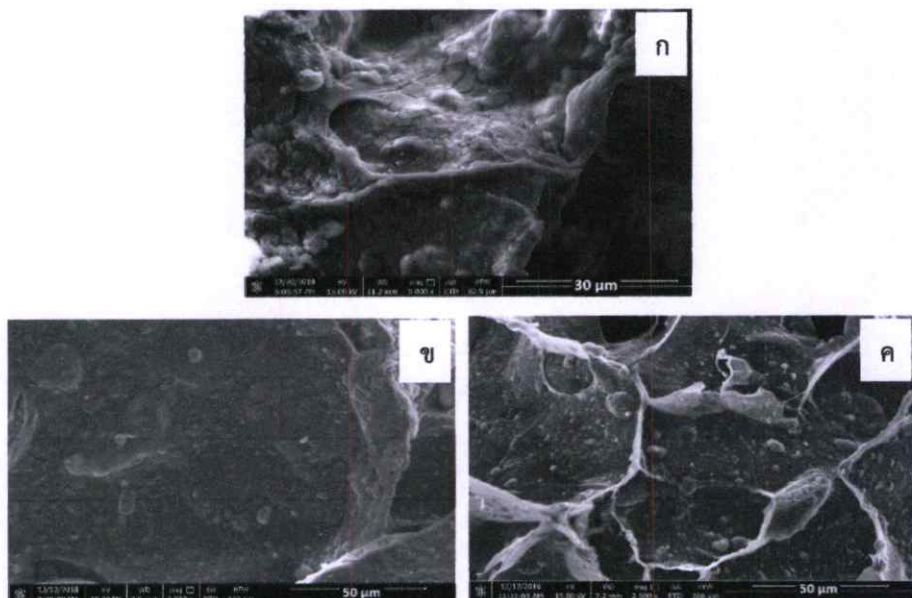
รูปที่ 4.10 เป็นการเปรียบเทียบให้เห็นรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ของแต่ละสูตร พบว่าในสูตรอัลจินตผสมคาร์ราจีแนนมีรูปแบบการเลี้ยวเบนเป็นแถบกว้าง (Broad peak) ในบริเวณ 2θ เท่ากับ 20-30 ซึ่งเป็นรูปแบบการเลี้ยวเบนโดยทั่วไปของอัลจินตและคาร์ราจีแนนที่มีความเป็นผลึกไม่สูงมาก ทำให้สัญญาณพีคที่พบเป็นแถบกว้าง [109, 110] นอกจากนี้เมื่อเชื่อมโยงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย CaCl_2 ดังสูตร SC-0.5-60, SC-1.0-60, SC-1.5-60 ซึ่งเป็นสูตรของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลาย SBF พบว่ารูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ไม่ปรากฏสัญญาณพีคขึ้นที่บริเวณใด ๆ เนื่องจากในสูตรเหล่านี้มีสารประกอบแคลเซียมซัลเฟตเป็นองค์ประกอบทำให้สัญญาณบริเวณ 2θ เท่ากับ 20-30 ซึ่งเป็นแถบกว้างของอัลจินตและคาร์ราจีแนนหายไป และเมื่อพิจารณาที่สูตร SC-0.5-60* ซึ่งเป็นสูตรของโครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลาย SBF พบว่าปรากฏสัญญาณพีคบริเวณ 2θ เท่ากับ 31.44 (211) และ 44.92 (203) ซึ่งเป็นรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [111] เช่นเดียวกับสูตร SC-1.0-60* พบสัญญาณพีคที่บริเวณ 31.44 (211) และ 45.00 (203), สูตร SC-1.5-60* พบสัญญาณพีคที่บริเวณ 31.68 (211) และ 45.44 (203) และสูตร SC-1.5-120* พบสัญญาณพีคที่บริเวณ 31.68 (211) และ 45.52 (203) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการก่อผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบสัญญาณพีคในบริเวณ 2θ เท่ากับ 28.84 (210) และ 29.28 (210) ในสูตร SC-1.0-60* และ SC-1.5-60* ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าในรูปแบบ

การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ซึ่งเกิดจากน้ำกลั่นที่ใช้ในการทดลองอาจมีคาร์บอนไดออกไซด์ละลายปะปนอยู่ในน้ำทำให้เมื่อนำมาใช้ทำการทดลองอาจมีการปะปนมาในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเมื่อนำมาแช่ในสารละลาย SBF ที่อิมิตัวยังยวดจึงสามารถเกิดการรวมตัวกับ Ca^{2+} ในระบบได้

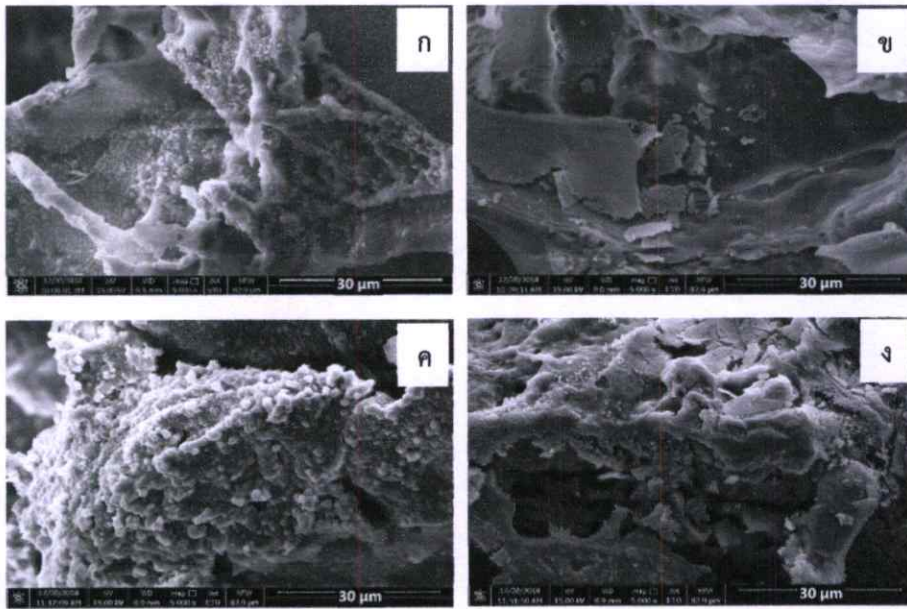
การตรวจวัดด้วยเทคนิค SEM สามารถใช้ศึกษาสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความว่องไวทางชีวภาพจากสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาในการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF เพิ่มมากขึ้น (7, 14, 21 และ 28 วัน) แสดงดังรูปที่ 4.11-4.16 โดยพบว่าสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF มีลักษณะผิวเรียบ และเมื่อทำการแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน พบว่าพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะขรุขระ เช่นเดียวกับกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60, SC-1.0-60, SC-1.5-60 และ SC-1.5-120 ที่พบว่าพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ (เลือกสูตร S-1.5-120 เป็นตัวแทนสูตรในการศึกษาพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลาย SBF) มีลักษณะเรียบ และเมื่อทำการแช่ในสารละลาย SBF พบว่าพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะขรุขระ และมีผลึกขนาดเล็กเป็นทรงกลมกระจายตัวอยู่ทั่วพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งคาดว่าเป็ผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยยืนยันจากผลการทดลองของเทคนิค XRD ซึ่งพบรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 7 วัน โครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรมีการก่อผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย SBF พบว่าผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีระยะเวลาในการก่อตัวและการเติบโตของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 และ SC-1.5-120 มีผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ขนาดใหญ่กว่า SC-0.5-60 และ SC-1.0-60 เมื่อเปรียบเทียบที่เวลาในการแช่ SBF เท่ากัน เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย CaCl_2 ที่ใช้เชื่อมโยง เป็นการเพิ่มปริมาณไอออน Ca^{2+} ที่ใช้เชื่อมโยงในอัลจินต และคาร์ราจีแนน ส่งผลให้ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงด้วยสารละลาย CaCl_2 เข้มข้น 1.5 โมลต่อลิตร มีไอออน Ca^{2+} มากกว่าสูตรที่ใช้สารละลาย CaCl_2 เข้มข้น 0.5 และ 1.0 โมลต่อลิตร ทำให้ส่งผลต่อการเกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ เนื่องจากไอออน Ca^{2+} มีโอกาสหลุดออกจากหมู่ $-\text{COO}^-$ และ $-\text{SO}_3^-$ ทำให้สารละลาย SBF ซึ่งอิมิตัวยังยวดมีค่า pH สูงขึ้น จึงช่วยส่งเสริมการสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ [17, 105] ซึ่งการยืนยันการเกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ยังสามารถยืนยันได้จากการพบธาตุ P บนโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นธาตุในองค์ประกอบของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์จากการทดสอบ SEM-EDS ดังรูปที่ 4.17-4.23



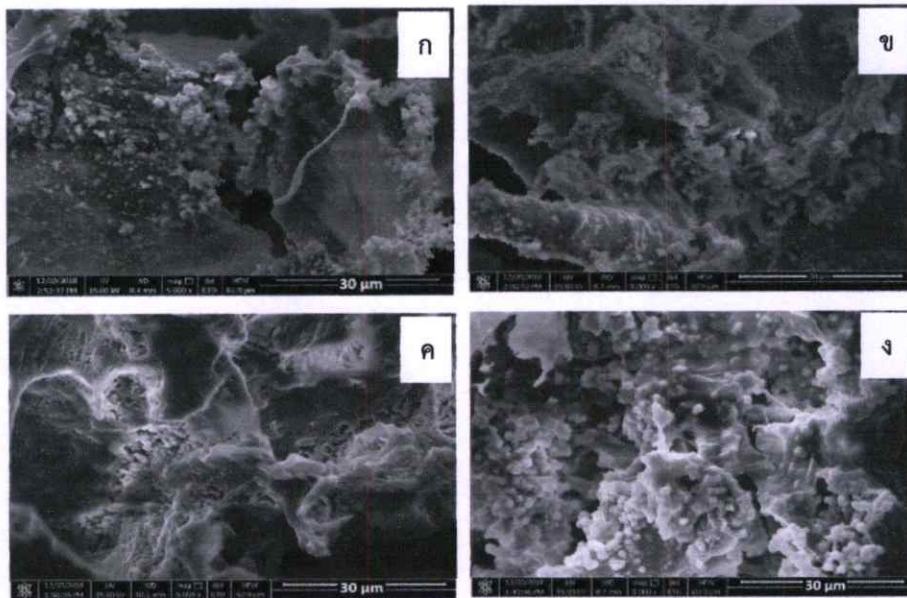
รูปที่ 4.11 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF (ก) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 5000X), (ข) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 2500X) และหลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ค) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 2500X



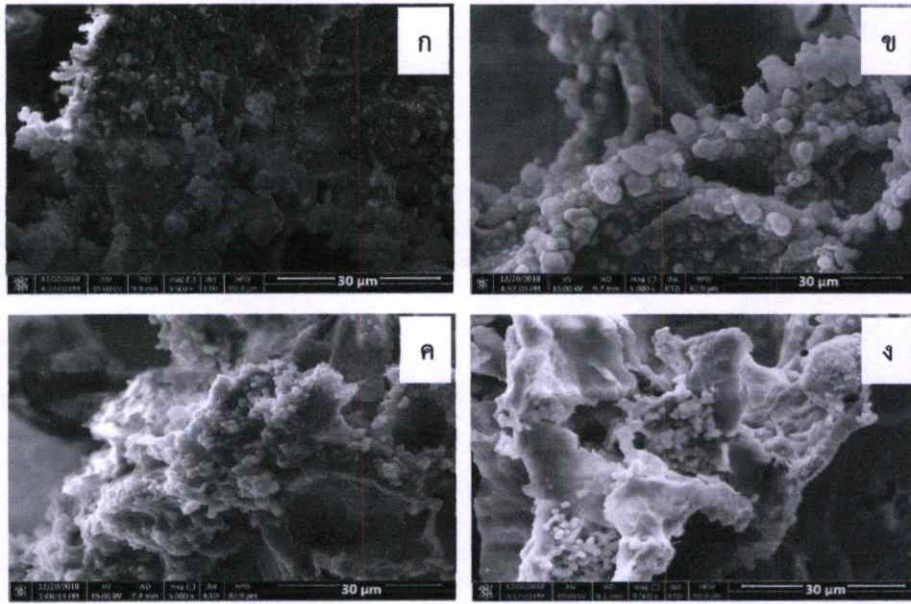
รูปที่ 4.12 ตัวอย่างภาพพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF จากเทคนิค SEM-EDS (ก) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 5000X), (ข) พื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 2500X) และ (ค) ภาคตัดขวางโครงเลี้ยงเซลล์ (กำลังขยาย 2500X) ด้วยเทคนิค SEM



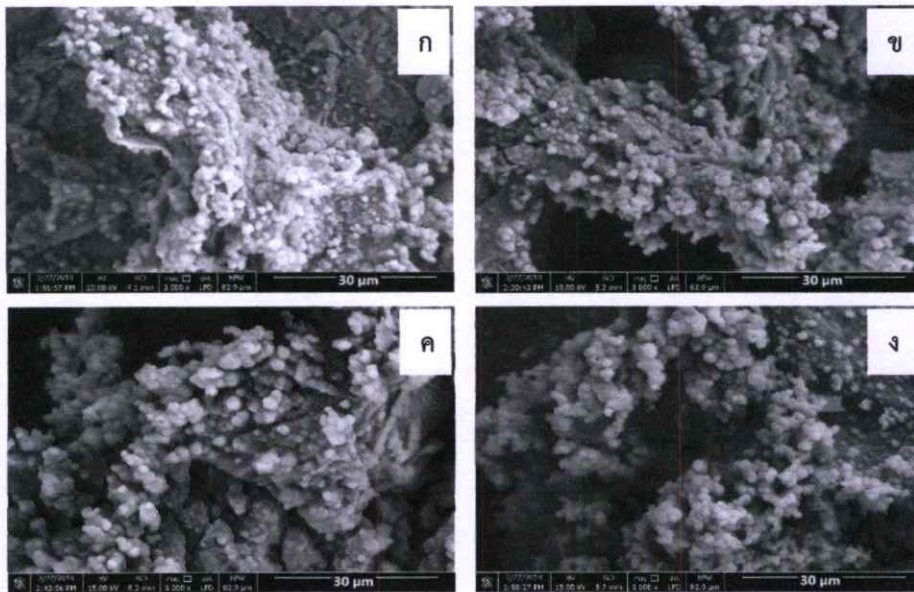
รูปที่ 4.13 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X



รูปที่ 4.14 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X



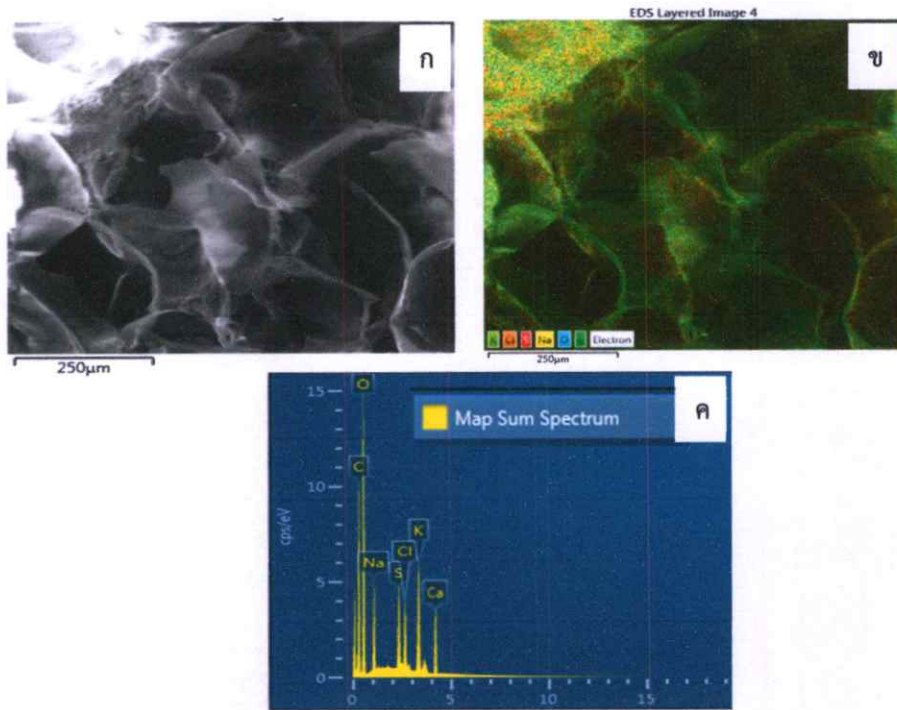
รูปที่ 4.15 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X



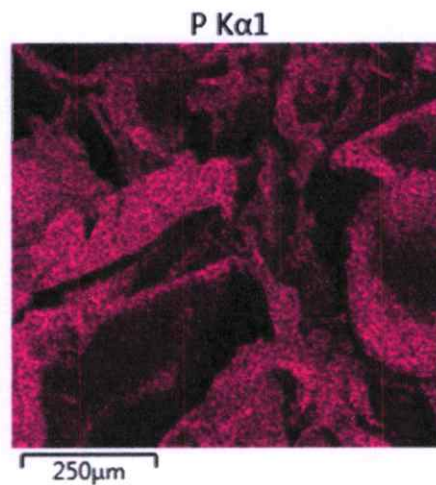
รูปที่ 4.16 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 5000X

จากรูปที่ 4.17-4.23 แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนแช่ในสารละลาย SBF เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค SEM-EDS ไม่พบธาตุ P เป็นองค์ประกอบ แต่เมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน แล้วนำมาทดสอบด้วยเทคนิค SEM-EDS พบธาตุ P กระจายอย่างหนาแน่นทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากแช่ในสารละลาย SBF ใน

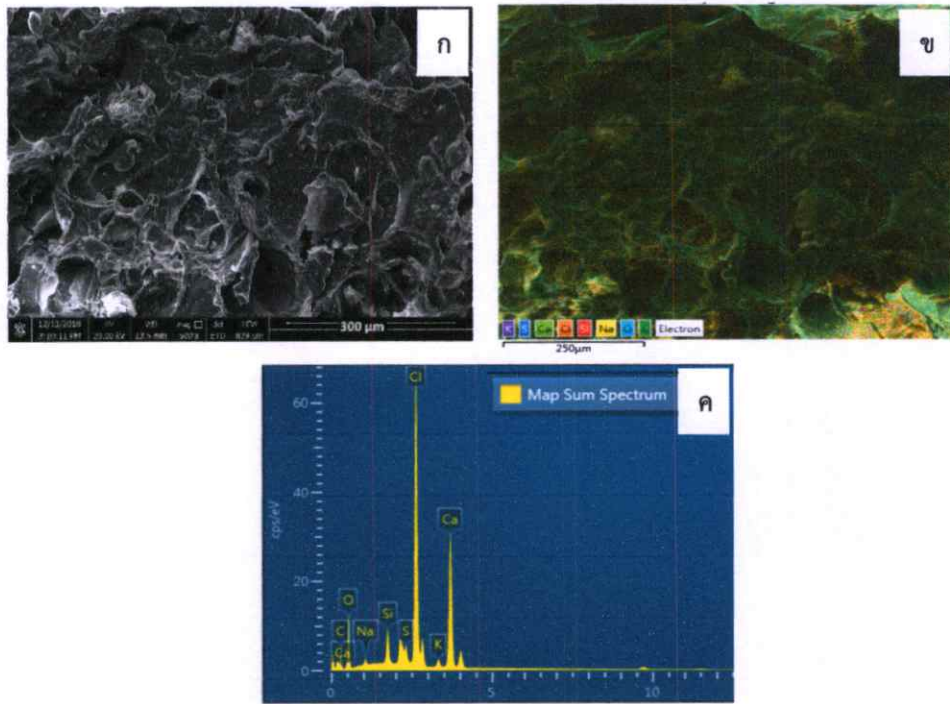
แต่ละสูตร มีการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เกิดขึ้น จึงพบธาตุ P ซึ่งเป็นธาตุในองค์ประกอบของสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์



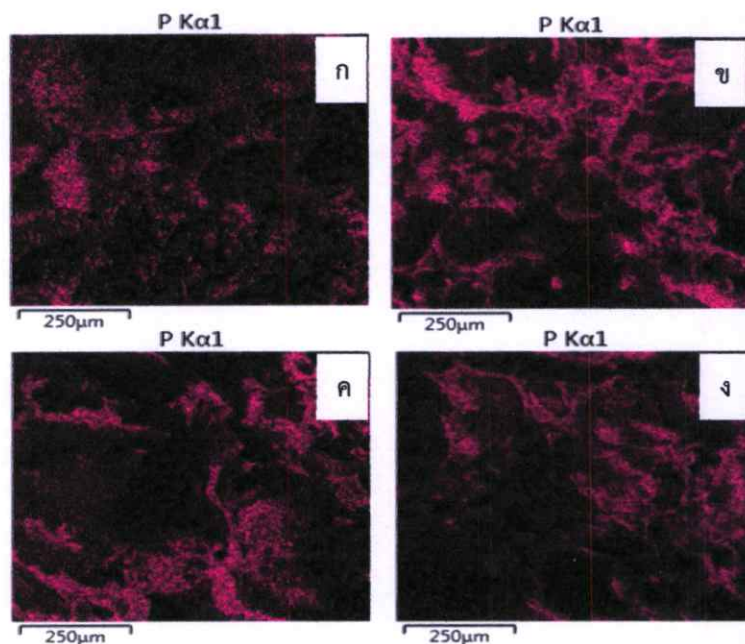
รูปที่ 4.17 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF จากเทคนิค SEM-EDS ที่กำลังขยาย 500X



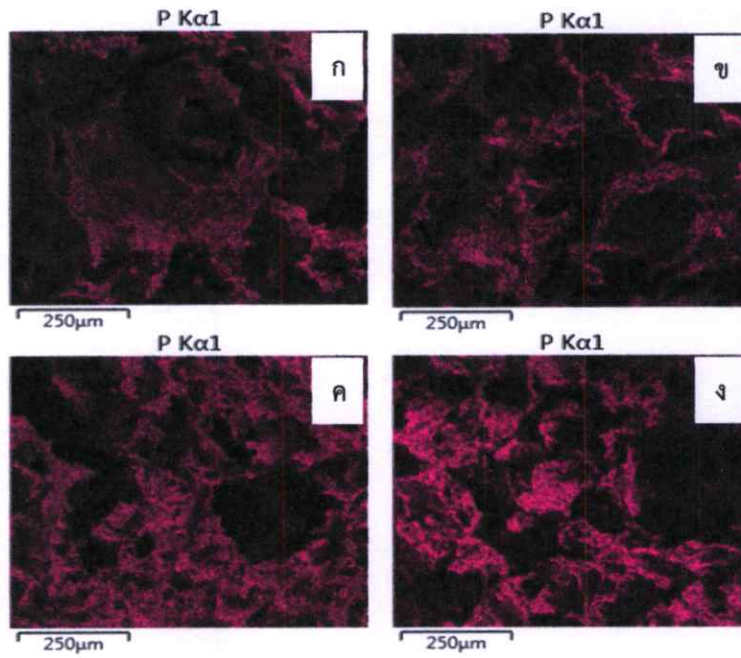
รูปที่ 4.18 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัส จากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X



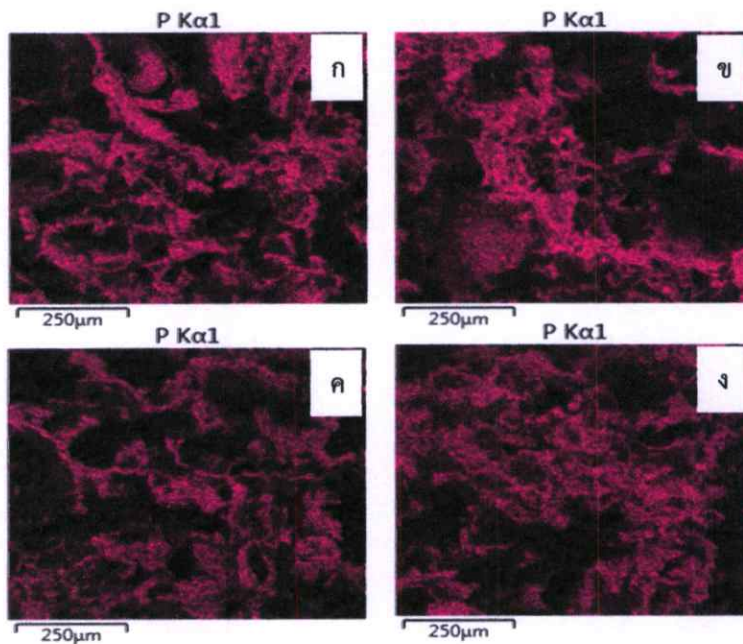
รูปที่ 4.19 สัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 ก่อนแช่ในสารละลาย SBF จากเทคนิค SEM-EDS ที่กำลังขยาย 500X



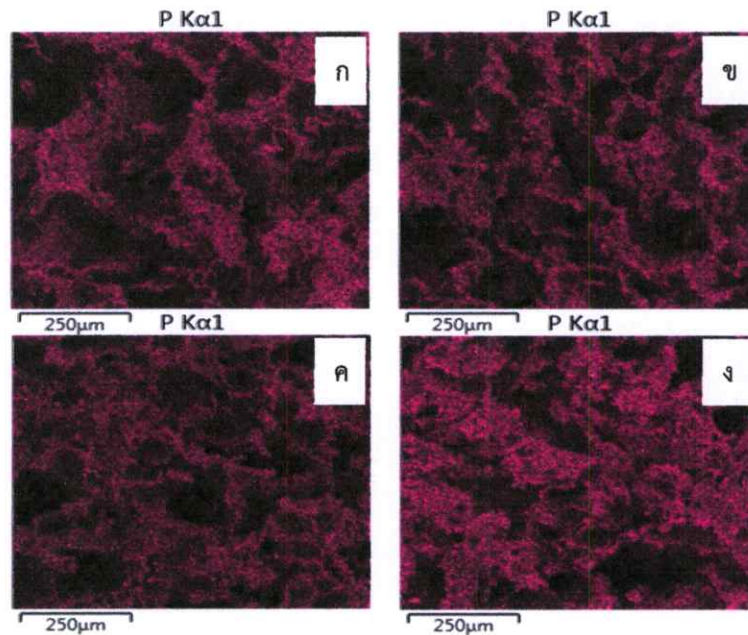
รูปที่ 4.20 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X



รูปที่ 4.21 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X



รูปที่ 4.22 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X

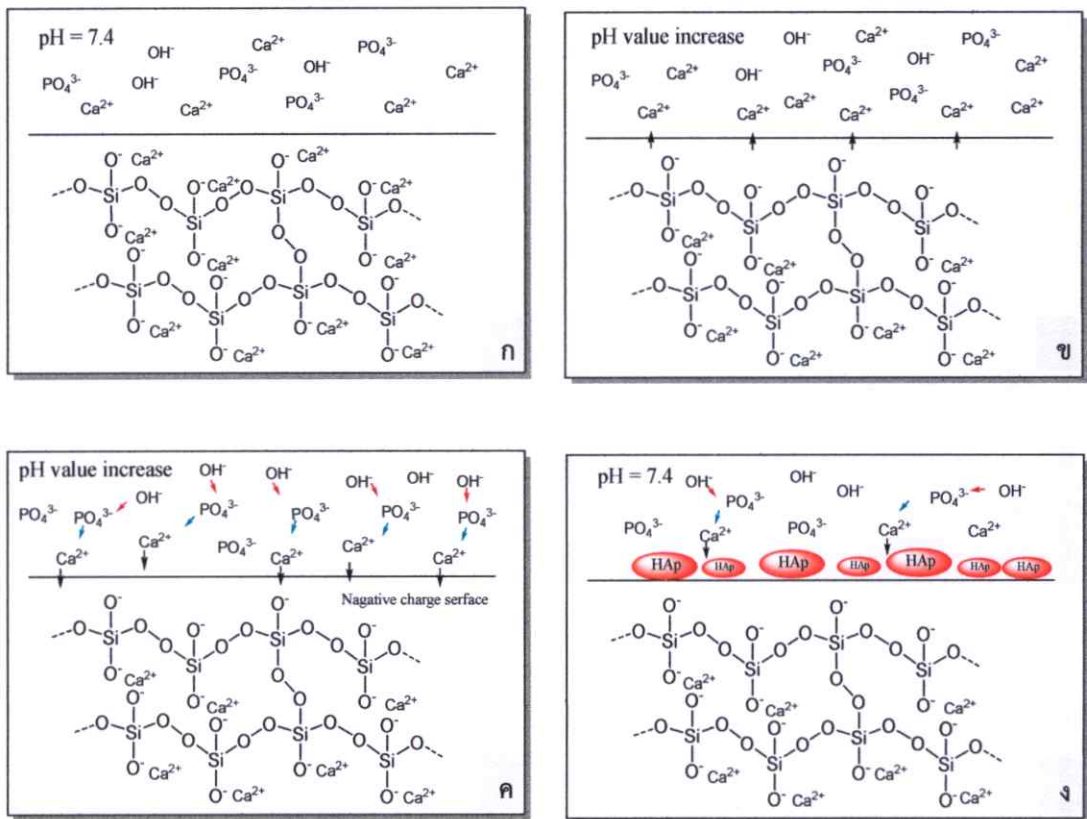


รูปที่ 4.23 สัณฐานวิทยาการกระจายตัวของธาตุฟอสฟอรัสจากเทคนิค SEM-EDS ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 หลังแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา (ก) 7 วัน, (ข) 14 วัน, (ค) 21 วัน และ (ง) 28 วัน ที่กำลังขยาย 500X

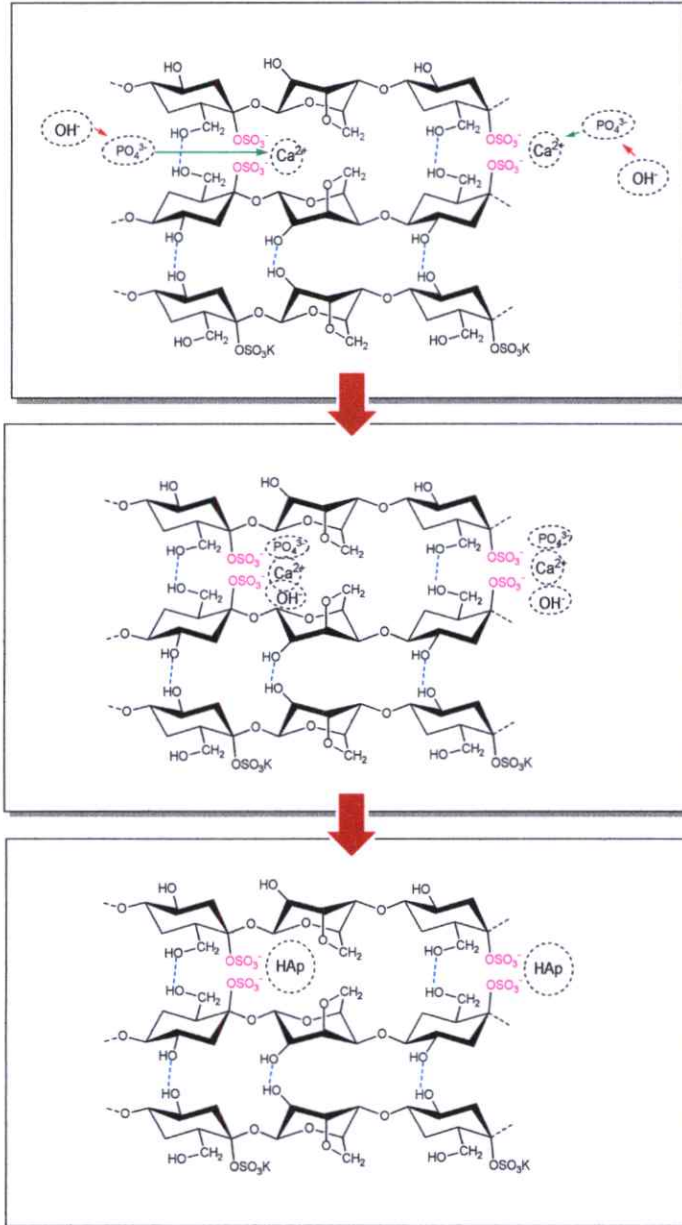
จากผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และ SEM-EDS ซึ่งพบหมู่ฟังก์ชัน PO_4^{3-} และธาตุ P ตามลำดับ โดยเป็นหมู่ฟังก์ชันและธาตุในองค์ประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์ และผลการทดลองจากเทคนิค SEM ซึ่งพบว่าสัณฐานวิทยาของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์หลังแช่ในสารละลาย SBF มีผลึกขนาดเล็กเป็นทรงกลมกระจายตัวอยู่ทั่วพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นการแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการก่อผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากเทคนิค XRD ที่พบรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ของไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตมีความว่องไวในการก่อให้เกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยกลไกเกิดจากเมื่อแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย SBF ที่มี pH เท่ากับ 7.4 ภูมิภาคของแคลเซียมซิลิเกตจะเกิดการละลายของไอออน Ca^{2+} ซึ่งทำให้ pH ของสารละลายเพิ่มขึ้น และก่อให้เกิดประจุลบบนพื้นผิวของหมู่ซิลิเกตในสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต จากนั้นจะสร้างชั้นของแคลเซียมฟอสเฟตที่มีรูปร่างอสัณฐานบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์จากการตกผลึกใหม่ของไอออน Ca^{2+} ร่วมกับไอออน PO_4^{3-} และ OH^- จากสารละลาย SBF ก่อตัวเป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของกระดูก แสดงแผนภาพจำลองการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ดังรูปที่ 4.24 (ก-ง) [21, 112]

นอกจากสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่มีความว่องไวในการก่อผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์แล้วยังพบว่าสูตร S-1.5-120 ซึ่งไม่มีสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ เมื่อนำไปแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 28 วัน ได้ตรวจพบหมู่ฟังก์ชัน PO_4^{3-} และธาตุ P ซึ่งคาดว่าป็นหมู่ฟังก์ชันและธาตุในองค์ประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นว่าคาร์ราจีแนนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้า [14, 20, 25, 38, 40-42] เนื่องจากคาร์ราจีแนนมีหมู่ซัลโฟนิคเป็นองค์ประกอบ เมื่อแช่ใน

สารละลาย SBF จะเปลี่ยนรูปเป็นประจุลบคือ หมู่ซัลโฟเนต ($-SO_3^-$) ในสภาวะ pH เป็นกลาง แล้วจะเกิดแรงทางไอออนกับ Ca^{2+} ในสารละลาย SBF เป็นสารประกอบเชิงซ้อนเกิดขึ้น จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะสร้างพันธะกับไอออน PO_4^{3-} และ OH^- ในสารละลาย SBF ทำให้เกิดการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ขึ้นในกรณีที่มีหมู่ซัลโฟเนตหลงเหลือ และในกรณีที่หมู่ $-SO_3^-$ ทำอันตรกิริยากับไอออน Ca^{2+} ของสารละลาย $CaCl_2$ กรณีนี้ไอออน Ca^{2+} อาจเกิดการหลุดออกจากพันธะไอออนิกที่จับกับหมู่ $-SO_3^-$ ได้ ทำให้สารละลาย SBF ซึ่งอ้อมตัวยังยวดยังมีค่า pH สูงขึ้น จึงช่วยส่งเสริมการสร้างผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ขึ้นบนพื้นผิวโครงร่างเซลล์ได้ แสดงแผนภาพจำลองการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ดังรูปที่ 4.25 ส่วนในกรณีของอัลจินเตได้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาก่อตัวของผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยใช้เทคนิค FTIR ในการศึกษา พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณการสั่นของ PO_4^{3-} bending [7] จึงอาจกล่าวได้ว่าการก่อตัวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวโครงร่างเซลล์สูตร S-1.5-120 มาจากคาร์ราจีแนน



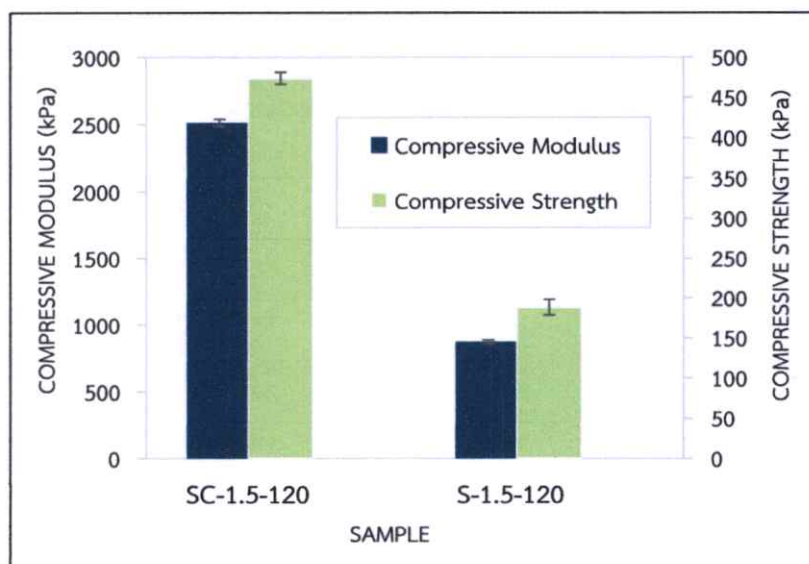
รูปที่ 4.24 แผนภาพจำลองการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกต [111] (หมายเหตุ : ชนิดไอออนในสารละลาย SBF มีมากกว่าที่แสดงในแผนภาพจำลอง)



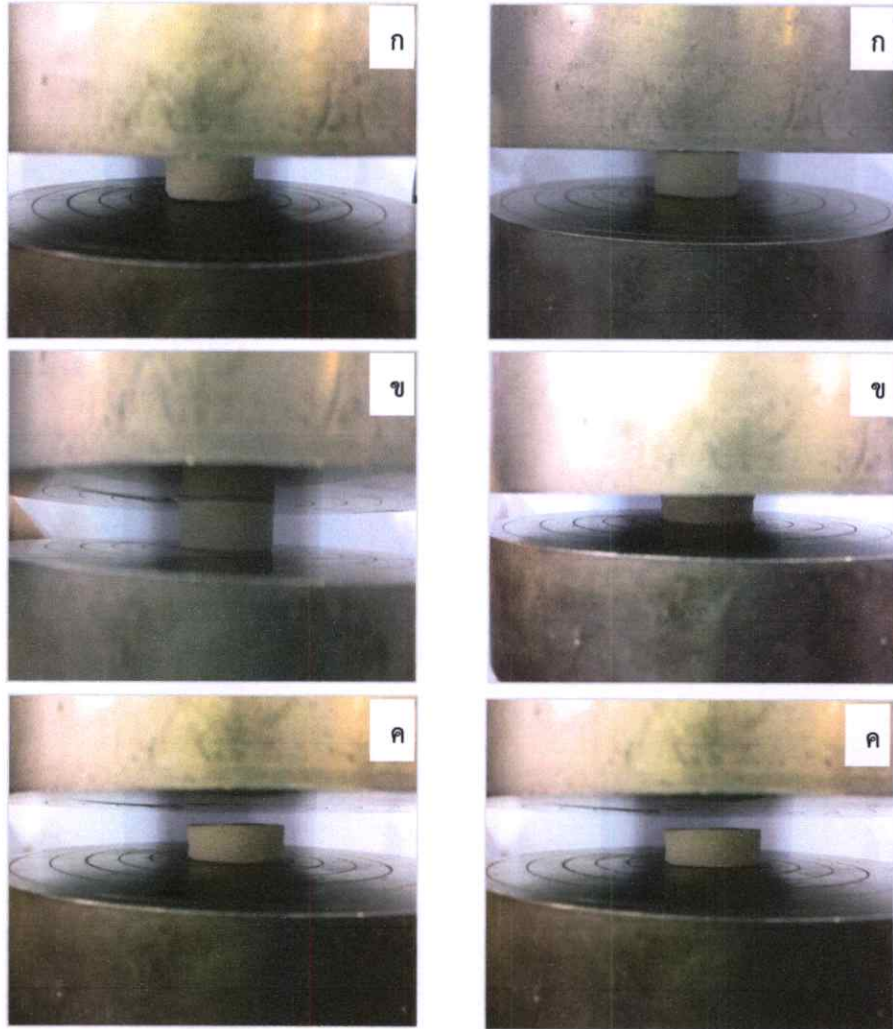
รูปที่ 4.25 แผนภาพจำลองการเหนี่ยวนำการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ของคาร์ราจีแนน [105]

4.6 การทดสอบแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสูตร SC-1.5-120 เป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์จึงได้นำมาทดสอบสมบัติเชิงกลเพื่อทดสอบความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับสูตร S-1.5-120 ซึ่งไม่มีสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ เพื่อศึกษาผลของสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่มีต่อความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทำการศึกษาที่ 2 สถานะ คือ สถานะแห้ง และสถานะเปียก โดยสถานะแห้งเป็นโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงระบอบขนาดดังรูปที่ 3.4 แต่ในสถานะเปียกเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำการแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบ จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์มาวัดขนาด แล้วนำไปทดสอบด้วยเครื่อง UTM โดยกดอัดที่ระยะ 50 เปอร์เซ็นต์ และหาค่ามอดุลัสกดอัดจากความชันที่ความเค้นประมาณ 0.01-0.02 MPa ในสูตร SC-1.5-120 และที่ประมาณ 0.005-0.01 MPa ในสูตร S-1.5-120 ผลการทดสอบพบว่า ในสถานะแห้ง โครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 มีค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดเท่ากับ 2513 และ 474 kPa ซึ่งมากกว่าสูตร S-1.5-120 ประมาณ 65 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยสูตร S-1.5-120 มีค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดเท่ากับ 872 และ 189 kPa ตามลำดับ (รูปที่ 4.26) โดยลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ก่อน และหลังการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.27 และเมื่อทำการวัดขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังทำการทดสอบเป็นเวลา 5 นาที พบว่าทั้งสองสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยสูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 มีการเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองสูตร และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ และ 24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.28 เนื่องจากเป็นการให้แรงกดอัดกับโครงเลี้ยงเซลล์



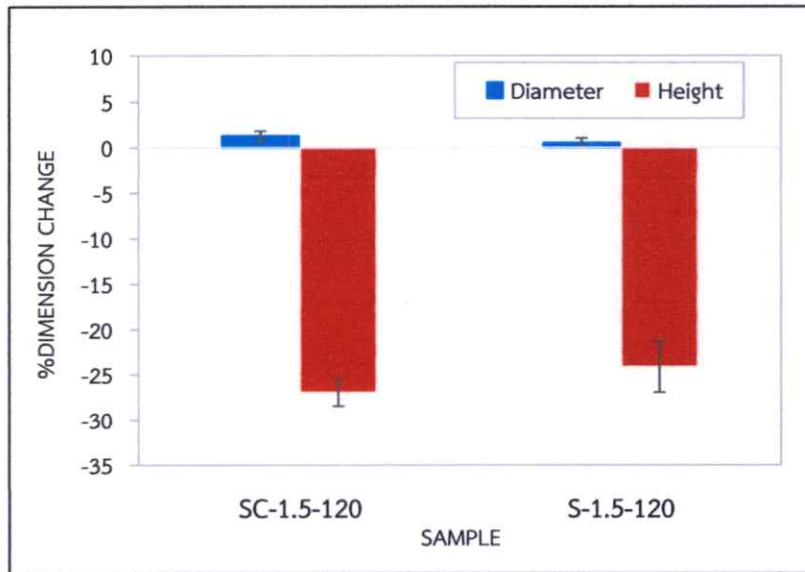
รูปที่ 4.26 ค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 ในสถานะแห้ง



(1) SC-1.5-120

(2) S-1.5-120

รูปที่ 4.27 โครงเลี้ยงเซลล์สุตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 จากการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะแห้ง (ก) ภาพก่อนการทดสอบ (ข) ภาพระหว่างการทดสอบ และ (ค) ภาพหลังการทดสอบ

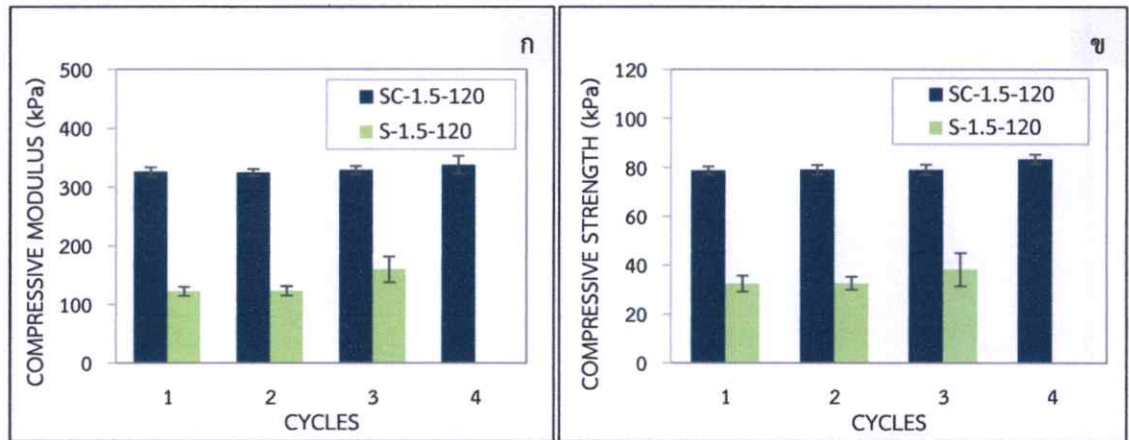


รูปที่ 4.28 การเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์หลังทำการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120

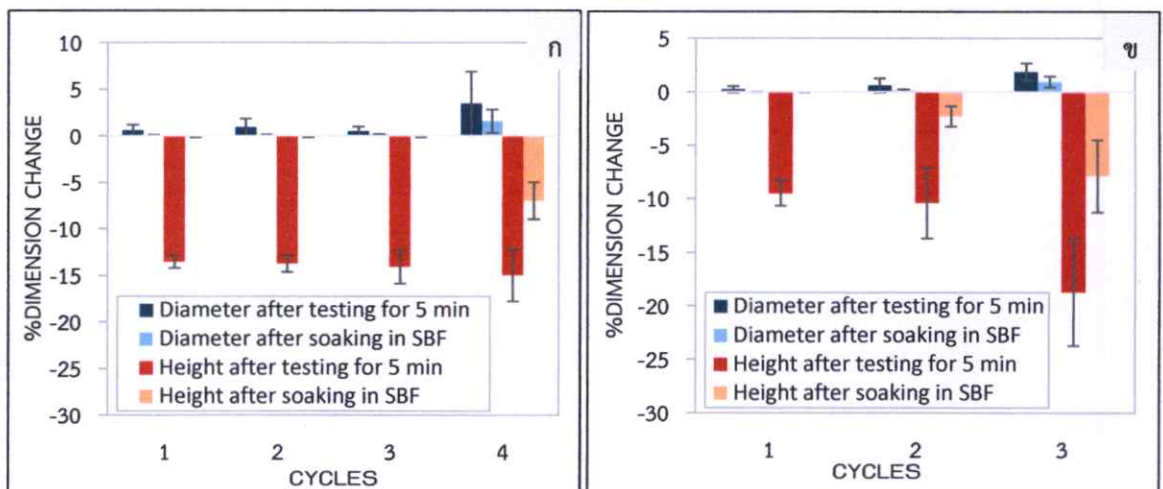
ในกรณีของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเปียกพบว่าสูตร SC-1.5-120 มีค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดมากกว่าสูตร S-1.5-120 (แสดงดังรูปที่ 4.29) ประมาณ 24 และ 41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยในกรณีของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเปียกพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถคืนตัวกลับมาหลังทำการทดสอบ เมื่อนำไปแช่ในสารละลาย SBF เป็นเวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง และเมื่อนำมาทดสอบด้วยการกดอัดซ้ำพบว่าค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญในแต่ละครั้งของการกดอัด โดยพบว่าสูตร SC-1.5-120 สามารถวัดแรงกดอัดได้ถึง 4 ครั้ง ขณะที่สูตร S-1.5-120 สามารถวัดได้ 3 ครั้ง ก่อนที่ค่ามอดุลัสกดอัดและความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าเปลี่ยนแปลงไป (จากการที่โครงเลี้ยงเซลล์ได้รับแรงกดอัดจนทำให้ความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์แตกตัวกันแน่นมากขึ้น ค่ามอดุลัสกดอัดและความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีค่าสูงขึ้น) รวมถึงก่อนที่โครงเลี้ยงเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดจนเห็นได้ชัดเจน แสดงดังรูปที่ 4.30 โดยสูตร SC-1.5-120 มีค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดในช่วง 325-338 kPa และ 79-83 kPa ตามลำดับ และสูตร S-1.5-120 มีค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดในช่วง 122-160 kPa และ 32-38 kPa ตามลำดับ โดยลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการทดสอบ ระหว่างทำการทดสอบ และหลังทำการทดสอบในครั้งที่ 1 แสดงดังรูปที่ 4.31

จากผลการทดสอบแรงกดอัดในทั้งสองสภาวะ แสดงให้เห็นว่าสูตรที่มีสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบมีค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดมากกว่าสูตรที่ไม่มีสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตเป็นอนุภาคของแข็งที่มีความแข็งแรงจึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตเป็นองค์ประกอบมีความแข็งแรงมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเพียงพอลิเมอร์จากธรรมชาติเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นวัสดุที่มีสมบัติเชิงกลต่ำ จึงส่งผลให้สูตร SC-1.5-120 มีค่ามอดุลัสกดอัด และความแข็งแรงกดอัดมากกว่าสูตร S-1.5-120 และจากค่าความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งพบว่ามีค่าใกล้เคียง

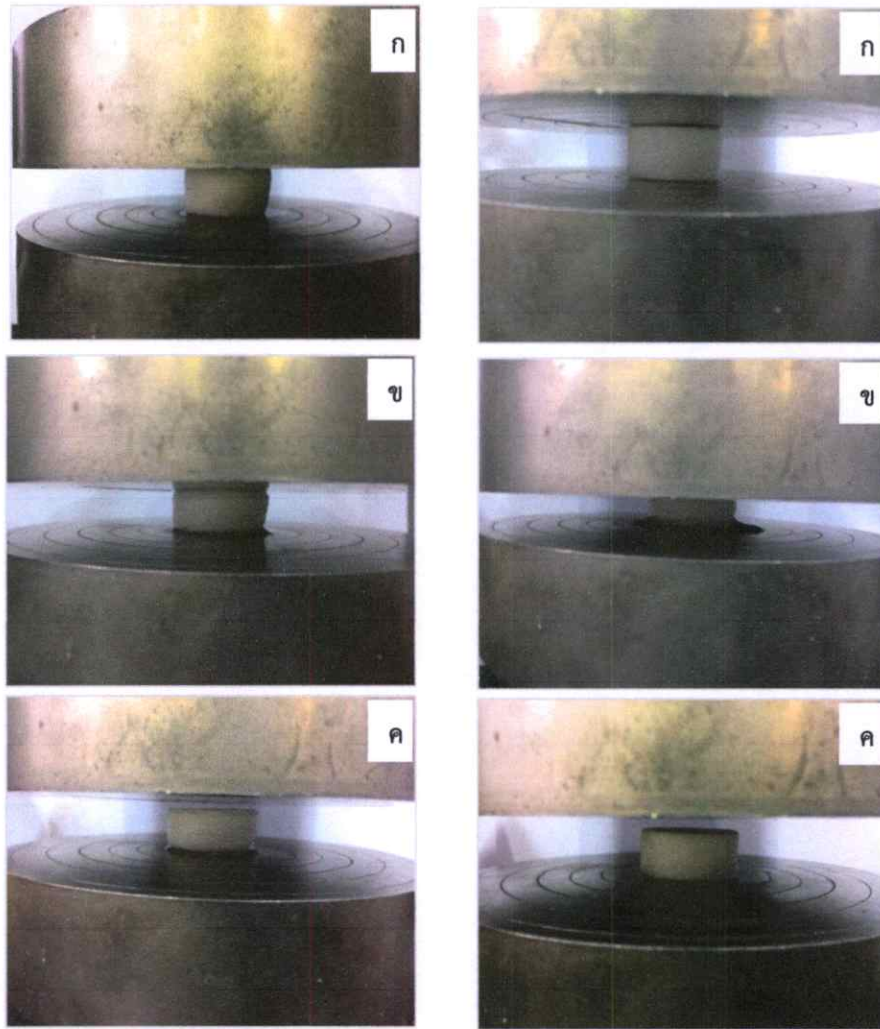
กับค่าความแข็งแรงกดอัดของกระดูกเนื้อโปร่ง (Cancellous bone) ของร่างกาย [113-116] ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อกระดูกชนิดหนึ่งซึ่งมีความหนาแน่นและความแข็งแรงน้อย ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุสำหรับทดแทนกระดูกได้



รูปที่ 4.29 ค่ามอดุลัสกดอัด (ก) และความแข็งแรงกดอัด (ข) ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 ในสภาวะเปียก



รูปที่ 4.30 การเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์หลังทำการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร (ก) SC-1.5-120 และ (ข) S-1.5-120 ที่ 5 นาที และหลังแช่ในสารละลาย SBF ประมาณ 2-4 ชั่วโมง



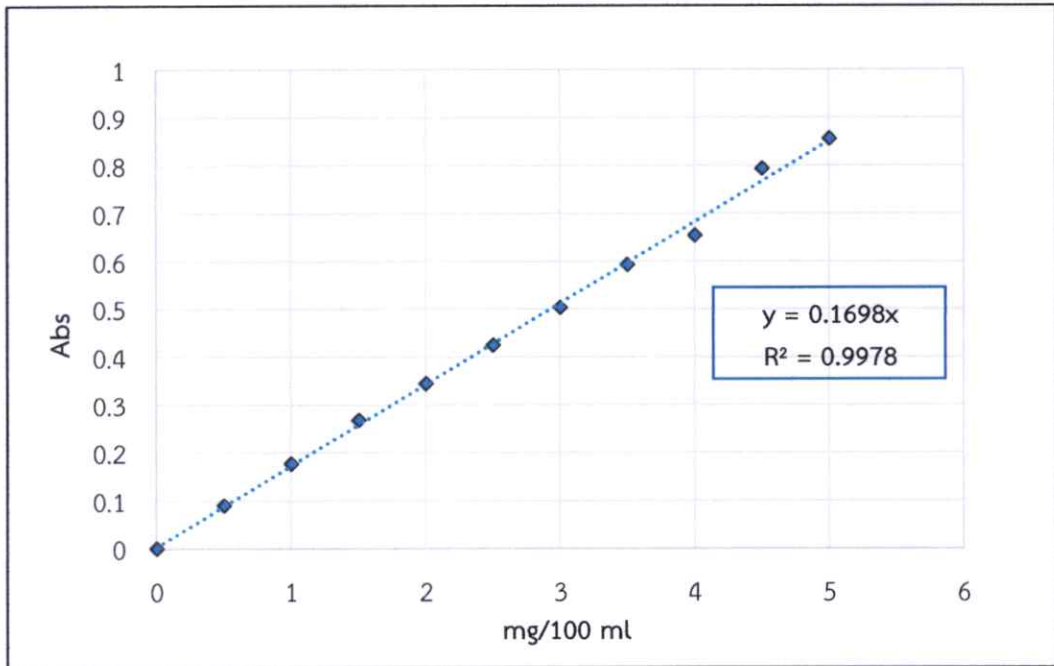
(1) SC-1.5-120

(2) S-1.5-120

รูปที่ 4.31 โครงเลี้ยงเซลล์สุตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 จากการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะเปียก (ก) ภาพก่อนการทดสอบ (ข) ภาพระหว่างการทดสอบ และ (ค) ภาพหลังการทดสอบ

4.7 พฤติกรรมการปลดปล่อยยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

การศึกษาพฤติกรรมการปลดปล่อยยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถทำได้โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่บรรจุยาไดโคลฟีแนคซึ่งเป็นยาต้นแบบในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C และให้แรงเขย่าเล็กน้อย แล้วเปรียบเทียบปริมาณยาไดโคลฟีแนคที่ปลดปล่อยออกมากับกราฟมาตรฐานของยาไดโคลฟีแนคในสารละลาย SBF (รูปที่ 4.32)



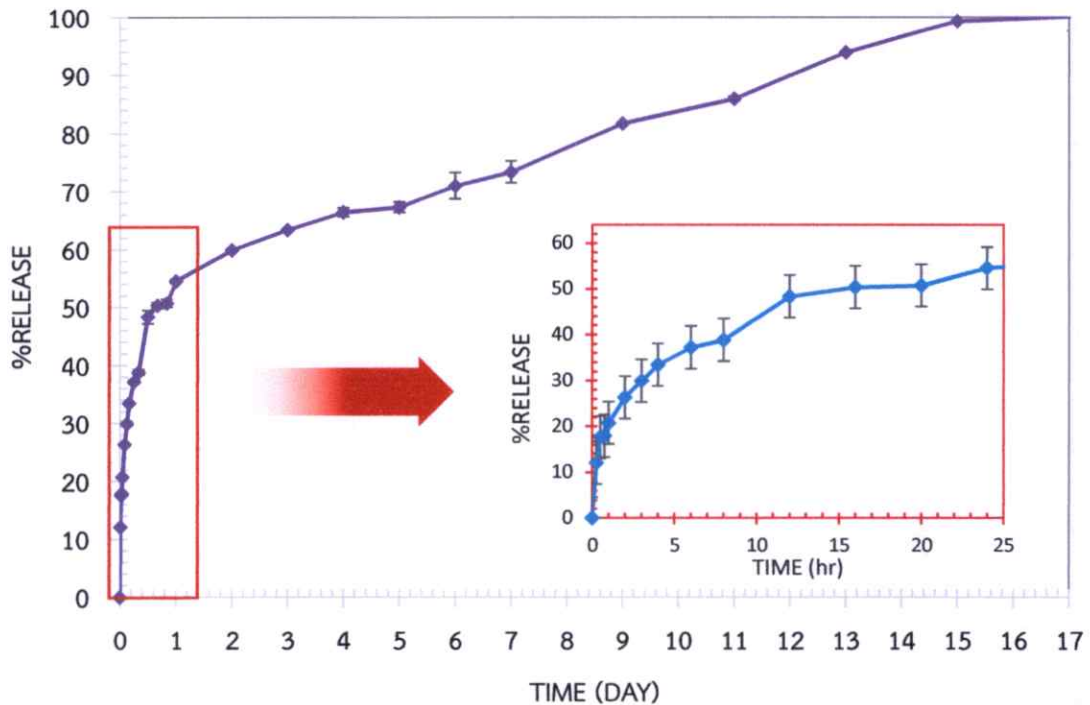
รูปที่ 4.32 กราฟมาตรฐานของยาไดโคลฟีแนคในสารละลาย SBF

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณยาไดโคลฟีแนคที่ปลดปล่อยออกมาจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่เวลาผ่านไป 30 นาที (ซ้ำที่ 1)

จากการทดลองพบว่าปริมาณยาไดโคลฟีแนคทั้งหมดต่อโครงเลี้ยงเซลล์ 1 ชิ้น (ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร) มียาบรรจุอยู่ประมาณ 5.69 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร (ในการทดลองใช้โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 4 ชิ้น ต่อ 1 ซ้ำ ดังนั้นปริมาณยาทั้งหมดใน 1 ซ้ำ มียาบรรจุอยู่ประมาณ $5.69 \times 4 = 22.76$ มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณยาทั้งหมดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาแช่ในสารละลาย SBF ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างด้วยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็น 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1397 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของยาไดโคลฟีแนคในสารละลาย SBF พบว่าที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1397 มีค่าความเข้มข้นของยาไดโคลฟีแนคเท่ากับ 0.8227 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร (จากสมการ $y = 0.1698x$ โดย x = ความเข้มข้นของยาไดโคลฟีแนค และ y = ค่าการดูดกลืนแสง) ดังนั้น ณ เวลา 30 นาที มีปริมาณยาไดโคลฟีแนคที่ปลดปล่อยออกมาเท่ากับ $0.8227 \times (4/0.4) \times (1/2) = 4.1135$ มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์

โดยเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาในเวลาอื่น ๆ แสดงไว้ในภาคผนวกตารางที่ ฉ-1 ซึ่งพลอตกราฟได้ดังรูปที่ 4.33 โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการปลดปล่อยยาในปริมาณมากในช่วง 2 วันแรก ซึ่งปลดปล่อยยาประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และปลดปล่อยยาเฉลี่ยต่อวันประมาณ 1-8 เปอร์เซ็นต์ จนหมด (17 วัน) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารูปแบบการปลดปล่อยยานี้เหมาะสมสำหรับการรักษาการอักเสบเฉียบพลันหลังการผ่าตัด เนื่องจากสามารถปล่อยปล่อยยาปริมาณมากได้ในช่วงเริ่มต้น ซึ่งเหมาะสมกับบาดแผลหลังการผ่าตัดที่อาจเกิดการอักเสบได้หลังจากการผ่าตัดจึงต้องการปริมาณยาจำนวนมากในช่วงแรกเพื่อระงับการอักเสบ [23]



รูปที่ 4.33 เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาไดโคลฟีแนคในสารละลาย SBF

4.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay

ผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เซลล์ไลน์ Vero เป็นตัวทดสอบ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ SC-1.5-120 (Diclofenac) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุที่ใช้ภายในร่างกายได้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์

ลำดับ	สูตร	%Cytotoxicity		%Cell viability	
		เฉลี่ย	SD	เฉลี่ย	SD
1	SC-1.5-120	4	0.5	96	0.5
2	SC-1.5-120 (Diclofenac)	9	0.4	91	0.4

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนจากวัสดุประกอบอัลจินต/คาร์ราจีแนน และแคลเซียมซิลิเกต สามารถเตรียมได้สำเร็จจากการผสมสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีการตกตะกอนทางเคมีกับอัลจินตและคาร์ราจีแนนในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนอัลจินต:คาร์ราจีแนน:แคลเซียมซิลิเกตเป็น 1:1:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) แล้วนำมาเชื่อมโยงด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที โดยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.1099-0.1844 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนประมาณ 57-72 เปอร์เซ็นต์ การกระจายตัวของแคลเซียมซิลิเกตที่วิเคราะห์จากเทคนิค SEM-EDS พบว่าแคลเซียมซิลิเกตกระจายตัวทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ และการเชื่อมโยงของไอออน Ca^{2+} กับอัลจินต และคาร์ราจีแนนสามารถยืนยันได้จากเทคนิค FTIR

จากการทดสอบเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เปอร์เซ็นต์การเสียน้ำ และเปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือในสารละลาย SBF พบว่าสูตร SC-1.5-120 เป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากมีค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตรและเปอร์เซ็นต์การเสียน้ำต่ำ แต่ยังคงมีเปอร์เซ็นต์ของแข็งคงเหลือที่สูง และเมื่อศึกษาสมบัติความว่องไวในการก่อให้เกิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยเทคนิค FTIR, SEM-EDS และ XRD พบว่าสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตและคาร์ราจีแนนมีความว่องไวในการก่อให้เกิดผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์

จากการทดสอบสมบัติเชิงกลพบว่าค่ามอดูลัสกดอัดและความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 ในสภาวะแห้ง และเปียกมีค่ามากกว่าสูตร S-1.5-120 นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเปียกสามารถคืนตัวกลับมา และสามารถทดสอบซ้ำได้เมื่อนำไปแช่ในสารละลาย SBF และเมื่อพิจารณาค่าความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 ในสภาวะแห้งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าความแข็งแรงกดอัดของกระดูกเนื้อโปร่ง (Cancellous bone) ของร่างกาย

สำหรับพฤติกรรมการปลดปล่อยยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 (Diclofenac) มีการปลดปล่อยยาในปริมาณมากในช่วง 2 วันแรก (~60 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นรูปแบบการปลดปล่อยยาที่เหมาะสมสำหรับการรักษาอาการอักเสบเฉียบพลันหลังการผ่าตัด และจากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ SC-1.5-120 (Diclofenac) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 สูตรนี้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของมนุษย์ จากผลการทดสอบข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกที่ใช้ภายในร่างกายได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) เพิ่มปริมาณสารประกอบแคลเซียมซิติเลต เพื่อเพิ่มสมบัติเชิงกลให้กับโครงเลี้ยงเซลล์
- 2) พัฒนาให้โครงเลี้ยงเซลล์มีสัณฐานวิทยาที่สม่ำเสมอทั่วทั้งชิ้นงาน เช่น ศึกษาอนุกรมในการ
แช่แข็งที่มีผลต่อสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น
- 3) ศึกษาการเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปประยุกต์ใช้ในร่างกาย

เอกสารอ้างอิง

- [1] Valente, J.F.A. Valente, T.A.M. Alves, P. Ferreira, P. Silva, A. and Correia, I.J. 2012. "Alginate based scaffolds for bone tissue engineering." *Materials Science and Engineering C*. 32(8) : 2596–2603.
- [2] Rezwani, K. Chen, Q.Z. Blaker, J.J. and Boccaccini, A.R. 2006. "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials*. 27(18) : 3413–3431.
- [3] Wei, G. and Ma, X.P. 2004. "Structure and properties of nanohydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials*. 25(19) : 4749–4757.
- [4] Raafat, A.I. and Abd-Allah, W.M. 2016. "In Vitro Apatite Forming Ability and Ketoprofen Release of Radiation Synthesized (Gelatin-Polyvinyl Alcohol)/ Bioglass Composite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration." *Wiley Online Library Plastics Engineers*. 39(3) : 606-615.
- [5] Türk, S Altinsoy, I Efe, G.F.C Ipek, M Ipek, M.and Bindal, C. 2018. "3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering." *Materials Science & Engineering C*. 92 : 757-768.
- [6] Thein- Han, W. W. and Misra, R. D. K. 2009. "Biomimetic chitosan nano hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering." *Acta Biomaterialia*. 5(4) : 1182–1197.
- [7] Han, Y. Zeng, Q. Li, H. and Chang, J. 2013. "The calcium silicate/alginate composite: Preparation and evaluation of its behavior as bioactive injectable hydrogels." *Acta Biomaterialia*. 9(11) : 9107-9117.
- [8] Sowjanya, J.A. Singh, J. Mohita, T. Sarvanan, S. Moorthi, A. Srinivasan, N. and Selvamurugan, N. 2013. "Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 109(1) : 294–300.
- [9] Lu, L. Qi, Yusha Tian, J. and Zhou, C. 2008. "Alginate/hydroxyapatite hydrogel as biodegradable in situ forming scaffold." *APCMBE IFMBE Proceedings*. 19 : 22–25.

- [10] Sotome, S. Uemura, Toshimasa, U. Masanori, K. Chen, J. Itoh, S. Tanaka, J. Tateishi, T. and Shinomiya, K. 2004. "Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen–alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein." *Materials Science and Engineering C*. 24(3) : 341–347.
- [11] Santo, V.E. Frias, A.M. Carida, M. Cancedda, R. Gomes, M.E. Mano, J.F. and Reis, L. 2009. "Carrageenan-Based Hydrogels for the Controlled Delivery of PDGF-BB in Bone Tissue Engineering Applications." *Biomacromolecules*. 10(6) : 1392–1401.
- [12] Nogueira, L.F.B. Maniglia, B.C. Pereira, L.S. Tapia-Blácido, D.R. and Ramos, A.P. 2016. "Formation of carrageenan-CaCO₃ bioactive membranes." *Materials Science and Engineering C*. 58(1) : 1–6.
- [13] Li, L. Ni, R. Shao, Y. and Mao, S. 2014. "Carrageenan and its applications in drug delivery." *Carbohydrate Polymers*. 103 : 1–11.
- [14] Nourmohammadi, J. Roshanfar, F. Farokhi, M. and Nazarpak, M.H. 2017. "Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications." *Materials Science and Engineering C*. 76 : 951–958.
- [15] Daniel-da-silva, A.L. Lopes, A.B. Gil, A.M. and Correia, R.N. 2007. "Synthesis and characterization of porous *j*-carrageenan/calcium phosphate nano composite scaffolds." *Materials Science*. 42(20) : 8581–8591.
- [16] Li, J. Yang B. Qian, Y. Wang, Q. Han, R. Hao, T. Shu, Y. Zhang, Y. Yao, F. and Wang, C. 2015. "Iota-carrageenan/chitosan/gelatin scaffold for the osteogenic differentiation of adipose-derived MSCs in vitro." *Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 103(7) : 1498-1510.
- [17] Kim, I.Y. Lwatsuki, R. Kikuta, K. and Ohtsuki, C. 2011. "Thermoreversible behavior of K-carrageenan and its apatite-forming ability in simulated body fluid." *Materials Science and Engineering C*. 31(7) : 1472–1476.
- [18] Wahab, I.F. and Razak, A.S.I. 2016. "Bionanocomposite film of kappa-carrageenan /nanotube clay: growth of hydroxyl apatite and model drug release." *Nanomaterials and Biostructures*. 11(3) : 963 – 972.
- [19] Feng, P. Pingpin, W Li, P. Gao, C. Shuai, C. and Peng, S.. 2014. "Calcium silicate ceramic scaffolds toughened with hydroxyapatite whiskers for bone tissue engineering." *Materials Characterizatio*. 97 : 47-56.

- [20] Cijun, G. Wang, G. Chengde, Y. Youwen, X. Yong, L. Long, Q. Tian, S. Hang, Y. Sheng, F. and Ping, W. 2017. "Calcium Silicate Improved Bioactivity and Mechanical Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-valerate) Scaffolds." *Polymers*. 9(5) : 175.
- [21] Suebwongnat, S. Jianprasert, A. Siriphannone, P. and Monvisade, P. 2012. Calcium silicate/poly(ethylene terephthalate) biomaterials via ring opening polymerization. *Polymer Research*. 19.
- [22] Siriphannone, P and Monvisade, P. 2008. "Poly(ethylene terephthalate)/hydroxyapatite biomaterials: Preparation, characterization, and in vitro bioactivity." *Biomedical Materials Research Part A*. 464-469.
- [23] Laura, E. Thomas, R.J. Heathman, M. Emily, R. Britchford, M. Arif, M. Cheryl, V. and Lee D.K. 2015. "Investigation of Localized Delivery of Diclofenac Sodium from Poly(D,L-Lactic Acid-co-Glycolic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Scaffolds Using an In Vitro Osteoblast Inflammation Model." *Tissue Engineering. Part A*. 21(1-2) : 362-373.
- [24] สุกิจ แสงนิพันธ์กุล. 2534. **กระดูกและกระดูกอ่อน**. ขอนแก่น : ภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- [25] สนธยา หนูเกื้อ. 2554. "การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจากพอลิคาโพรแลคโตน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์/ไตรแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมซิลิเกต." วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- [26] Safadi, F.F. Barbe, M.F . Abdelmagid, S.M. Rico, M.C. Aswad, R.A. Litvin, J. and Popoff, S.N. 2009. "Bone Structure, Development and Bone Biology". *Bone Pathology*. 1-50.
- [27] Newman, T. 2018. **Bones: All you need to know**. [Online]. Available : <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320444.php>.
- [28] Ramalingam, M. and Ramakrishna, S. 2005. "Development of nanocomposites for bone grafting." *Composites Science and Technology*. 65(15) : 2385-2406.
- [29] Suchanek, W. and Yoshimura, M. 1997. "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants." *Materials Research*. 13(1) : 94-117.
- [30] Cerroni, L. Filocama, R. Fabbri, M Piconi, C. Caropreso, S and Condo, S.G. 2002. "Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study." *Biomolecular Engineering*. 19(2-6) : 119-124.

- [31] Kumar, C. 2011. **Tissue, Cell and Organ Engineering (Nanotechnologies for the Life Sciences)**. British : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [32] Wang, E.A. Rosen, V. D'Alessandro, J.S. Bauduy, M. Cordes, P. Harada, T. Isreal, D.I. Hewick, R.M. and Kerns, K.M. 1990. "Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation." *Biochemistry*. 87(6) : 2220-2224.
- [33] นวรัตน์ วราอัศวปติเจริญ, วรานุช ปิติพัฒน์, Anaada Dasanayake และ Kaumudi Joshipura. 2556. "ทันตแพทยศาสตร์." ขอนแก่น : วิทยาลัยทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- [34] Chen, Q. Roether, J.A. and Boccaccini, A.R. 2008. **Tissue Engineering**. London : Imperial College London, South Kensington Campus.
- [35] Turnbull, G Clarke, J. Picard, F. Riches, P and Jia, L.. 2017. "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering." *Bioactive Materials*. 3(3) : 278-314.
- [36] Liu, X. and Ma, P.X. 2003. "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Annals of Biomedical Engineering*. 32(3) : 477-486.
- [37] Lin, K. and Chang, J. 2015. "Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications." *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications*. 3-19.
- [38] ศิริรัตน์ ทับสูงเนิน รัตนจันทร์. 2557. "โครงสร้างยึดเกาะชนิดแก้วไบโอแอททิฟโดยกระบวนการโซลเจล สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก." งานวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- [39] ไพรัช ทองละเอียด. 2553. "การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของวัสดุชีวภาพเชิงประกอบไฮดรอกซีแอพาไทต์-อะลูมินาด้วยอนุภาคเซอร์โคเนีย." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- [40] Rahaman, M.N. Delbert, E.D. Bal, B.S. Fu, Q. and Jung, S.B. Bonewald, L.F. Tomsia, A.P. "Bioactive glass in tissue engineering." *Acta Biomaterialia*. 7(6) : 2355-2373.
- [41] Chaisnghanuae, P. Siriphannon, P Tungjit, N. Wimonchit, S. and Sakdee, J. 2014. "Cytotoxicity of glass ionomer cement containing monocalcium silicate compound comparing with white ProRoot® MTA and Ketac™ molar on human pulp cells." *Dental*. 34(2) : 144-156.

- [42] ปริญญา ชัยสิงห์เหนือ. 2557. “ความเป็นพิษต่อเซลล์และคุณสมบัติการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ที่มีโนแคลเซียมซิลิเกตผสมในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- [43] Lin, L. Shen, Q. Wei, X. Hou, Y. Xue, Tao Fu, Xin Duan, X. and Yu, C. 2009. “Comparison of Osteogenic Potentials of BMP4 Transduced Stem Cells from Autologous Bone Marrow and Fat Tissue in a Rabbit Model of Calvarial Defects.” *Calcified Tissue International*. 85(1) : 55-65.
- [44] Davies, J.E. Matta, R. Mendes, V.C. and Perri de Carvalho, P.S. 2010. “Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery.” *Organogenesis*. 6(3) : 161-166.
- [45] Liu, X. Li, X. Fan, Y. Zhang, G. Li, D. Dong, W. Sha, Z. Yu, X. Feng, Q. Cui, F. and Watari, F. 2010. “Repairing goat tibia segmental bone defect using scaffold cultured with mesenchymal stem cells.” *Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. 94B(1) : 44-52.
- [46] Koschwanetz, H.E. and Reichert, W.M. 1997. **Textured and Porous Materials**. Duke University.
- [47] Ahmed, E.M. 2015. “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications.” *Advanced Research*. 6(2) : 105-121.
- [48] Schacht, E.H. 2004. “Polymer chemistry and hydrogel systems.” *Physics: Conference Series*. 3(1) : 22-28.
- [49] Akhtar, M.F. Hanif, M. and Ranjha, N.M. “Methods of synthesis of hydrogels.” *Saudi Pharmaceutical*. 24(5) : 554-559.
- [50] วารุณี ตานันต์ และ สายันต์ แสงสุวรรณ. 2557. “พอลิเมอร์ดูดซับน้ำได้มาก: การสังเคราะห์ การวิเคราะห์ และการประยุกต์ใช้.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 16(2) : 63-81.
- [51] Parhi, R. 2017. “Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review.” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 7(4) : 515-530.
- [52] Osada, Y. and Kajiwara, K. 2001. “**Gels Handbook Volume 1 : The Fundamentals**.” California : Academic Press.

- [53] Metters, A. and Hubbell, J. 2005. "Network Formation and Degradation Behavior of Hydrogels Formed by Michael-Type Addition Reactions." *Biomacromolecules*. 6(1) : 290-301.
- [54] Jeon, O. Samorezov, J.E. and Alsberg, E. 2014. "Single and dual crosslinked oxidized methacrylated alginate/PEG hydrogels for bioadhesive applications." *Acta Biomaterialia*. 10(1) : 47-55.
- [55] Ono, K. Saito, Y. Yura, H. Ishikawa, K. Kurita, A. Akaike, T. and Ishihara, M. "Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive." *Biomedical Materials Research banner*. 49(2) : 289-295.
- [56] Yang, C. Xu, L. Zhou, Y. Zhang, X. Huang, X. Wang, M. Han, Y. Zhai, M. Wei, S. Li, J. "A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing." *Carbohydrate Polymers*. 82(4) : 1297-1305.
- [57] Afsharia, M.J. Sheikhb, N. and Afarideha, H. 2015. "PVA/CM-chitosan/honey hydrogels prepared by using the combined technique of irradiation followed by freeze-thawing." *Radiation Physics and Chemistry*. 113 : 28-35.
- [58] Calo, E. and Khutoryanskiy, V.V. 2015. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 65 : 252-267.
- [59] Syed, G Saphwan, A. and Glyn, P. **Molecular and Environmental Bioengineering**. Wrexham : Glyndwr University.
- [60] Xiao, C and Gao, Y. 2008. "Preparation and properties of physically crosslinked sodium carboxymethyl-cellulose/poly(vinyl alcohol) complex hydrogels." *Applied Polymer Science*. 107(3) : 1568-1572.
- [61] Jin, S. Lin, M. Zhang, F. Chen, S. and Niu, A. 2006. "Synthesis and characterization of pH-sensitivity semi-IPN hydrogel based on hydrogen bond between poly(N-vinylpyrrolidone) and poly(acrylic acid)." *Polymer*. 47(5) : 1526-1532.
- [62] Shen, E.C. wang, C. Fu, E. Chiang, C.Y. Chen, T.T. and Nieh, S. 2008. "Tetracycline release from tripolyphosphate-chitosan crosslinked sponge: a preliminary in vitro study." *Periodontal Research*. 43(1) : 642-648.
- [63] Zhao, K Zhang, X. Wei, J. Li, J. Zhou, X. Liu, D Liu, Z. and Li, J. 2015. "Calcium alginate hydrogel filtration membrane with excellent anti-fouling

- property and controlled separation performance.” *Membrane Science*. 492(15) : 536-546.
- [64] Bajpai, S.K. and Sharma, S. 2004. “Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions.” *Reactive & Functional Polymers*. 59(2) : 129-140.
- [65] Deligkaris, K. Tadele, T.S. Olthuis. and W. Berg, A.V. 2010. “Hydrogel-based devices for biomedical applications.” *Sensors and Actuators B*. 147(1) : 765-774.
- [66] Chen, S. Wu, G. and Zeng, H. 2005. “Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan- Ag^+ complex.” *Carbohydrate Polymer*. 60(1) : 33-38.
- [67] Modrzejewska, Z. Dorabalska, M. Zarzycki, M. and Wojasz-Pajak, A. 2009. “The mechanism of sorption of Ag^+ ions on chitosan microgranules: IR and NMR studies.” *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*. 14(1) : 49-64.
- [68] Bhatia, S.C. and Ravi, N. 2000. “A Magnetic Study of an Fe-Chitosan Complex and Its Relevance to Other Biomolecules.” *Biomacromolecules*. 1(3) : 13-417.
- [69] Timfejeva, A. D’Este, M. and Loca, D. 2017. “Calcium phosphate/polyvinyl alcohol composite hydrogels: A review on the freeze-thawing synthesis approach and applications in regenerative medicine.” *European Polymer*. 95(1) : 547-565.
- [70] Zorotto, N. and Matricardi, P. 2018. “Semi-IPNs and IPN-based hydrogels.” *Polymeric Gels*. 91-24.
- [71] Sheng Ye, Y. Rick, J. and Hwang, B.J. 2012. “Water Soluble Polymers as Proton Exchange Membranes for Fuel Cells.” *Polymers*. 4(2) : 913-963.
- [72] Jenkins, A.D. Kratochvil, P. Stepto, R.F.T. and Suter, U.W. 1996. “Glossary of basic terms in polymer science.” *Pure and applied Chemistry*. 68(12) : 2287-2311.
- [73] Chikh, L. Delhorbe, V. and Fichet, O. (2011). “(Semi-)Interpenetrating polymer networks as fuel cell membranes.” *Membrane Science*. 368(1-2) : 1-17.
- [74] Matricardi, P. Meo, C.D. Coviello, T. Hennink, W.E. and Alhaique, F. 2013. “Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug

- delivery and tissue engineering” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65(9) : 1172-1187.
- [75] Bringham, M.D. B, Alexander Lo, E Bendali, A. Bendali, J.A. and Khademhosseini, A. 2008. “Mechanically Robust and Bioadhesive Collagen and Photocrosslinkable Hyaluronic Acid Semi-Interpenetrating Networks.” *Tissue Engineering*. 15(7) : 1645-1653.
- [76] Gouldstone, A Weng, L. and Wu, Y. and Chen, W. 2008. “Mechanically strong double network photocrosslinked hydrogels from *N,N*-dimethylacrylamide and glycidyl methacrylated hyaluronan.” *Biomaterials*. 29(14) : 2153-2163.
- [77] สำนักเทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2557. ไฮโดรเจล วัสดุดูดซับน้ำอัจฉริยะ. กรุงเทพมหานคร : กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- [78] Ratner, B.D. 1981. “Biomedical applications of hydrogels: review and Critical Appraisal.” *Biocompatibility of Clinical Implant Material*. 2(1) : 145-152.
- [79] Rohindra, D.R. Nand, A.V. and Khurma, J.R. 2004. “Swelling properties of chitosan hydrogels.” *Natural Science*. 22(1) : 32–35.
- [80] Budianto, E. Muthoharoh, S.P. and Nizardo, N.M. 2015. “Effect of Crosslinking Agents, pH and Temperature on Swelling Behavior of Crosslinked Chitosan Hydrogel.” *Applied Sciences*. 3(5) : 581-588.
- [81] Singhal, R. and Gupta, K. 2016. “Tailor-made Hydrogel Structures (Classifications and Synthesis Parameters).” *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 55(1) : 54-70.
- [82] Kumar, C.A. and Erothu, H. 2017. **Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [83] Mark, H.F. 2003. **Encyclopedia of polymer science and technology**. Canada : John Wiley and sons.
- [84] Stephen, A.M. and Phillips, G.O. 2016. **Food Polysaccharides and Their Applications**. New York : Taylor & Francis.
- [85] กัมปนาท ทวลบุตรตา และ ธนิกานต์ แสงนิ่ม. 2556. “การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ที่ได้จากทรัพยากรทางทะเลในทางเภสัชกรรม.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 18(2) : 263-273.

- [86] Phillips, G.O. and Williams, P.A. 2000. **Handbook of hydrocolloids**. New York : CRC Press.
- [87] Simo, G. Fernandez, E.F. Crespo, J.V. Ruiperez, V. and Nogales, J.M. 2017. "Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation." *Carbohydrate Polymers*. 170 : 1-14.
- [88] Paques, J.P. Linden, E.V.D. Rijn, C.J.M.V. and Sagis, L.M.C. 2014. "Preparation methods of alginate nanoparticles". *Advances in Colloid and Interface Science*. 209 : 163-171.
- [89] Kühbeck, D. Mayr, J Haering, M. Hofmann, M. Quignard, F and D. Díaz Díaz . "Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates." *New Journal of Chemistry*. 1-24.
- [90] Reis, R.L. Neves, N.M. Mano, J.F. Gomes, M.E. Marques, A.P. and Azevedo, H.S. **Natural-based polymer for biomedical applications**. New York : Woodhead.
- [91] David, S. Levi, C.S. Fahoum, L. Ungar, Y. Meyron-Holtz, E.G. Shpigelman, A. and Lesmes, U. 2018. "Revisiting the carrageenan controversy: do we really understand the digestive 3 fate and safety of carrageenan in our foods?." *Food & Function*. 10 : 1-28.
- [92] Knudsen, N.R. Ale, M.T. and Meyer, A.S. 2015. "Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies." *Marine drugs*. 13 : 3340-3359.
- [93] A. P. Imeson, In G.O. Phillips and P.A. Williams. (2000). Carrageenan. *England* : Woodhead.
- [94] ศุภณี อุดภาพ และ นุช เจริญกุล. **เคมีของคาร์โบไฮเดรต**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/chapter1.html>.
- [95] Pepas, N.A. 1997. "Hydrogels and drug delivery." *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2(5) : 531-537.
- [96] Pal, K. Banthia, A. K. and Majumdar, D. K. 2013. "Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications." *Designed Monomers and Polymers*. 12 : 197-220.
- [97] Ullah, F. Othman, M.B.H. Javed, F. Ahmad, Z. and Akil, H.M. 2015. "Classification, processing and application of hydrogels: A review." *Materials Science and Engineering: C*. 57 : 414-433.

- [98] Hoare, T.R. and Kohane, D.S. 2008. "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges." *Polymer*. 49(8) : 1993-2007.
- [99] เพ็ญพันธ์ อินทวิเศษ. 2011. "การศึกษาไหมไฟโบรอิน-โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ไฮโดรเจลที่มีรูพรุนโดยการฉายรังสีแกมมาสำหรับวัสดุเทียมทดแทนผิวหนัง." วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [100] ณรงค์ สาริสุต. 2535. "การผลิตยาออกฤทธิ์เนื้และนำส่งยาแบบต่าง ๆ." กรุงเทพฯ : ไทยมิตรการพิมพ์.
- [101] Krischak, G.D. Augat, P. Blakytyn, R. Claes, L. Kinzl, L. and Beck, A. 2007. "The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats." *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 127(6) : 453-458.
- [102] Kaci, D. 2019. **Diclofenac**. [Online]. Available : <https://www.drugs.com/d-diclofenac.htmls>.
- [103] Treenate, P. Monvisade, P. and Yamaguchi, M. 2014. "Development of hydroxyethylacryl chitosan/alginate hydrogel films for biomedical application." *Polymer Research*. 21 : 1-13.
- [104] Lin, H.R. and Yeh, Y.J. 2004. "Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and *in vitro* studies." *Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 71(1) : 52-65.
- [105] Nakata, Ryo Miyazaki, T. Morita, Y. Ishida, E. Iwatsuki, R. and Ohtsuki, C. 2010. "Apatite formation abilities of various carrageenan gels in simulated body environment." *The Ceramic society of Japan*. 118(6) : 487-490.
- [106] Baci, D. Simitzis, J. 2007. "Synthesis and characterization of a calcium silicate bioactive glass." *Optoelectronics and advanced materials*. 9(11) : 3320-3324.
- [107] Ereiba, K. M. Mostafa, A. G. Gamal, G. A. and Said, A.H. 2013. "In vitro study of iron doped hydroxyapatite." *Biophysical Chemistry*. 4(4) : 122-130.
- [108] Kalidoss, M. Kumar, S. Rubaiya, Y. and Doble, M. 2017. "Combinatorial delivery of antibiotic and anti-inflammatory drugs using calcium deficient hydroxyapatite nanocarriers for the management of bone infections." *Biophysical Chemistry*. 1(1) : 1-5.

- [109] Kanmani, P. and Jong, R. 2014. "Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging." *Biological Macromolecules*. (68) : 1-5.
- [110] Trivedi, M. Branton, A. and Trivedi, D. 2015. "Characterization of Physicochemical and Thermal Properties of Chitosan And Sodium Alginate after Biofield Treatment." *Pharmaceutica Analytica Acta*. 6(10) : 2153-2162.
- [111] Sima, S. Farhood, N. Abbas, M. Tabassom, H. Masoumeh, H. Batool, K. and Seyyed, M. 2014. "Effect of Gamma Irradiation on Structural and Biological Properties of a PLGA-PEG-Hydroxyapatite Composite." *The Scientific World*. 9.
- [112] Xuanyong, L. Chuanxian, D. and Paul, K. 2004. "Mechanism of apatite formation on wollastonite coatings in simulated body fluids." *Biomaterials*. 25. 1755-1761.
- [113] Lutz-Christian, G. and Aldo, R. 2010. "Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Materials*. 3. 3867-3910.
- [114] Feng, P. Wei, P. Shuar, C. Peng, S. 2014. "Characterization of Mechanical and Biological Properties of 3-D Scaffolds Reinforced with Zinc Oxide for Bone Tissue Engineering." *Plos one*. 9(1).
- [115] Polo, C. Liliana, L. Latorre, E. Magda, R. Jame, E. 2014. "Effects of Metal Inlay Thickness in Polyethylene Cups With Metal-on-Metal Bearings." *Nanoscience and Nanotechnology*. 1(14). 15-56.
- [116] Natasha, A. N. Asep, S.F. Sopyan, L. 2014. "Recent Progress on Hydroxyapatite-Based Dense Biomaterials for Load Bearing Bone Substitutes." *Materials Science*. 4. 63-80.

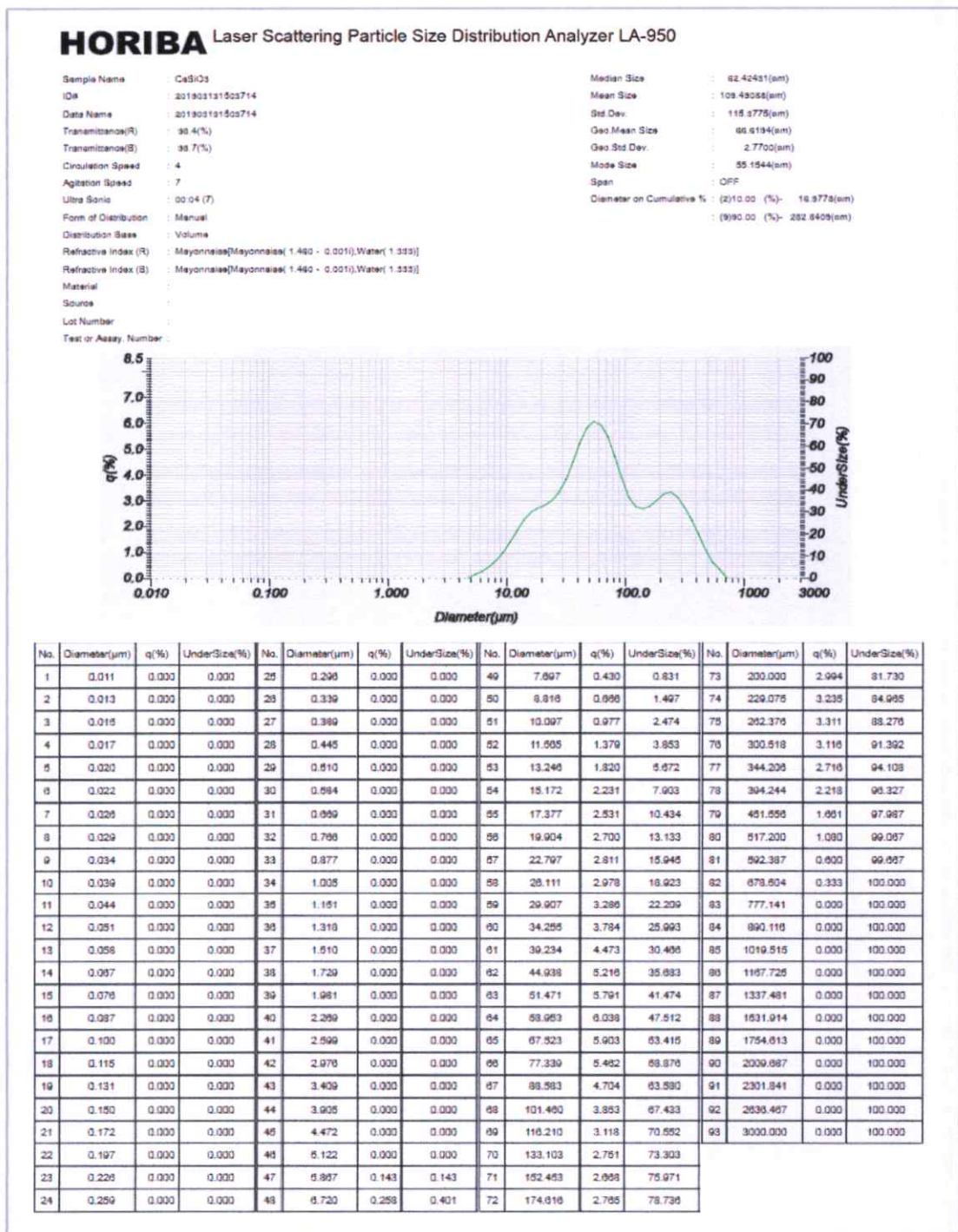
ภาคผนวก ก

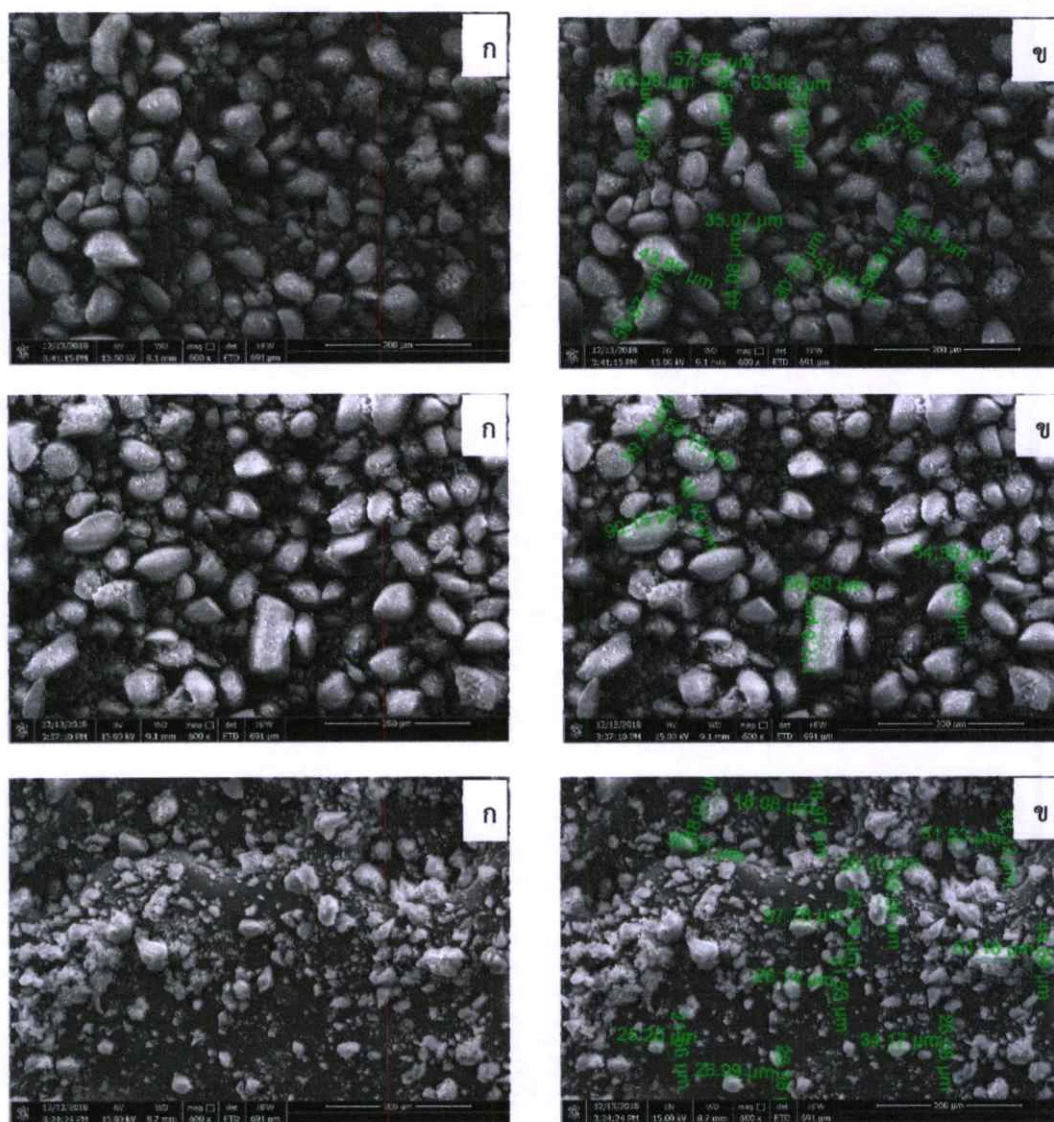
ผลการตรวจวิเคราะห์สารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์

ตารางที่ ก-1 เปอร์เซ็นต์ของธาตุในสารประกอบแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์

ธาตุ	Ca	Si	O
%ธาตุในองค์ประกอบ	31	26	43

ตารางที่ ก-2 ผลของการวัดขนาดอนุภาคแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering





รูปที่ ก-1 สัณฐานวิทยาของอนุภาคแคลเซียมซิลิเกตที่ได้จากการสังเคราะห์ (ก) และการวัดขนาดอนุภาคของแคลเซียมซิลิเกต (ข) จากการตรวจวัดด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 600 เท่า

ภาคผนวก ข

ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

ตารางที่ ข-1 ความหนาแน่นหลังทำการเชื่อมโยงของโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละสูตร

สูตร	ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ (g/cm ³)				
	ชั้นที่ 1	ชั้นที่ 2	ชั้นที่ 3	เฉลี่ย	SD
SC-0.5-30	0.1132	0.1109	0.1055	0.1099	0.0039
SC-0.5-60	0.1163	0.1208	0.1186	0.1185	0.0023
SC-0.5-120	0.1134	0.1113	0.1277	0.1175	0.0089
SC-1.0-30	0.1567	0.1443	0.1512	0.1507	0.0062
SC-1.0-60	0.1460	0.1356	0.1576	0.1464	0.0110
SC-1.0-120	0.1515	0.1469	0.1617	0.1534	0.0076
SC-1.5-30	0.1595	0.1593	0.1554	0.1581	0.0024
SC-1.5-60	0.1634	0.1723	0.1645	0.1667	0.0049
SC-1.5-120	0.1601	0.1671	0.1645	0.1639	0.0036
SC-0.5-60/1.5-60	0.1514	0.1397	0.1454	0.1455	0.0058
SC-1.5-120 (Diclofenac)	0.1825	0.1720	0.1732	0.1759	0.0057
S-1.5-120	0.1611	0.2016	0.1904	0.1844	0.0209

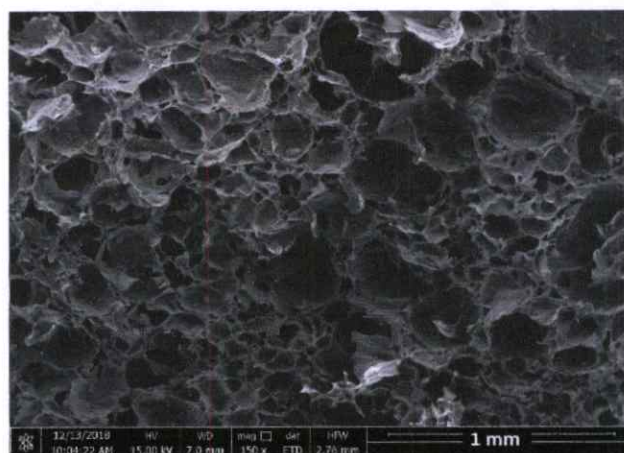
ตารางที่ ข-2 ปริมาตรที่เปลี่ยนแปลงหลังทำการเชื่อมโยงของโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละสูตร

สูตร	ปริมาตรที่เปลี่ยนแปลง (cm ³)				
	ชั้นที่ 1	ชั้นที่ 2	ชั้นที่ 3	เฉลี่ย	SD
SC-0.5-30	0.08	0.09	0.09	0.09	0.01
SC-0.5-60	0.11	0.10	0.10	0.10	0.01
SC-0.5-120	0.11	0.11	0.12	0.11	0.01
SC-1.0-30	0.10	0.10	0.10	0.10	0.00
SC-1.0-60	0.11	0.11	0.11	0.11	0.00
SC-1.0-120	0.11	0.11	0.11	0.11	0.00
SC-1.5-30	0.11	0.10	0.11	0.10	0.01
SC-1.5-60	0.12	0.12	0.12	0.12	0.00
SC-1.5-120	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00
SC-0.5-60/1.5-60	0.17	0.17	0.17	0.17	0.00
SC-1.5-120 (Diclofenac)	0.14	0.15	0.14	0.15	0.01
S-1.5-120	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00

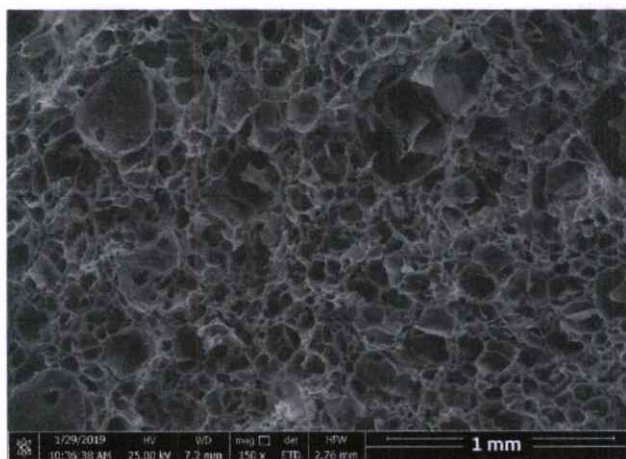
ตารางที่ ข-3 เปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละสูตร

สูตร	%ความเป็นรูพรุน			เฉลี่ย	SD
	ชั้นที่ 1	ชั้นที่ 2	ชั้นที่ 3		
SC	79	79	79	79	0
SC-0.5-30	70	66	67	68	2
SC-0.5-60	66	67	65	66	1
SC-0.5-120	73	70	73	72	2
SC-1.0-30	66	66	67	66	1
SC-1.0-60	66	62	65	64	2
SC-1.0-120	63	62	65	63	2
SC-1.5-30	64	62	63	63	1
SC-1.5-60	62	62	60	61	1
SC-1.5-120	61	62	58	60	2
SC-0.5-60/1.5-60	65	62	59	62	3
SC-1.5-120 (Diclofenac)	56	57	57	57	1
S-1.5-120	45	44	42	44	2

- สัณฐานวิทยาจากเทคนิค SEM



รูปที่ ข-1 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-30 ที่กำลังขยาย 150X



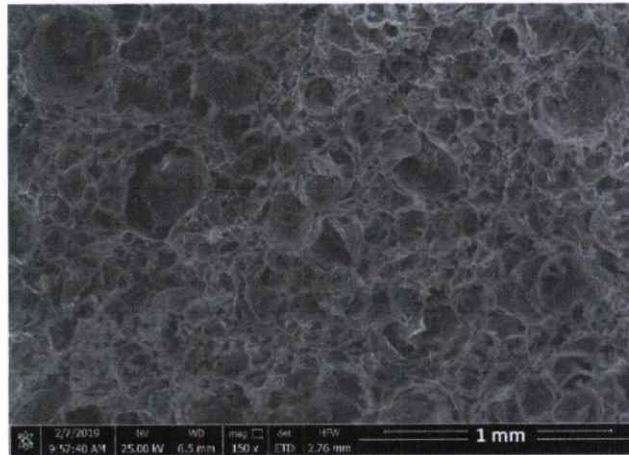
รูปที่ ข-2 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60 ที่กำลังขยาย 150X



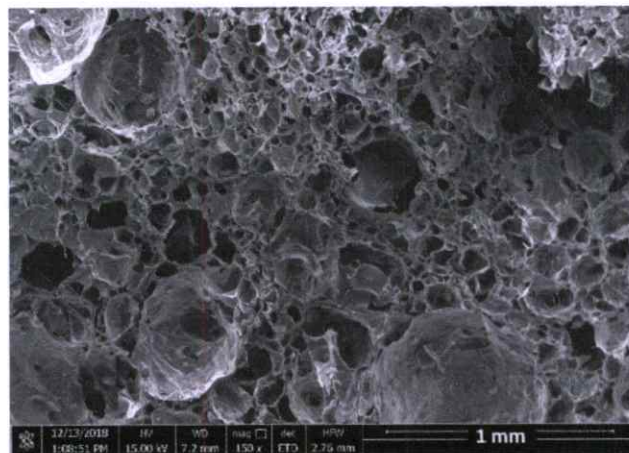
รูปที่ ข-3 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-120 ที่กำลังขยาย 150X



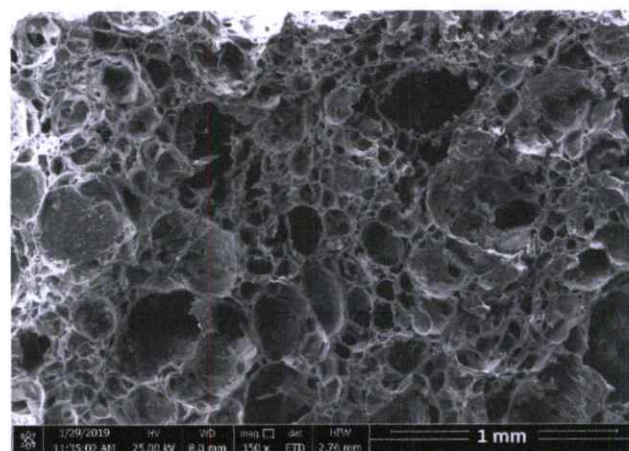
รูปที่ ข-4 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-30 ที่กำลังขยาย 150X



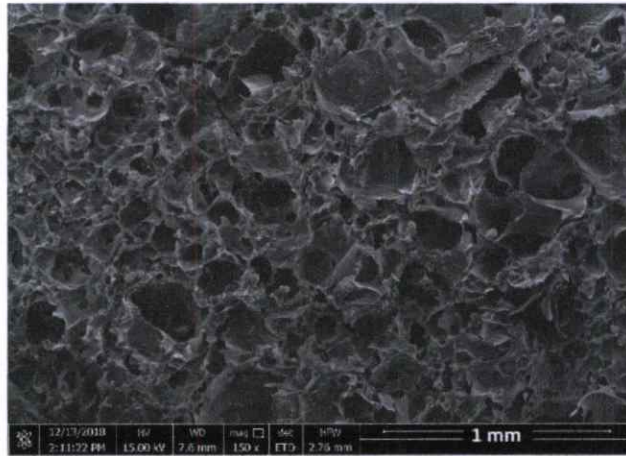
รูปที่ ข-5 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 ที่กำลังขยาย 150X



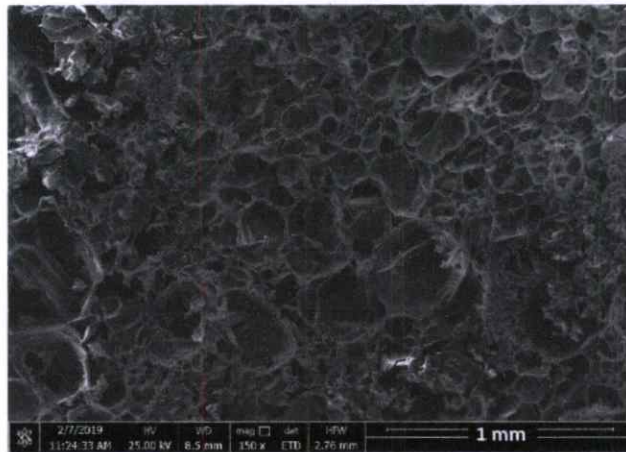
รูปที่ ข-6 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-120 ที่กำลังขยาย 150X



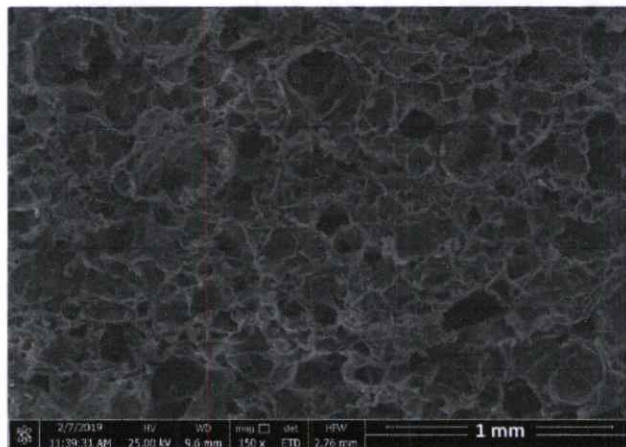
รูปที่ ข-7 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-30 ที่กำลังขยาย 150X



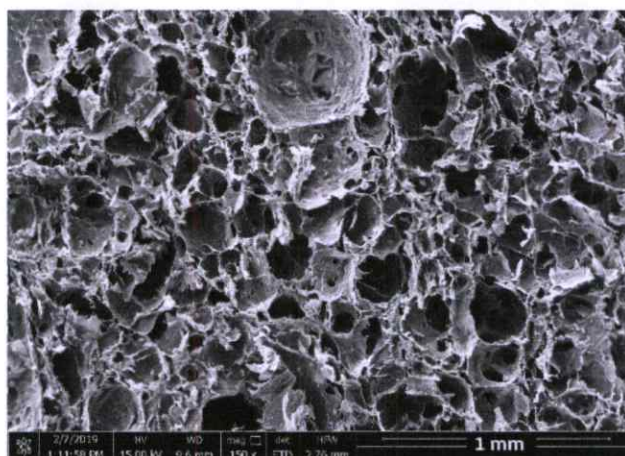
รูปที่ ข-8 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 ที่กำลังขยาย 150X



รูปที่ ข-9 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 ที่กำลังขยาย 150X

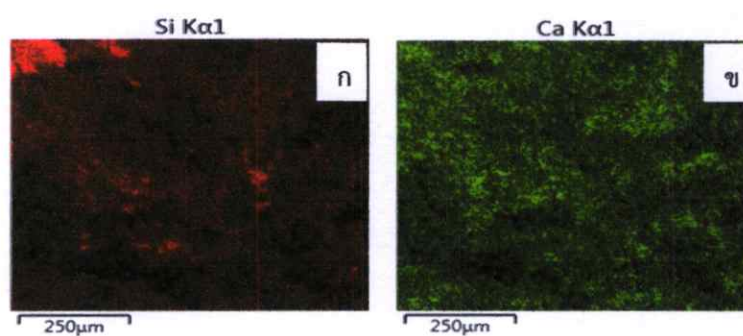


รูปที่ ข-10 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60/1.5-60 ที่กำลังขยาย 150X

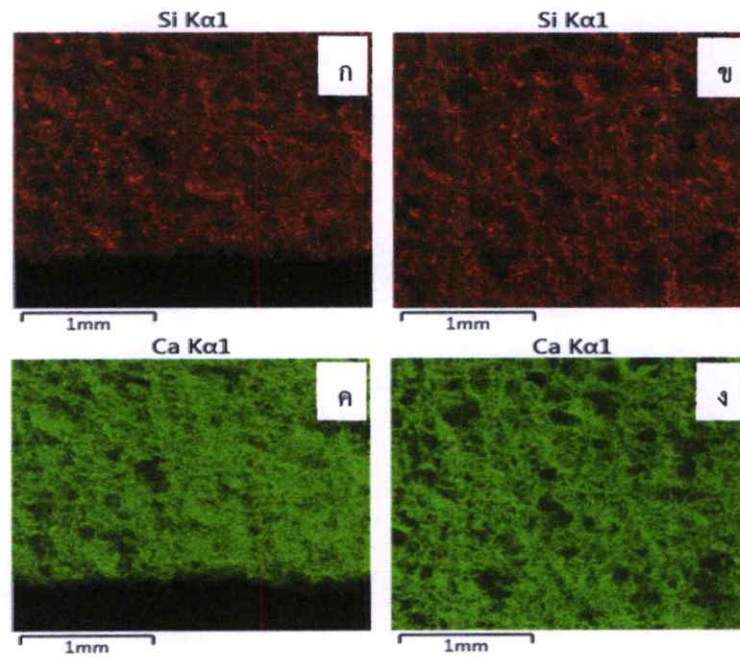


รูปที่ ข-11 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-120 (Diclofenac) ที่กำลังขยาย 150X

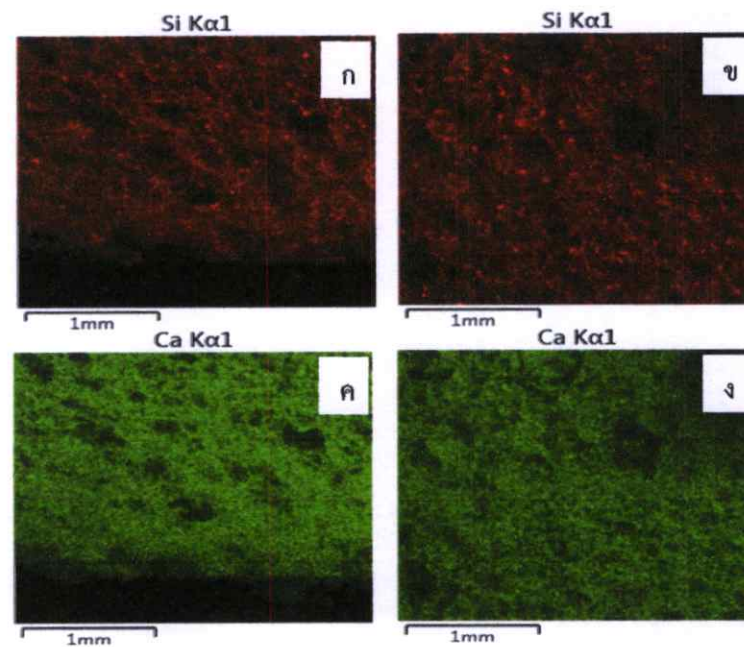
- สันฐานวิทยาจากเทคนิค SEM-EDS แสดงธาตุซิลิกอน (Si) และแคลเซียม (Ca) ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ



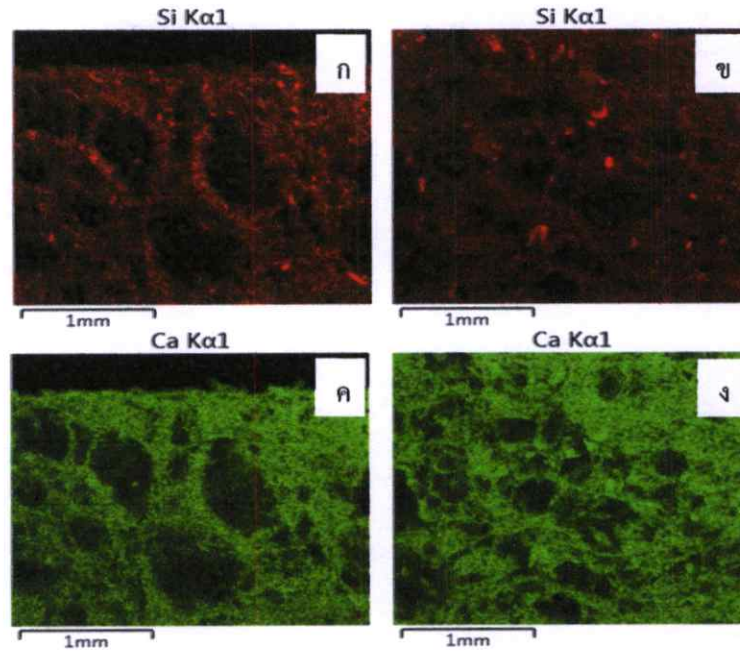
รูปที่ ข-12 ภาพตัดขวางบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC (ก) แสดงธาตุ Si และ (ข) แสดงธาตุ Ca



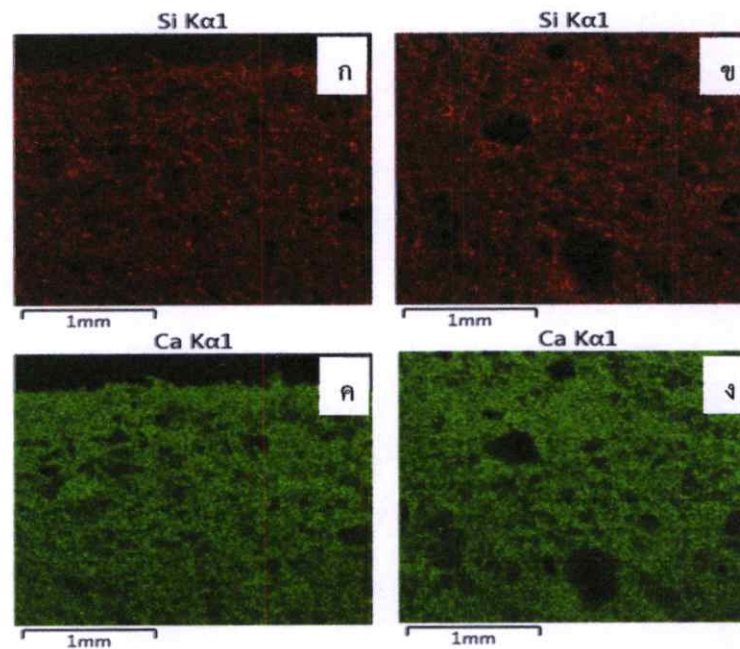
รูปที่ ข-13 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-30 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



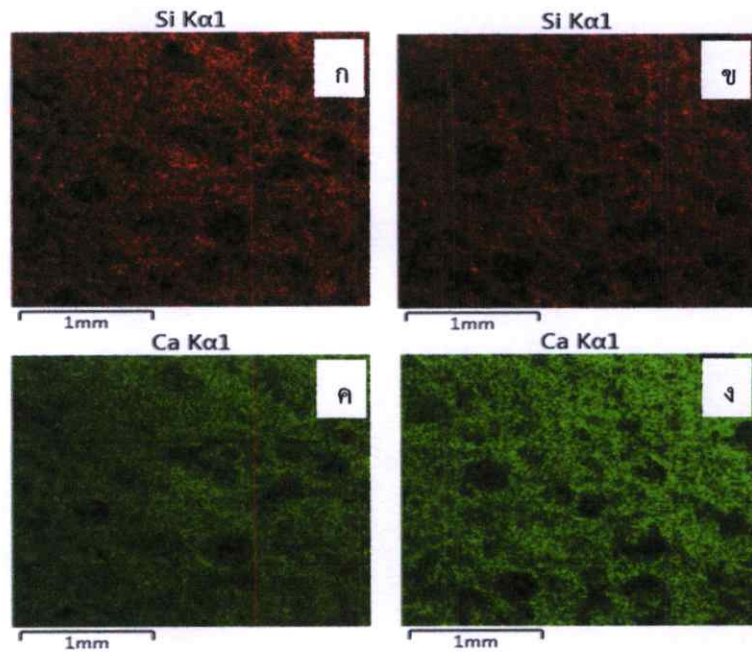
รูปที่ ข-14 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



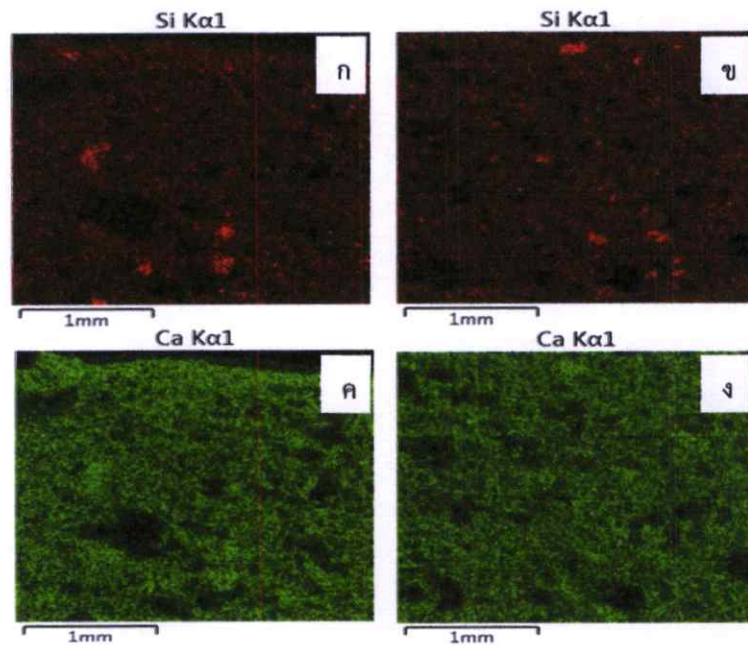
รูปที่ ข-15 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-0.5-120 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



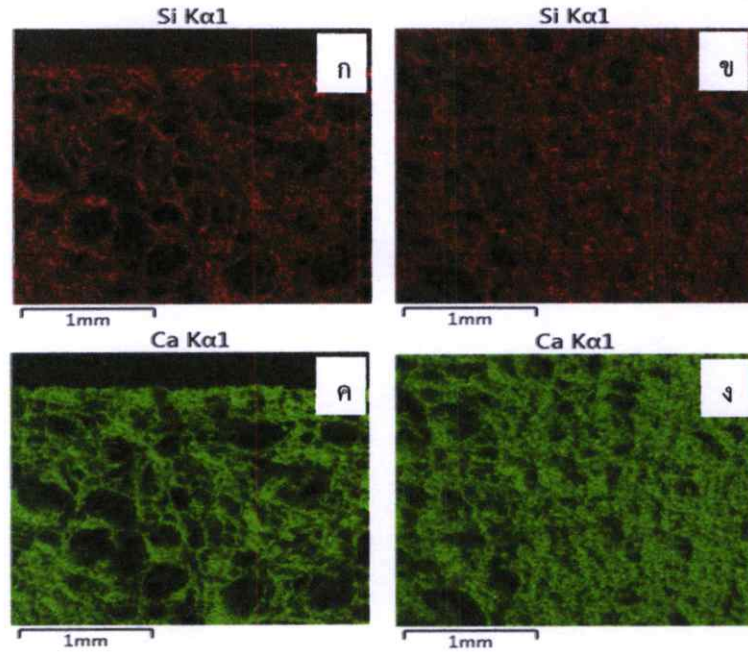
รูปที่ ข-16 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-30 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



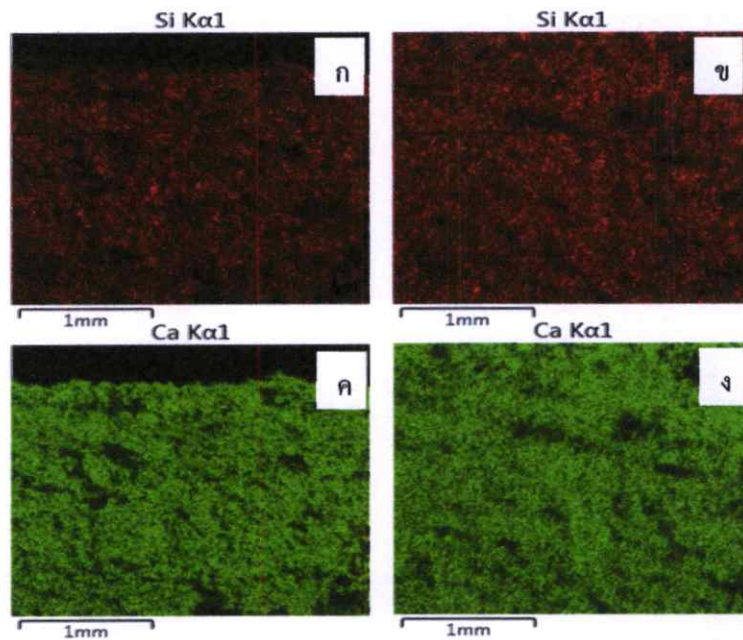
รูปที่ ข-17 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



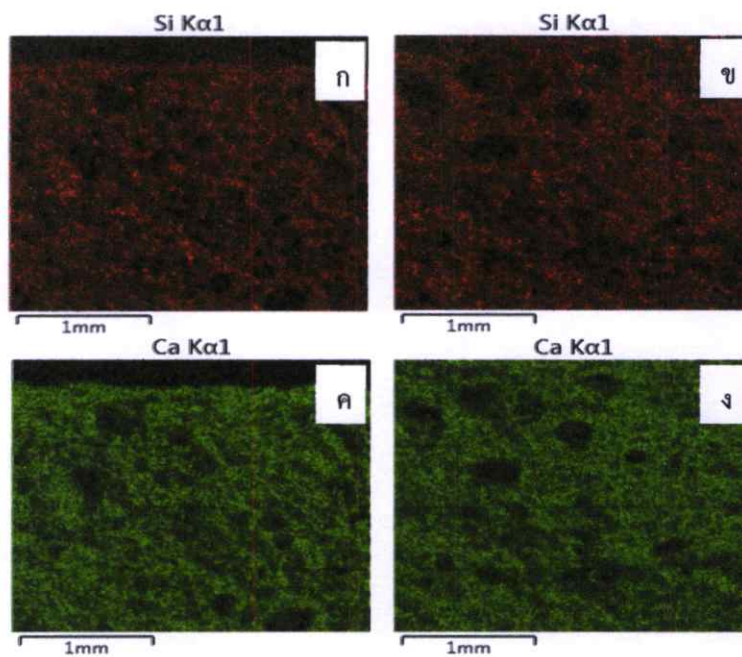
รูปที่ ข-18 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.0-120 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



รูปที่ ข-19 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-30 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



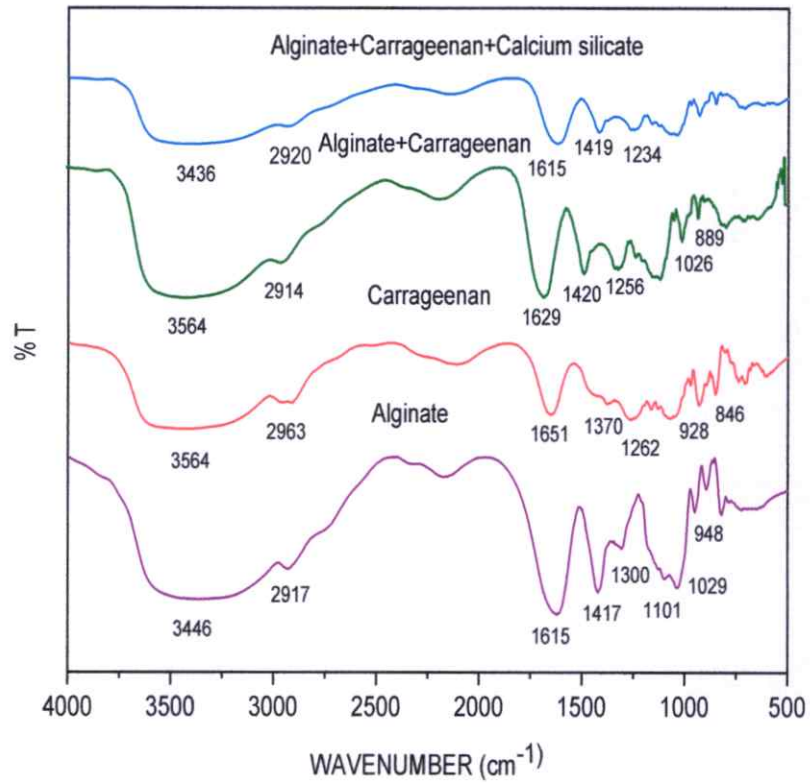
รูปที่ ข-20 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ



รูปที่ ข-21 ภาพตัดขวางของโครงเส้นใยเซลล์สูตร SC-0.5-60/1.5-60 (ก-ข) แสดงธาตุ Si บริเวณขอบ และกึ่งกลาง และ (ค-ง) แสดงธาตุ Ca บริเวณขอบ และกึ่งกลางของโครงเส้นใยตามลำดับ

ภาคผนวก ค

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์และโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ ด้วยเทคนิค FT-IR



รูปที่ ค-1 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์และโครงเลี้ยงเซลล์

ตารางที่ ค-1 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์และโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ จากเทคนิค FTIR

สูตร	ความถี่ (Frequencies, cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)
Alginate	3446	O-H stretching
	2917	C-H stretching
	1615	COO^- asymmetric stretching
	1417	COO^- symmetric stretching
	1101	C-O stretching
	948	C-O stretching of the anhydrogalactose
Carrageenan	3564	O-H stretching
	2901	C-H stretching
	1262	S=O stretching
	928	C-O stretching of the anhydrogalactose
	846	C-O-S stretching
Alginate+Carrageenan	3564	O-H stretching
	2914	C-H stretching
	1629	COO^- asymmetric stretching
	1420	COO^- symmetric stretching
	1128	C-O stretching
	1256	S=O stretching
	930	C-O stretching of the anhydrogalactose
Alginate+Carrageenan +Calcium Silicate	847	C-O-S stretching
	3418	O-H stretching
	2920	C-H stretching
	1615	COO^- asymmetric stretching
	1419	COO^- symmetric stretching
	1123	C-O stretching
	1256	S=O stretching
	928	C-O stretching of the anhydrogalactose
889	O-Si-O bend	

ตารางที่ ค-1 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์และโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ จากเทคนิค FTIR (ต่อ)

สูตร	ความถี่ (Frequencies, cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)
Alginate+Carrageenan +Calcium Silicate	853	C-O-S stretching
	459	Si-O-Si bend
S-1.5-120	3418	O-H stretching
	2925	C-H stretching
	1615	COO^- asymmetric stretching
	1417	COO^- symmetric stretching
	1127	C-O stretching
	1260	S=O stretching
	931	C-O stretching of the anhydrogalactose
	847	C-O-S stretching
SC-0.5-30	3431	O-H stretching
	2937	C-H stretching
	1635	COO^- asymmetric stretching
	1429	COO^- symmetric stretching
	1125	C-O stretching
	1261	S=O stretching
	932	C-O stretching of the anhydrogalactose
	854	C-O-S stretching
SC-0.5-60	3431	O-H stretching
	2937	C-H stretching
	1639	COO^- asymmetric stretching
	1431	COO^- symmetric stretching
	1119	C-O stretching
	1261	S=O stretching
	931	C-O stretching of the anhydrogalactose
	854	C-O-S stretching
SC-1.0-60	3431	O-H stretching
	2937	C-H stretching
	1639	COO^- asymmetric stretching
	1431	COO^- symmetric stretching
	1121	C-O stretching

ตารางที่ ค-1 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์และโครงสร้างเซลล์สูตรต่าง ๆ จากเทคนิค FTIR (ต่อ)

สูตร	ความถี่ (Frequencies, cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)
SC-1.0-60	1261	S=O stretching
	932	C-O stretching of the anhydrogalactose
	854	C-O-S stretching
SC-1.5-60	3431	O-H stretching
	2937	C-H stretching
	1639	COO ⁻ asymmetric stretching
	1431	COO ⁻ symmetric stretching
	1117	C-O stretching
	1261	S=O stretching
	932	C-O stretching of the anhydrogalactose
	854	C-O-S stretching
SC-1.5-120	3431	O-H stretching
	2937	C-H stretching
	1639	COO ⁻ asymmetric stretching
	1431	COO ⁻ symmetric stretching
	1117	C-O stretching
	1261	S=O stretching
	929	C-O stretching of the anhydrogalactose
	852	C-O-S stretching
S-1.5-120 (28 วัน)	3424	-O-H stretching
	2947	-C-H stretching
	1619	COO ⁻ asymmetric stretching
	1427	COO ⁻ symmetric stretching
	1121	C-O stretching
	1262	S=O stretching
	928	C-O stretching of the anhydrogalactose
	966	PO ₄ ³⁻ stretching
	611	PO ₄ ³⁻ bending
	560	PO ₄ ³⁻ bending
873	HPO ₄ ³⁻ bending	

ตารางที่ ค-1 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์และโครงสร้างเซลล์สูตรต่าง ๆ จากเทคนิค FTIR (ต่อ)

สูตร	ความถี่ (Frequencies, cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)
S-1.5-120 (28 วัน)	889	O-Si-O bend
	848	C-O-S stretching
	475	Si-O-Si bend
SC-0.5-30 (28 วัน)	3417	-O-H stretching
	2943	-C-H stretching
	1627	-C=O stretching
	1487	-COO ⁻ asymmetric stretching
	1066	-COO ⁻ symmetric stretching
	1261	C-O stretching
	932	C-O stretching of the anhydrogalactose
	968	PO ₄ ³⁻ stretching
	877	HPO ₄ ³⁻ bending
	605	PO ₄ ³⁻ bending
	561	PO ₄ ³⁻ bending
	889	O-Si-O bend
	854	C-O-S stretching
473	Si-O-Si bend	
SC-0.5-60 (28 วัน)	3464	O-H stretching
	2920	C-H stretching
	1632	COO ⁻ asymmetric stretching
	1425	COO ⁻ symmetric stretching
	1161	C-O stretching
	1258	S=O stretching
	930	C-O stretching of the anhydrogalactose
	966	PO ₄ ³⁻ stretching
	874	HPO ₄ ³⁻ bending
	608	PO ₄ ³⁻ bending
	563	PO ₄ ³⁻ bending
	889	O-Si-O bend
	851	C-O-S stretching
457	Si-O-Si bend	

ตารางที่ ค-1 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์และโครงสร้างเซลล์สูตรต่าง ๆ จากเทคนิค FTIR (ต่อ)

สูตร	ความถี่ (Frequencies, cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)
SC-1.0-60 (28 วัน)	3449	O-H stretching
	2920	C-H stretching
	1626	COO^- asymmetric stretching
	1429	COO^- symmetric stretching
	1163	C-O stretching
	1261	S=O stretching
	928	C-O stretching of the anhydrogalactose
	968	PO_4^{3-} stretching
	874	HPO_4^{3-} bending
	603	PO_4^{3-} bending
	567	PO_4^{3-} bending
	851	C-O-S stretching
	459	Si-O-Si bend
SC-1.5-60 (28 วัน)	3449	O-H stretching
	2920	C-H stretching
	1627	COO^- asymmetric stretching
	1425	COO^- symmetric stretching
	1167	C-O stretching
	1258	S=O stretching
	931	C-O stretching of the anhydrogalactose
	961	PO_4^{3-} stretching
	875	HPO_4^{3-} bending
	608	PO_4^{3-} bending
	567	PO_4^{3-} bending
	853	C-O-S stretching
	457	Si-O-Si bend
SC-1.5-120 (28 วัน)	3417	-O-H stretching
	2948	-C-H stretching
	1622	COO^- asymmetric stretching
	1428	COO^- symmetric stretching
	1159	C-O stretching
	1258	S=O stretching

ตารางที่ ค-1 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์และโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ จากเทคนิค FTIR (ต่อ)

สูตร	ความถี่ (Frequencies, cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)
SC-1.5-120 (28 วัน)	930	C-O stretching of the anhydrogalactose
	966	PO_4^{3-} stretching
	874	HPO_4^{3-} bending
	609	PO_4^{3-} bending
	566	PO_4^{3-} bending
	854	C-O-S stretching
	476	Si-O-Si bend

ภาคผนวก ง

ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร เปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือ และเปอร์เซ็นต์การเสียดสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C

ตารางที่ ง-1 ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ

สูตร	%ปริมาณน้ำที่คงอยู่ต่อน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์			
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
SC-0.5-30	781±53	784±97	810±143	824±118
SC-0.5-60	847±38	903±43	893±16	925±10
SC-0.5-120	688±49	790±27	724±23	611±127
SC-1.0-30	475±34	495±54	421±70	411±66
SC-1.0-60	469±35	496±107	494±117	508±135
SC-1.0-120	500±23	608±42	653±27	678±48
SC-1.5-30	420±15	435±25	423±45	367±18
SC-1.5-60	374±19	415±25	440±36	412±23
SC-1.5-120	353±15	390±38	381±19	336±59
SC-0.5-60/1.5-60	572±26	628±64	626±100	651±133
S-1.5-120	173±28	237±39	264±44	315±52

ตารางที่ ง-2 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงปริมาตร ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ

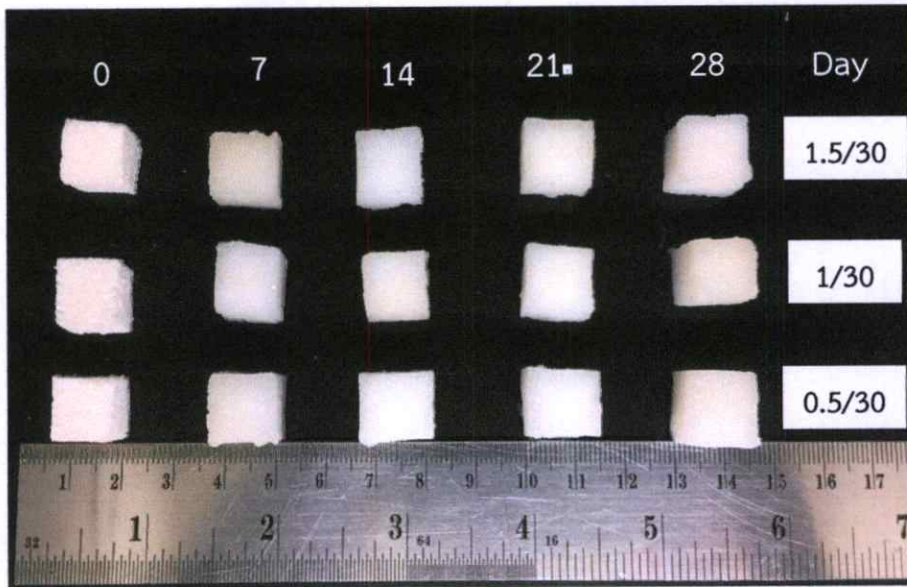
สูตร	%การเปลี่ยนแปลงปริมาตร			
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
SC-0.5-30	30±14	21±18	10±6	-24±9
SC-0.5-60	16±8	35±0	23±10	-19±5
SC-0.5-120	36±1	29±3	-12±10	-26±12
SC-1.0-30	24±5	25±4	12±1	-30±7
SC-1.0-60	14±2	17±6	9±4	-30±5
SC-1.0-120	40±8	30±4	6±7	-21±3
SC-1.5-30	21±7	8±5	-4±1	-36±2
SC-1.5-60	18±3	10±1	-3±0	-31±3
SC-1.5-120	9±1	5±4	3±3	-24±3
SC-0.5-60/1.5-60	36±6	31±10	5±4	-18±4
S-1.5-120	21±6	26±17	-7±3	-28±4

ตารางที่ ง-3 เปอร์เซ็นต์ปริมาณของแข็งคงเหลือ ในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ

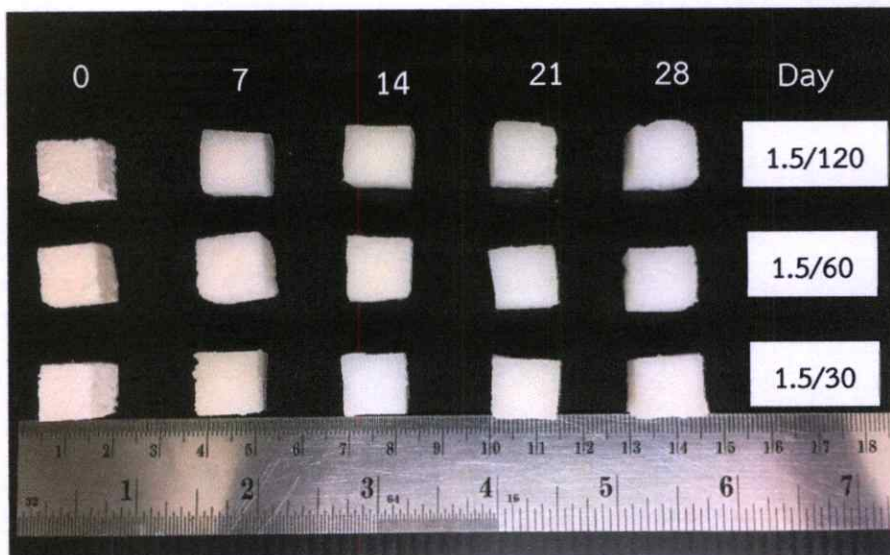
สูตร	%ปริมาณของแข็งคงเหลือ				
	ชั้นที่ 1	ชั้นที่ 2	ชั้นที่ 3	เฉลี่ย	SD
SC-0.5-30	64	65	70	66	3
SC-0.5-60	46	48	45	47	2
SC-0.5-120	39	51	59	50	10
SC-1.0-30	69	67	46	61	13
SC-1.0-60	55	54	55	55	1
SC-1.0-120	65	75	69	70	5
SC-1.5-30	43	46	42	44	2
SC-1.5-60	49	51	53	51	2
SC-1.5-120	67	66	63	65	2
SC-0.5-60/1.5-60	52	45	52	50	4
S-1.5-120	44	40	42	42	2

ตารางที่ ง-4 เปอร์เซ็นต์การเสียสภาพในสารละลาย SBF ที่อุณหภูมิ 37 °C ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ

สูตร	%การเสียสภาพ				
	ชั้นที่ 1	ชั้นที่ 2	ชั้นที่ 3	เฉลี่ย	SD
SC-0.5-30	36	35	30	34	3
SC-0.5-60	54	52	55	53	2
SC-0.5-120	61	49	41	50	10
SC-1.0-30	31	33	54	39	13
SC-1.0-60	45	46	45	45	1
SC-1.0-120	35	25	31	30	5
SC-1.5-30	57	54	58	56	2
SC-1.5-60	51	49	47	49	2
SC-1.5-120	33	34	37	35	2
SC-0.5-60/1.5-60	48	55	48	50	4
S-1.5-120	56	60	58	58	2



รูปที่ ง-1 โครงเลี้ยวเซลล์ก่อนแช่และหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (โครงเลี้ยวเซลล์เชื่อมโยงด้วย CaCl_2 ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที (โครงเลี้ยวเซลล์คนละชิ้น))



รูปที่ ง-2 โครงเลี้ยวเซลล์ก่อนแช่และหลังแช่ในสารละลาย SBF ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (โครงเลี้ยวเซลล์เชื่อมโยงด้วย CaCl_2 ความเข้มข้น 1.5 เป็นเวลา 30, 60, 120 นาที (โครงเลี้ยวเซลล์คนละชิ้น))

ภาคผนวก จ

ผลการทดสอบแรงกดอัด

ตารางที่ จ-1 ค่ามอดุลัสกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สุตร SC-1.5-120 ในสภาวะเปียก

Compressive Modulus (kPa)				
ชั้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
1	323	321	334	335
2	323	319	320	315
3	340	333	337	355
4	321	323	325	344
5	325	330	329	341
เฉลี่ย	326	325	329	338
SD	8	6	7	15

ตารางที่ จ-2 ค่าความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สุตร SC-1.5-120 ในสภาวะเปียก

Compressive Strength (kPa)				
ชั้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
1	78	79	78	81
2	79	79	79	84
3	78	77	78	84
4	82	82	83	82
5	78	80	79	86
เฉลี่ย	79	79	79	83
SD	2	2	2	2

ตารางที่ จ-3 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์สุตร SC-1.5-120 ในสภาวะเปียก

%Dimension change								
ชั้นที่	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4	
	Diameter	Height	Diameter	Height	Diameter	Height	Diameter	Height
1	0.61	-13.40	0.63	-14.63	0.82	-14.89	7.33	-19.22
2	0.59	-14.34	1.28	-14.33	0.54	-11.36	0.49	-12.59
3	0.19	-12.97	1.38	-12.53	0.28	-13.26	4.91	-14.23
4	-0.27	-12.85	0.17	-14.14	0.46	-14.92	0.76	-12.69
5	1.31	-14.11	1.14	-13.04	0.36	-15.92	3.70	-16.20
เฉลี่ย	0	-14	1	-14	0	-14	3	-15
SD	1	1	1	1	0	2	3	3

ตารางที่ จ-4 ค่ามอดูลัสกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สุตร S-1.5-120 ในสภาวะเปียก

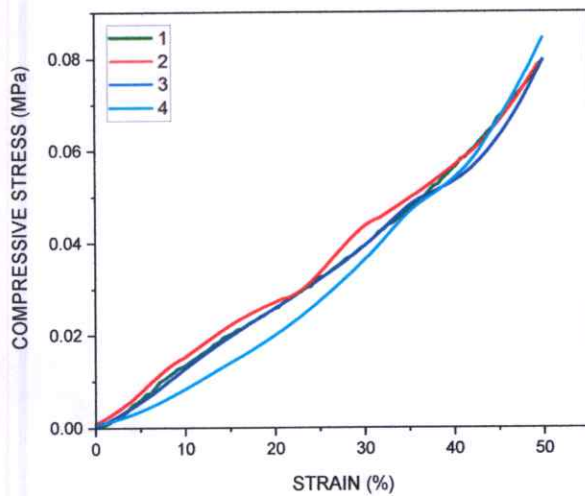
Compressive Modulus (kPa)			
ชั้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	117	117	152
2	120	121	173
3	119	119	189
4	136	137	132
5	120	122	152
เฉลี่ย	122	123	160
SD	8	8	22

ตารางที่ จ-5 ค่าความแข็งแรงกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์สุตร S-1.5-120 ในสภาวะเปียก

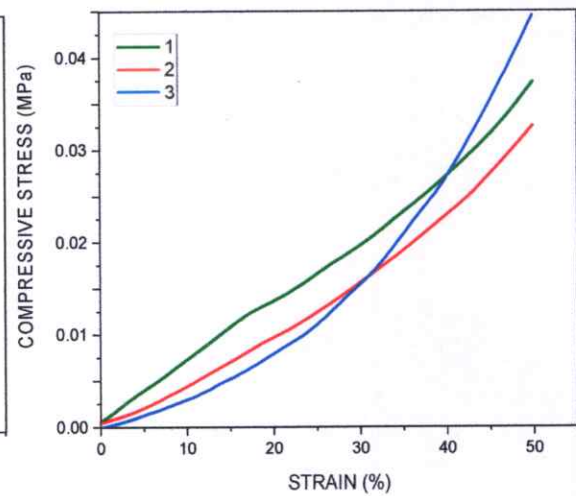
Compressive Strength (kPa)			
ชั้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	33	33	35
2	29	31	30
3	30	30	35
4	37	36	44
5	33	34	46
เฉลี่ย	32	33	38
SD	3	3	7

ตารางที่ จ-6 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร S-1.5-120 ในสภาวะเปียก

%Dimension change						
ชั้นที่	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Diameter	Height	Diameter	Height	Diameter	Height
1	0.06	-8.86	1.71	-13.52	1.78	-15.18
2	0.00	-8.91	0.43	-9.72	1.57	-19.86
3	-0.01	-11.34	0.48	-10.83	1.16	-27.25
4	0.73	-9.96	0.37	-12.77	1.51	-23.18
5	0.29	-8.50	0.00	-5.18	3.24	-8.11
เฉลี่ย	0	-10	1	-10	2	-19
SD	0	1	1	3	1	7



(1) SC-1.5-120



(2) S-1.5-120

รูปที่ จ-1 พฤติกรรมของความเค้น (Stress) กับความเครียด (Strain) ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร SC-1.5-120 และ S-1.5-120 ในแต่ละครั้งของการทดสอบแรงกดอัดในสภาวะเปียก

ภาคผนวก ฉ

ผลการศึกษาพฤติกรรมการปลดปล่อยตัวยาเบื้องต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

ตารางที่ ฉ-1 เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาโคคลีฟแลนคของโครงเลี้ยงเซลล์

ครั้งที่	เวลา	%การปลดปล่อยยา	SD
1	0 นาที	0	0.00
2	15 นาที	12	0.05
3	30 นาที	18	0.19
4	45 นาที	18	0.00
5	1 ชั่วโมง	21	0.12
6	2 ชั่วโมง	26	0.19
7	3 ชั่วโมง	30	0.36
8	4 ชั่วโมง	33	0.04
9	6 ชั่วโมง	37	0.31
10	8 ชั่วโมง	39	0.47
11	12 ชั่วโมง	48	1.17
12	16 ชั่วโมง	50	0.51
13	20 ชั่วโมง	51	0.70
14	1 วัน	55	0.28
15	2 วัน	60	0.20
16	3 วัน	63	0.22
17	4 วัน	66	0.74
18	5 วัน	67	0.85
19	6 วัน	71	2.28
20	7 วัน	73	1.86
21	9 วัน	82	0.01
22	11 วัน	86	0.41
23	13 วัน	94	0.03
24	15 วัน	99	0.10
25	17 วัน	100	0.14

ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์

ตารางที่ ข-1 ผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์

ลำดับ	สูตร	%Cytotoxicity				
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย	SD
1	SC-1.5-120	3.56	3.97	4.66	4.06	0.55
2	SC-1.5-120 (Diclofenac)	9.14	8.97	9.66	9.25	0.36

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอมรา สาเทียน
วัน เดือน ปีเกิด	5 มกราคม พ.ศ. 2538
ที่อยู่ปัจจุบัน	14 ซอยจันทร์ประสงค์ เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10520
ประวัติการศึกษา	ปี 2559 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 3.13 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Ammara Sathain, Punnama Siriphannon and Pathavuth Monvisade. "Porous Alginate/Carrageenan and Calcium Silicate Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering." The Proceeding of The International Polymer Conference of Thailand (PCT-9), During June 13 th – 14 th , 2019 at Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. : 86-91.