

การศึกษาการเคลือบสารกระตุ้นทางชีวภาพลงบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เตรียมจากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตใน
ระดับหลอดทดลอง และการศึกษาเชิงเปรียบเทียบและจำลองการขึ้นรูปแบบการสร้างต้นแบบรวดเร็ว

**An In-vitro Study of Coating Bioactive Agents onto Scaffolds Prepared from Poly(butylene succinate)
and Comparative Study and Simulation of Rapid Prototyping Technique**

นางสาวเบญจารีย์ พุ่มศิริ 50055136

อ. พรทิพย์ เล็กพิทยา

ภาควิชาวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทร. 0-2549-3429, 0-2549-3420 โทรสาร 0-2549-3422 E-mail: fengptlk@ku.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเคลือบสารกระตุ้นทางชีวภาพลงบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ (Scaffold) ที่เตรียมโดยเทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤติ จากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้ว โดยสารกระตุ้นทางชีวภาพที่ใช้ในการทดลองคือคอลลาเจน และไฮดรอกซีอะปาทิต (HA) ซึ่งใช้ในปริมาณที่ต่างกัน การเชื่อมขวางทางเคมีระหว่างหมู่เอมิโน (-NH₂) ในคอลลาเจน และหมู่คาร์บอกซิลเลต (-COO⁻) ใน HPBS ทำให้เกิดพันธะเอไมด์ ซึ่งยืนยันโดยเทคนิค FT-IR ปริมาณของคอลลาเจนและไฮดรอกซีอะปาทิตที่เคลือบลงบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์จะวัดได้โดยการชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์หาธาตุองค์ประกอบ พบว่าเมื่อใช้ปริมาณสารกระตุ้นทางชีวภาพที่เข้มข้นขึ้น จะส่งผลให้การเคลือบสารติดได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ปริมาณของ HA ที่เคลือบอยู่บนวัสดุจะมากขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการเคลือบด้วย จากผลการทดสอบด้านเซลล์ พบว่าเมื่อผ่านไป 35 วัน ปริมาณเซลล์คอนไดรโรไซต์จะพบมากบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เคลือบด้วยไฮดรอกซีอะปาทิต 10% w/v ยืนยันจากการวิเคราะห์ RT-PCR ว่ามีระดับยีนที่จำเพาะกับกระดูกอ่อนมากที่สุดด้วย งานวิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการซ่อมแซมกระดูกอ่อนบริเวณข้อเข่า (Meniscus) โดยเทคนิคการสร้างต้นแบบรวดเร็ว พบว่าเป็นวิธีที่สามารถควบคุมขนาดของรูพรุน รูปร่างของรูพรุน การเชื่อมต่อกันของรูพรุน และโครงสร้างภายในของวัสดุดีกว่าเทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤติ รวมถึงสามารถสร้างชิ้นงานที่มีความซับซ้อนได้ด้วย

คำสำคัญ เทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤติ ไฮดรอกซีอะปาทิต คอลลาเจน วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ เทคนิคการสร้างต้นแบบรวดเร็ว

Abstract

This research emphasized on coating bioactive agents onto hydrolyzed poly(butylene succinate) (H-PBS) scaffolds prepared by Supercritical Fluids Technique (SCF). The bioactive agents used in this study which were collagen and hydroxyapatite (HA) were employed at different contents. Chemical crosslinking between amino groups (-NH₂) in collagen and carboxylate groups (-COO⁻) in HPBS, leading to amide linkages, was evidenced by FT-IR. The contents of collagen or HA coated on the HPBS scaffolds were quantitatively determined by a gravimetric method and elemental analysis. It was found that the higher the content of the bioactive agent initially employed, the greater the content of the bioactive agent apparently coated. Furthermore, the deposition of HA on HPBS was directly influenced by the soaking time of HPBS in HA suspension. Cell proliferation results revealed that, at 35-day culture period, the highest number of chondrocyte cells was observed on the HPBS scaffold coated with 10% w/v HA suspension. In accordance with the proliferation results, RT-PCR analysis showed the highest expression levels of cartilage-specific genes. The research also focused on fabrication scaffolds for meniscus repair in cartilage tissue engineering. The technique used to compare with SCF technique was Rapid Prototyping (RP). The RP technique could better control pore sizes, pore morphology, and internal structure of scaffolds than SCF technique. Besides, RP could introduce more complex shape to a part.

Keywords: Supercritical Fluids Technique, Hydroxyapatite, Collagen, Scaffolds, Rapid Prototyping

1. บทนำ

วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ (Scaffold) เป็นวัสดุทางการแพทย์ที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอวัยวะในร่างกายมนุษย์ มีลักษณะเป็นรูพรุนเป็นช่องว่างเพื่อให้เซลล์ตั้งต้นสามารถเจริญเติบโตเข้าไปภายใน (Ingrowths) ได้ โดยรูพรุนดังกล่าวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในระดับไมครอนและมีต้องขนาดที่จำเพาะกับชนิดของเซลล์ที่นำมาปลูก นอกจากนี้ วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ต้องมีสมบัติทางชีวภาพที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตและสภาวะภายในร่างกาย สิ่งมีชีวิต กล่าวคือ ต้องมีความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Non-cytotoxic) มีความสามารถในการกระตุ้นทางชีวภาพ (Bioactive) และอาจสามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ (Biodegradable) ในกรณีที่ไม่ต้องการให้วัสดุเหลืออยู่ในร่างกายมนุษย์ เมื่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ได้เสร็จสิ้นแล้ว

ในการศึกษานี้จะทำการทดลองโดยใช้วัสดุชนิดพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีความเหมาะสมทางชีวภาพ คือ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate, PBS) มาเป็นวัสดุในการทำเป็นวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ โดยทำการศึกษาดังแต่การขึ้นรูปด้วยเทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤติ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (Supercritical Fluid-CO₂) โดยมีอุณหภูมิ ความดัน เวลาที่ใช้ในการขึ้นรูป และเวลาที่ใช้ในการปล่อยแก๊สออก เป็นตัวแปรหลัก จากการขึ้นรูปจะได้เป็นวัสดุไมโครเซลล์ลาร์โฟม (Microcellular Foam) ซึ่งมีรูพรุนในระดับไมครอน และมีขนาดต่างๆกันไป จึงต้องทำการศึกษาค่าตัวแปรควบคุมทั้งสี่อย่างที่กล่าวมา เพื่อให้ขนาดของรูพรุนเหมาะสมที่สุด และการกระจายตัวของขนาดรูพรุนแคบลงให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากนั้นนำพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่ขึ้นรูปเป็นไมโครเซลล์ลาร์โฟมมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เพื่อทำการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุไมโครเซลล์ลาร์โฟมทั้งในด้านขนาดของรูพรุน และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพื้นผิว การทำปฏิกิริยาจะเกิดบนสายโมเลกุลของพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตในส่วนที่เป็นหมู่ฟังก์ชันเอสเตอร์ (Ester) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ระดับ pH ต่างๆ เพื่อหาค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาบนวัสดุ การปรับปรุงพื้นผิวของไมโครเซลล์ลาร์โฟมนี้เชื่อว่าจะสามารถเพิ่มสมบัติความชอบน้ำ (Hydrophilicity) และความขรุขระให้กับผิวหน้า ซึ่งส่งผลกระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโตดีขึ้น ในการทดลองส่วนนี้จะมีการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของรูพรุนด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

ในส่วนของการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเคลือบผิว จะใช้สารกระตุ้นทางชีวภาพสองชนิดคือ คอลลาเจน และไฮดรอกซีอะปาทาइट แยกกรณีในการศึกษา สาระละลายคอลลาเจนจะทำการเคลือบ

ด้วยใช้โครงสร้างเชื่อมขวาง และสารละลายไฮดรอกซีอะปาทาइट จะใช้การผลึกอนุภาคของไฮดรอกซีอะปาทาइटซึ่งมีขนาดในระดับนาโนเมตรด้วยคลื่นเสียงพลังงานสูง (Ultrasonic Wave) ให้เข้าไปติดอยู่ภายในวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ การศึกษาจะศึกษาการเตรียมสารละลายในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เพื่อนำมาเคลือบบนผิววัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ กล่าวคือ ความเข้มข้นของสารกระตุ้นทางชีวภาพในสารละลาย เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา หรือในการกระตุ้นด้วยคลื่นเสียงพลังงานสูง และอุณหภูมิที่ใช้ในการเคลือบ โดยการเคลือบวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยสารกระตุ้นทางชีวภาพนี้จะช่วยส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์ รวมทั้งเพิ่มสมบัติการกระตุ้นทางชีวภาพ และความชอบน้ำให้แก่วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์อีกด้วย

การทดสอบสมบัติของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เคลือบสารกระตุ้นทางชีวภาพแล้วนั้นจะใช้เทคนิคการทดสอบต่างๆ นอกจากการทดลองเพาะเซลล์กระดูกอ่อนในระดับหลอดทดลองบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แล้ว คือ เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) เพื่อใช้ในการถ่ายภาพของพื้นผิวและลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิคการวิเคราะห์ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน (CHN Analysis) เทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FT-IR Spectroscopy) และเทคนิค Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุและโครงสร้างทางเคมี รวมทั้งการหาน้ำหนักที่เปลี่ยนไปของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์เมื่อทำการเคลือบสารกระตุ้นทางชีวภาพแล้ว

ในปัจจุบันนอกจากวิธีการขึ้นรูปแบบ Supercritical Fluids แล้ว ยังมีเทคนิควิธีอื่นๆมากมาย เทคนิคหนึ่งที่ทันสมัยและน่าสนใจ อีกทั้งมีการนำมาใช้งานเพื่อขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์อย่างแพร่หลายคือ เทคนิคสร้างต้นแบบรวดเร็ว (Rapid Prototyping) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถกำหนดทิศทางการเติมเนื้อวัสดุโดยใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมอัตราการไหลวัสดุและตำแหน่งการเติมเนื้อวัสดุ จึงสามารถแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในเทคนิค Supercritical Fluids เช่น ข้อจำกัดทางความซับซ้อนของชิ้นงาน และการกระจายตัวของรูพรุน เป็นต้น

การศึกษานี้จึงมีเป้าหมายในการศึกษาแบ่งเป็นสองส่วนด้วยกัน ส่วนแรกคือ การศึกษาการเคลือบสารกระตุ้นทางชีวภาพลงบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่ขึ้นรูปจากเทคนิค Supercritical Fluids และส่วนที่สองคือ การศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค Supercritical Fluids ซึ่งเป็นเทคนิคดั้งเดิม กับเทคนิค Rapid Prototype ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความก้าวหน้าสูงกว่า รวมทั้งการทดลองทำ Simulation เพื่อสามารถใช้ในการศึกษาต่อเนื่องในอนาคตได้ต่อไป

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เม็ดพลาสติกพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต, แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Laboratory Grade), คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากหนังปลาทะเลแบบผง จากบริษัท T.C. Union Global Public Co.,Ltd., EDC (Mw 191.71) และ NHS

(Mw 115.09) ผลิตโดยบริษัท Aldrich, Phosphate Buffer Solution pH 5.7, สารละลาย NaOH ของบริษัท Aldrich, ผงไฮดรอกซีอะปาไทด์บริสุทธิ์ ผลิตโดยบริษัท Inui Corporation, Japan

3. การดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์จากพอลิเบททีลินซัลฟิเนท ด้วยเครื่อง High Pressure Supercritical Fluid

บรรจุเม็ดพลาสติก PBS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ยาว 3-4 มิลลิเมตร ปริมาณ 10g ลงในกระบอกรับแรงดันสูง (PARR) ให้ความร้อน โดยอุณหภูมิที่ใช้คือ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที (Preheating) เพื่อหลอมให้พลาสติกที่อยู่ในสภาพที่โมเลกุลมีการเคลื่อนไหวออกห่างจากกัน และมีช่องว่างภายในโมเลกุลมากขึ้น เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาที ทำการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหลวอึมตัวเข้าไปในกระบอกรับแรงดันสูง และปรับค่าความดันให้เท่ากับ 15 MPa ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหลวจะแทรกตัวอยู่ระหว่างพอลิเมอร์เหลวตามเวลาที่กำหนด (Soaking Time) นั่นคือ 120 นาที จากนั้นลดความดัน โดยปล่อยก๊าซออกอย่างรวดเร็ว (Vent Time) ใช้เวลาเพียง 1 วินาที จากนั้นนำชิ้นงานออกจากกระบอกรับแรงดันสูง วัสดุไมโครเซลลูโลสโพรที่ไดจากการทดลองจะระบุรหัสผลิตภัณฑ์ เป็น PBS

3.2 การปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุไมโครเซลลูโลสโพรที่ขึ้นรูปโดยเทคนิค Supercritical Fluid – CO₂

นำวัสดุไมโครเซลลูโลสโพรที่ขึ้นรูปได้จากเทคนิค Supercritical Fluids – CO₂ มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เพื่อทำการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วย สารละลาย 0.3M NaOH ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย DI Water เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 5 ครั้ง หรือจนกว่าน้ำที่ล้างจะมีค่า pH เท่ากับ 7 วัสดุไมโครเซลลูโลสโพรที่ปรับปรุงพื้นผิวแล้วจะระบุรหัสผลิตภัณฑ์ เป็น H-PBS

3.3 การศึกษาการเตรียมวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจน

ทำการละลายคอลลาเจนใน Phosphate Buffer Solution ที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 20% w/v จากนั้นเติมสารก่อกวนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง นั่นคือ EDC และ NHS ลงในคอลลาเจนที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักคือ EDC: NHS: Collagen เท่ากับ 0.15: 0.09: 1 ใช้วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้ทำการปรับปรุงพื้นผิวแล้วจุ่มลงในสารละลายคอลลาเจน แล้วนำไปอบในเตาที่ความร้อน 80°C เป็นเวลา

2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว นำชิ้นงานตัวอย่างไปล้างด้วย DI Water เพื่อล้างคอลลาเจนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกไปก่อนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ การระบุรหัสผลิตภัณฑ์เช่น H-PBS/10Col นั้นหมายความว่า ใช้วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผ่านการปรับปรุงพื้นผิวแล้ว เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจนที่มีความเข้มข้น 10% w/v

3.4 การศึกษาการเตรียมวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เคลือบด้วยไฮดรอกซีอะปาไทด์

ในขั้นเริ่มต้นผงไฮดรอกซีอะปาไทด์จะนำไปผสมกับ DI Water ให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอย โดยใช้ความเข้มข้นของไฮดรอกซีอะปาไทด์ที่ 5%, 10% และ 20% w/v จากนั้นจะใช้วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผ่านการปรับปรุงพื้นผิวแล้วแช่ลงในสารแขวนลอยดังกล่าว และใช้เทคนิคการสั่นโดยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Wave) เป็นเวลาต่างๆกันคือ 30, 60 และ 120 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ให้ล้างวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์เหล่านั้นด้วย DI Water เพื่อให้อนุภาคผงไฮดรอกซีอะปาไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาหลุดออกมาก่อนนำไป Freeze-dry รหัสผลิตภัณฑ์ที่ใช้ระบุจะมาจากความเข้มข้นของไฮดรอกซีอะปาไทด์ที่ใช้ และระยะเวลาในการแช่ เช่น H-PBS/10HA/60 หมายความว่า วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์นี้เตรียมโดยใช้ไฮดรอกซีอะปาไทด์ที่มีความเข้มข้น 10% w/v และใช้เวลาในการแช่ 60 นาที

3.5 การวิเคราะห์หลักคุณลักษณะเฉพาะของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์

องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ชนิด H-PBS ทั้งก่อนและหลังการเคลือบด้วยสารกระตุ้นทางชีวภาพจะวิเคราะห์โดย FT-IR Spectroscopy (Perkin Elmer System 2000 FTIR) และ CHN Analysis (Leco TruSpec) และเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการเคลือบลงบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ ปริมาณของคอลลาเจนและไฮดรอกซีอะปาไทด์ที่เคลือบบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ H-PBS จะหาว่าหนักที่เพิ่มขึ้นด้วยวิธี Gravimetric Method ตามสมการต่อไปนี้

$$\%WG = (W_a - W_b) / W_a \times 100$$

โดยที่ W_a และ W_b คือน้ำหนักของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ก่อนและหลังเคลือบ ตามลำดับ

ไฮดรอกซีอะปาไทด์ที่เคลือบบนตัวอย่าง H-PBS จะทดสอบด้วยเทคนิค EDS (Oxford model INCA 300) เพื่อหาร้อยละของธาตุแคลเซียม

3.6 การวิเคราะห์ผลเชิงชีวภาพ

การวัดจำนวนเซลล์

จำนวนเซลล์ที่เติบโตบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ใช้เทคนิค Alamar Blue assay ซึ่งสัมพันธ์กับเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่มีชีวิต หลังจากการบ่มเซลล์ตามเวลาที่กำหนด นำเซลล์มาบ่มต่อในสีย้อม Resazurin เป็นเวลา 4

ช่วงโมม และนำเอาลิซียมที่เปลี่ยนสีไปทดสอบค่าดูดกลืนพลังงานที่ความถี่ 530 และ 590nm

การวิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์

กระดูกอ่อน เช่น Aggrecan และ Collagen type II หลังจากการบ่มเซลล์เป็นเวลา 35 วัน ทำการสกัด mRNA ออกมาจากเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ และนำมาทำปฏิกิริยา Reverse-transcription ให้อยู่ในรูปของ cDNA การวิเคราะห์จะทำการหาชิ้นที่นำเสนอในและ GAPDH ซึ่งเป็นยีนควบคุม ผลการทดสอบ PCR จะได้จากการทำ Electrophoresis บน 2% agarose gel

3.7 การศึกษาขั้นต้นเกี่ยวกับการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยวิธีต้นแบบรวดเร็ว (Rapid Prototype)

การศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยวิธีดั้งเดิม และวิธีก้าวหน้า

การศึกษาได้ทำเพื่อเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสีย และ

ความก้าวหน้าของการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่ต้องการความแม่นยำมากขึ้น โดยได้เลือกใช้เทคนิค Supercritical Fluids ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการขึ้นรูปชิ้นงานวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ในการศึกษาก่อนหน้านี้ ให้เป็นวิธีดั้งเดิม และเลือกเอาเทคนิค Rapid Prototype มาเป็นวิธีก้าวหน้า การศึกษาจะทำโดยการตรวจสอบทฤษฎีและข้อมูลจากงานวิจัย และบทความทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง พร้อมทั้งทำการหาวิธี Rapid Prototype ที่เหมาะสมกับการขึ้นรูปชิ้นงาน ตั้งสมมติฐานของขั้นตอนการทำ วิเคราะห์ และสรุปผล

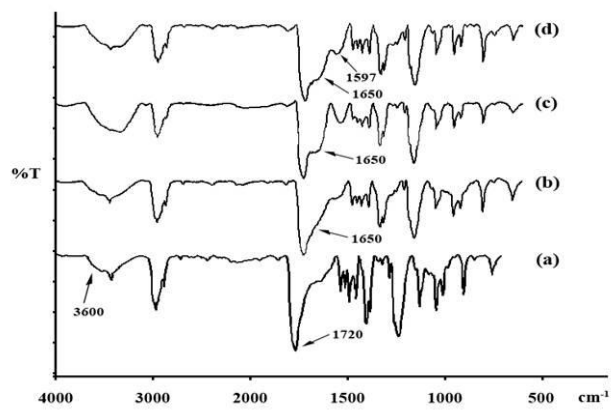
การศึกษาย้อนในการขึ้นรูปด้วยวิธี Rapid Prototype ด้วยการจำลอง (Simulation)

ทำการจำลองการขึ้นรูปด้วยวิธี Rapid Prototype ของวัสดุรองรับเซลล์ที่จะนำไปใช้แทนที่ Meniscus บริเวณเข่า โดยการแบ่งเป็นชั้น (Layer) ของชิ้นงานเริ่มต้นจากการวาดภาพโดยใช้ไฟล์ CAD ในโปรแกรม ProEngineer ให้มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับชิ้นกระดูกอ่อน Meniscus บริเวณเข่า จากนั้นส่งไฟล์ไปยังโปรแกรม Unigraphic (UG) เพื่อทำการเริ่มตั้งค่าเพื่อทำ Simulation แล้วเขียนรหัสการทำงานในไฟล์ .cls และ .ptp

4. ผลการดำเนินโครงการงานและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการเคลือบวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ H-PBS ด้วยคอลลาเจน

สเปกตรัมของ FT-IR แบบ Overlaid ของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ H-PBS (HPBS Scaffold) ที่เคลือบด้วยคอลลาเจน สเปกตรัมของ HPBS Scaffold (รูปที่ 26(a)) นั้นแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีพีคที่แสดงลักษณะอยู่ที่ 1720 และ 3600 cm^{-1} ซึ่งเทียบได้เป็นหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl, $>\text{C}=\text{O}$) และไฮดรอกซิล (Hydroxyl, $-\text{OH}$) Stretching ตามลำดับ สเปกตรัมของ HPBS Scaffold ที่มีคอลลาเจนเคลือบอยู่แสดงในรูปที่ 26(b-d) จะแสดงให้เห็นว่ามีพีคเพิ่มเติมอยู่ที่ 1650 cm^{-1} ซึ่งเป็นช่วงของเอไมด์ (Amide, $-\text{CONH}-$) และ 1597 cm^{-1} ซึ่งเป็นของ $-\text{NH}_2$ deformation ซึ่งบ่งชี้ว่าได้เกิดพันธะเอไมด์ (Amide Linkage, $-\text{CONH}-$) ขึ้น จากปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโน ($-\text{NH}_2$) ในคอลลาเจน และ คาร์บอกซิเลท ($-\text{COO}^-$) ใน HPBS Scaffold



รูปที่ 1 FT-IR Spectra ของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ชนิด (a) H-PBS, (b) H-PBS/5CoI, (c) H-PBS/10CoI และ (d) H-PBS/20CoI

จากผลการทดลองการเคลือบคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นต่างกัน ดังตารางที่ 1 พบว่าการเคลือบคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นมากกว่าจะพบปริมาณคอลลาเจนที่เคลือบอยู่บนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์มากกว่า และเมื่อใช้วัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่ผ่านการปรับปรุงพื้นผิวแล้ว (H-PBS) เปรียบเทียบกับที่ยังไม่ได้ปรับปรุง (PBS) พบว่า PBS/10CoI ปริมาณคอลลาเจนน้อยกว่าที่พบบน H-PBS/10CoI เนื่องจากไม่มีพันธะเคมีเกิดขึ้นระหว่างคอลลาเจน และวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์

ตารางที่ 1 ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (WG) บนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นต่างกัน

#Run	Sample code	Collagen concentration (% w/v)	% WG
1	PBS/10CoI	10	9.75±0.13
2	HPBS/5CoI	5	4.17±0.07
3	HPBS/10CoI	10	19.20±0.09
4	HPBS/20CoI	20	40.47±0.69

ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์ธาตุ (Elemental Analysis) ด้วยเทคนิค CHN-Analysis จะสามารถยืนยันการมีอยู่ของคอลลาเจนบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ ดังแสดงในตาราง 2 ในโตรเจน (Nitrogen) เป็นธาตุตัวหนึ่งที่ต้องพบในคอลลาเจนทุกๆชนิด ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้จากการวิเคราะห์ธาตุ พบว่า ปริมาณของไนโตรเจนมีความสอดคล้องไปในทางเดียวกันกับผลการหาค่าหนักเพิ่ม

ตารางที่ 2 ปริมาณคอลลาเจนบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ ตรวจสอบจากเทคนิควิเคราะห์ธาตุ

Run#	Sample code	% Weight of each element			%Collagen by weight
		C	H	N	
1	PBS	53.90	7.03	0.42	0
2	HPBS	53.70	7.00	0.11	0
3	Collagen	43.00	6.59	16.37	100
4	PBS/10Col	53.30	6.91	2.02	10
5	HPBS/5Col	53.40	6.95	1.37	8
6	HPBS/10Col	51.10	6.80	3.29	20
7	HPBS/20Col	49.30	6.55	6.00	36

4.2 การศึกษาการเคลือบวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ H-PBS ด้วยไฮดรอกซีอะปาทิต

ปริมาณของไฮดรอกซีอะปาทิตที่ติดอยู่ในชิ้นงานวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่ได้จากการเคลือบด้วยไฮดรอกซีอะปาทิตที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ต่าง ๆ กันจะหาได้จากวิธีการชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Gravimetric Method) จะพบว่า เมื่อใช้ปริมาณของไฮดรอกซีอะปาทิตที่ความเข้มข้นสูงกว่า ปริมาณไฮดรอกซีอะปาทิตที่ติดบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ก็จะมากขึ้นไปด้วย ตามตารางที่ 3

นอกจากนั้น ปริมาณของไฮดรอกซีอะปาทิตที่เคลือบอยู่บนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ชนิด HPBS ก็จะตรวจสอบโดยใช้เทคนิค EDS เพิ่มเติม ตามตารางที่ 4 %Ca (ซึ่งเป็นธาตุที่พบในไฮดรอกซีอะปาทิต) จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไฮดรอกซีอะปาทิตที่เพิ่มขึ้น และเวลาในการแช่ที่มากขึ้น นั้นแสดงให้เห็นว่า HPBS ได้เกิดอันตรกิริยากับเม็ดไฮดรอกซีอะปาทิต ซึ่งทำให้เกิดเป็นพันธะไอออนิก ระหว่างคาร์บอกซิลิก (-COOH) และ Ca^{2+} ion ของไฮดรอกซีอะปาทิต ในรูปแบบของแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (Electrostatic Force) ปริมาณแคลเซียมที่พบในตัวอย่าง PBS/10HA/60 นั้นส่วนใหญ่แล้วจะมาจาก การสะสมของอนุภาคเชิงกายภาพ (Physical Deposition) จึงเห็นได้ว่า ปริมาณของแคลเซียมที่ติดบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์จึงน้อยมาก เมื่อเทียบกับที่พบใน H-PBS/10HA/60 ซึ่งทั้งสองตัวอย่างที่ยกขึ้นมาได้เตรียมขึ้นภายใต้เงื่อนไขการทดลองเดียวกัน

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นไฮดรอกซีอะปาทิต และเวลาในการเคลือบที่มีต่อปริมาณไฮดรอกซีอะปาทิตที่ถูกเคลือบบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์

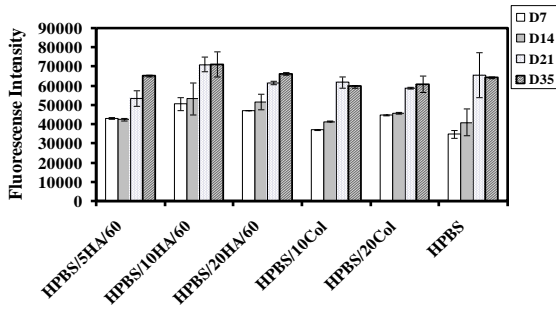
Run #	Sample code	Coating condition		%WG
		[HA] (% w/v)	Soaking time (min)	
1	PBS/10HA/60	10	60	7.64±1.09
2	HPBS/5HA/30	5	30	11.53±1.47
3	HPBS/5HA/60	5	60	14.49±0.28
4	HPBS/5HA/120	5	120	26.13±0.86
5	HPBS/10HA/30	10	30	14.78±0.36
6	HPBS/10HA/60	10	60	18.73±0.23
7	HPBS/10HA/120	10	120	31.11±0.41
8	HPBS/20HA/30	20	30	24.04±0.48
9	HPBS/20HA/60	20	60	32.16±0.36
10	HPBS/20HA/120	20	120	39.41±0.22

ตารางที่ 4 ร้อยละปริมาณแคลเซียมที่พบบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ทดสอบโดย EDS

Run #	Sample code	Ca (wt%)
1	PBS/10HA/60	5.87±1.23
2	HPBS/10HA/30	14.42±0.97
3	HPBS/10HA/60	17.44±0.69
4	HPBS/10HA/120	25.47±1.68
5	HPBS/5HA/60	8.58±0.73
6	HPBS/20HA/60	25.69±3.12

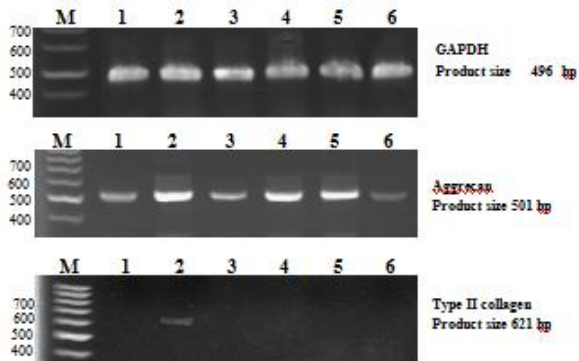
4.3 การศึกษาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ Chondrocyte

รูปที่ 2 จะแสดงถึงปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มจำนวนอยู่บนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ในระยะเวลาของการบ่มที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่อเวลาในการบ่มผ่านไป 7 วัน จำนวนของเซลล์ Chondrocyte ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ HPBS ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนจะไม่มีผลแตกต่างจากที่พบบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ HPBS ที่ไม่ได้เคลือบ ในทางกลับกัน กลับพบปริมาณของเซลล์ Chondrocyte เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ HPBS ที่เคลือบด้วยไฮดรอกซีอะปาทิต เมื่อเปรียบเทียบกับที่พบบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ HPBS ที่ไม่ได้เคลือบ เมื่อเวลาที่ใช้บ่มเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์บนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 35 ของการปลูกเซลล์ จะพบจำนวนของเซลล์ Chondrocyte มากที่สุดบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ H-PBS/10HA/60



รูปที่ 2 เซลล์คอนไดรโรไซต์ที่เพิ่มจำนวนบนวัสดุโครงร่างเซลล์ชนิดต่างๆ ณ วันที่ 7, 14, 21 และ 35 ของการบ่ม

โปรไฟล์ของ mRNA ของ Aggrecan และ Collagen Type II จากการปลูกเซลล์ Chondrocyte เมื่อครบ 35 วัน ได้แสดงให้เห็นตามรูปที่ 3 จากการทดลองพบว่า เซลล์ Chondrocyte ที่มีลักษณะ Dedifferentiated จะแสดงผลของ Aggrecan ซึ่งพบบนทุกวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ และจะพบระดับของ Aggrecan ที่มากที่สุดบนตัวอย่างของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบ HPBS ที่เคลือบด้วยไฮดรอกซีอะปาทิตเข้มข้น 10% w/v หรือตัวอย่างที่ระบุรหัสว่า H-PBS/10HA/60 แต่จะสามารถตรวจพบเจอแถบของ Collagen Type II ได้เฉพาะในเซลล์ Chondrocyte ที่ปลูกบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ชนิด H-PBS/10HA/60



รูปที่ 3 การทดสอบ RT-PCR ของ mRNA สำหรับ GAPDH, Aggrecan และคอลลาเจนชนิดที่สอง จากการเลี้ยงเซลล์คอนไดรโรไซต์เป็นเวลา 35 วัน โดยที่ แถวที่ 1: HPBS/5HA/60, แถวที่ 2: HPBS/10HA/60, แถวที่ 3: HPBS/20HA/60, แถวที่ 4: HPBS/10CoI, แถวที่ 5: HPBS/20CoI, แถวที่ 6: HPBS และ M=marker.

4.4 การศึกษาขั้นต้นเกี่ยวกับการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยวิธีต้นแบบเร็ว

ผลการศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยวิธีดั้งเดิมและวิธีก้าวหน้า

เมื่อเปรียบเทียบการขึ้นรูปแบบดั้งเดิมคือ Supercritical Fluids (SCF) กับเทคนิคแบบก้าวหน้า คือ Rapid Prototype (RP) พบว่าเทคนิค Rapid Prototype มีความโดดเด่น และมีข้อดีมากกว่าเทคนิคแบบ Supercritical Fluids ในมุมมองของการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ในหลายๆกรณี อันได้แก่

1) รูปร่างของวัสดุ (Geometry)

D.W. Hutmacher (2000) [1] สรุปในการศึกษาว่า การขึ้นรูปด้วยเทคนิคสร้างต้นแบบเร็วช่วยแก้ปัญหาในการ

ออกแบบ สามารถสร้างชิ้นงานที่มีรูปทรงซับซ้อนได้ ทั้งโครงสร้างภายในและภายนอกของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ กล่าวคือ สามารถออกแบบลักษณะที่ซับซ้อนของรูพรุนภายในวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นรูปแบบ (Pattern) และความเชื่อมต่อกัน (Interconnection) ได้ โดยความเชื่อมต่อกันของรูพรุนสามารถทำได้สูงสุดถึง 100% ในขณะที่เทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤตนั้นไม่สามารถควบคุมรูปแบบของรูพรุนได้แล้ว ยังทำรูพรุนให้เชื่อมกันได้เพียง 10-30% เท่านั้น

Yeong, W.-Y., C.-K. Chua, et al. (2004) [5] ได้สรุปไว้ในการศึกษาว่าเทคนิค Rapid Prototype เป็นกระบวนการที่สามารถควบคุมลักษณะโครงสร้างของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ได้โดยการเขียนอัลกอริทึมคำสั่งอัตโนมัติ เหมาะสมกับการขึ้นรูปวัสดุที่ต้องการความเป็นรูพรุน

Hutmacher, D. W., M. Sittinger, et al. (2004) [2] กล่าวในงานวิจัยไว้ว่า การขึ้นรูปแบบ Solid Freeform เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง รูปทรง และความเป็นระเบียบของชิ้นงานได้ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เพื่อการออกแบบที่มีความหลากหลายเหมาะสมกับลักษณะทางชีวภาพ รวมถึงช่วยเพิ่มความแข็งแรงเชิงกลด้วย

นอกจากนี้ เทคนิค RP สามารถทำได้โดยอัตโนมัติ และสามารถนำมาบูรณาการกับเทคโนโลยีทางรูปภาพ เพื่อขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่มีรูปร่างใดๆตามต้องการ และเหมาะสมกับชิ้นส่วนอวัยวะที่ต้องการซ่อมแซมโดยวิธีทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

R. Landers et al. (2002) [4] ได้สรุปจากการทดลองขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์จากไฮโดรเจลด้วยวิธี 3D Plottingว่า สามารถสร้างชิ้นงานที่มีรูปแบบ และรูปร่างตามที่ต้องการได้จากการพล็อต หรือการหยอดวัสดุตามตำแหน่งที่ต้องการ

L. Geng et al. (2005) [6] ได้กล่าวในงานวิจัยว่า การขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบดั้งเดิมมักเกิดปัญหาในเรื่องของความแข็งแรงเชิงกล และขนาดของรูพรุนเชื่อมต่อที่ไม่เพียงพอ รวมถึงไม่สามารถควบคุมความเป็นรูพรุน และ/หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในชิ้นงานได้ แต่เทคนิค Rapid Prototype สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ กล่าวคือ สามารถขึ้นรูปชิ้นงานที่ไม่มีข้อจำกัดทางรูปร่างได้

2) การตัดแต่งภายหลังขึ้นรูป (Machining)

การขึ้นรูปแบบการสร้างต้นแบบเร็วจะใช้วิธีขึ้นรูปเป็นชั้นต่อชั้น โดยแต่ละชั้นจะมีการเติมวัสดุเฉพาะตำแหน่งที่ต้องการให้มีเนื้อวัสดุ จึงไม่จำเป็นต้องมีการตัดแต่งส่วนเกินของชิ้นงานออก [2]

3) แม่พิมพ์ (Mold)

เทคนิค Rapid Prototype หรือที่เรียกว่า Solid Freeform Fabrication เป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องใช้แม่พิมพ์ในการขึ้นรูป ซึ่งใช้การขึ้นรูปโดยการเติมเนื้อวัสดุในตำแหน่งที่ต้องการ ควบคุมโดยระบบคอมพิวเตอร์อัตโนมัติ [2, 8]

4) ความแม่นยำ (Accuracy)

ความแม่นยำของรูปร่างชิ้นงานที่ขึ้นรูปด้วยวิธี RP จะมีมากกว่า เนื่องจากการขึ้นรูปถูกควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติเช่น CNC และไม่ต้องการความช่วยเหลือจากมนุษย์ขณะทำการขึ้นรูป หรืออาจต้องการน้อยมาก ในขณะที่วิธี SCF จะต้องมีารตัดแต่งชิ้นงานภายหลัง [8]

Yan, X. and P. Gu (1996) [3] ได้สรุปในการศึกษาว่าเทคนิค Rapid Prototype จะสร้างชิ้นงานมีความแม่นยำมาก เนื่องจากความสามารถในการควบคุมพารามิเตอร์ในการขึ้นรูปได้

5) ลักษณะของรูพรุน (Pore Formation)

เนื่องจากวัสดุโครงสร้างรองรับเซลล์สำหรับเนื้อเยื่อต่างชนิดกันก็ต้องการขนาดของรูพรุนที่ต่างกัน เทคนิค Rapid Prototype สามารถสร้างรูพรุนที่มีขนาดต่างกันได้เพื่อให้เหมาะสมกับเนื้อเยื่อชนิดนั้นๆมากที่สุด ในขณะที่เทคนิคดั้งเดิมจะไม่สามารถเลือกความหลากหลายของรูพรุนได้ ขนาดของรูพรุนจะจำเพาะกับเทคนิคนั้นๆ นอกจากนี้ เทคนิค Rapid Prototype ยังสามารถควบคุมการกระจายตัวขนาด และร้อยละของรูพรุนภายในชิ้นงานได้ค่อนข้างคงที่ อันจะส่งผลถึงกลไกในการสลายตัว (Degradation) ของวัสดุโครงสร้างรองรับเซลล์ เนื่องจากการสลายตัวของวัสดุโครงสร้างรองรับเซลล์ขึ้นอยู่กับความเป็นรูพรุนของชิ้นงานเป็นปัจจัยหนึ่ง [5]

R. Landers et al. (2002) [4] ได้สรุปผลการทดลองขึ้นรูปวัสดุโครงสร้างรองรับเซลล์ด้วยเทคนิค Rapid Prototype ว่าสามารถออกแบบวัสดุให้มีรูพรุนที่ต่อเนื่องกันได้ ซึ่งเป็นสมบัติหนึ่งที่เอื้อต่อการเกาะติดของเซลล์ และการเจริญเติบโตก่อนเซลล์

6) เวลาที่ใช้ (Processing Time)

เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการขึ้นรูปอื่นๆ พบว่าเทคโนโลยี Rapid Prototype จะใช้เวลารวดเร็วกว่าในการผลิต ตั้งแต่การออกแบบ จนถึงการขึ้นรูป [8]

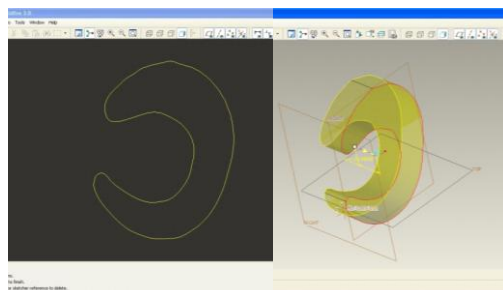
นอกจากนี้ Yan, X. and P. Gu (1996) [3] ยังเขียนถึงข้อสรุปเดียวกันในการศึกษา ว่าเทคนิค Rapid Prototype สามารถผลิตชิ้นงานได้อย่างรวดเร็วกว่าการใช้วิธีดั้งเดิม และยังเหมาะกับการผลิตเชิงอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถลดเวลาการทำงาน (Cycle Time) ได้

7) การทำซ้ำ (Repeatable)

เนื่องจากการขึ้นรูปด้วยเทคนิค Rapid Prototype นั้นสามารถนำไปผสมผสานกับเครื่องจักรขึ้นรูปอัตโนมัติ เช่น CNC ได้ จึงทำให้สามารถผลิตชิ้นงานเหมือนกันในปริมาณมากๆ ได้ จากการเขียนอัลกอริทึมในคอมพิวเตอร์เพียงครั้งเดียว [8]

ในส่วนของข้อเสียของเทคนิค Rapid Prototype เมื่อเทียบกับเทคนิค Supercritical Fluids แล้ว พบว่า ต้นทุนด้านเทคโนโลยีและเครื่องจักรนั้นแพงกว่ามาก รวมถึงวัสดุเฉพาะบางอย่างที่ต้องใช้ เช่น เครื่อง Rapid Prototype รุ่น Viper Si2 SL-equipment ของ 3D System Corporation ราคาในปี 2001 คือ 180,000 เหรียญสหรัฐ[8] ในทางกลับกัน เครื่อง Supercritical Fluids ที่ใช้ในการทดลองข้างต้นมีราคาประเมินไม่เกิน 1,800 เหรียญสหรัฐเท่านั้น

ผลการขึ้นรูปด้วยวิธี Rapid Prototype ด้วยการจำลอง (Simulation) การจำลองรูปร่างและขนาดสามมิติของวัสดุโครงสร้างรองรับเซลล์ที่ใช้แทนที่กระดูกอ่อน Meniscus บริเวณข้อเข่า นั้นได้ทำการวาดภาพ CAD ในโปรแกรม ProEngineer โดยอ้างอิงขนาดจากการศึกษาของ K.R. Stone et al., 2007 [7] โดยทำการศึกษขนาดของ Meniscus ที่มีความสัมพันธ์กับเพศ น้ำหนักและส่วนสูง (BMI) โดยการทดลองการจำลองได้ใช้ผลจากตัวอย่างของกลุ่ม High-BMI

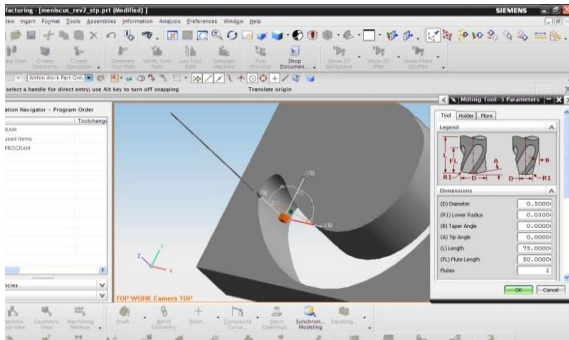


รูปที่ 4 การวาดภาพ CAD ของ Meniscus ผ่าน โปรแกรม ProEngineer

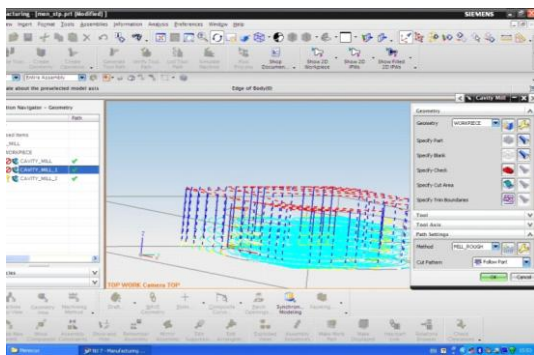
จากนั้นส่งรูปภาพ CAD ออกไปใช้ในโปรแกรม Unigraphics (UG) เพื่อทำการแบ่งชั้นของชิ้นงาน (Layer Slicing) โดยใช้ CAM ช่วยในการออกแบบ ในการป้อนข้อมูลในโปรแกรม กำหนดขนาดของความกว้างเส้นทางเดิน และความเร็วในการเดินของแท่นวางในระนาบ XY (X-Y Table) ซึ่งจะต้องสัมพันธ์กับอัตราการเติมเนื้อวัสดุ

จากนั้นจะต้องกำหนดค่า 1) ขนาดหัวฉีด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) ซึ่งควรมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของหยดวัสดุ 2) ค่า Step Over คือความกว้างระหว่างช่องทางเดินสองช่อง 3) Z-Offset คือระยะที่หัวฉีดจะเคลื่อนไปตามแนวตั้งหลังจากฉีดขึ้นรูปครบรอบแต่ละชั้น หรือหมายถึงความสูงของชั้นหนึ่งๆของชิ้นงาน รวมถึงออกแบบลักษณะของ Tool เมื่อกำหนดข้อมูลต่างๆอย่างเหมาะสมแล้ว จึงสั่งให้โปรแกรมทำการคำนวณ (Generate) เพื่อ

สร้างเส้นทางเดินของ Tool และทำการแบ่งชั้น (Layer Slicing) เพื่อจำลองลักษณะการทำการขึ้นรูปทีละชั้น



รูปที่ 5 การนำเอาไฟล์ CAD มาใช้ต่อในโปรแกรม Unigraphics



รูปที่ 6 ลักษณะการแบ่งชั้น และทางเดินของ Tool

การนำไปใช้กับเครื่อง CNC ดังที่กล่าวมาในส่วนของการตรวจสอบเอกสาร จะต้องใช้การแปลงข้อมูลของโปรแกรมเป็นไฟล์ CLSF (Cutter Location Source File) ซึ่งไฟล์ CLSF (Cutter Location Source File) เป็นไฟล์มาตรฐานที่ถูกกำหนดเพื่อควบคุมการเดินของ tool และจะถูกแปลงเป็นนามสกุล .cls และ .pfp เพื่อสำหรับส่งออกเป็นไฟล์สำหรับการทำ Post Processing

5. สรุปผลการนิพนธ์งานและข้อเสนอแนะ

5.1 ผลการเคลือบสารกระตุ้นทางชีวภาพลงบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ชนิดที่ผ่านการไฮโดรไลซ์

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สารกระตุ้นทางชีวภาพ เช่น คอลลาเจน หรือ ไฮดรอกซีอะปาทิต สามารถทำการเคลือบลงบนพื้นผิวของวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ชนิด HPBS ได้สำเร็จ โดยใช้ปฏิกิริยาเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมิโน (Amino Group) ในคอลลาเจน และหมู่คาร์บอกซิเลต (Carboxylate Group) ใน HPBS หรือในกรณีของไฮดรอกซีอะปาทิต จะใช้การเคลือบโดยอาศัยแรงไอออนิกระหว่างแคลเซียมไอออนของไฮดรอกซีอะปาทิต และ

หมู่คาร์บอกซิเลตใน HPBS ปริมาณของสารกระตุ้นทางชีวภาพที่ใช้พบบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์หลังจากการเคลือบได้รับผลโดยตรงมาจากความเข้มข้นของสารกระตุ้นทางชีวภาพที่ใช้ และระยะเวลาในการแช่ (สำหรับในกรณีของไฮดรอกซีอะปาทิต) หลังจากการปลูกเซลล์เป็นเวลา 35 วัน พบว่าเซลล์ Chondrocyte ที่ปลูกบนวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ที่เคลือบด้วย 10% HA นั้นมีจำนวนมากที่สุด และวัสดุมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยสรุปจากปริมาณของเซลล์ และระดับของ Aggrecan และ Collagen Type II ที่วัดได้จากวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ดังกล่าว

5.2 ผลการศึกษาเชิงเปรียบเทียบเทคนิคการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์แบบดั้งเดิมและแบบก้าวหน้า

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการใช้เทคนิคการสร้างต้นแบบเร็ว สามารถช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยวิธีแบบดั้งเดิมได้ เทคนิคการสร้างต้นแบบเร็วนี้ไม่ต้องอาศัยแม่พิมพ์ใดๆในการขึ้นรูป เนื่องจากสามารถใช้การเติมเนื้อวัสดุทีละชั้นโดยการกำหนดจุดพิกัดในการเติมเนื้อวัสดุ จึงทำให้มีความแม่นยำที่สูง แม้สำหรับชิ้นงานที่มีความซับซ้อน เช่นในวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ ที่ต้องการคำนึงถึงความเป็นระเบียบและการเชื่อมต่อกันของรูพรุน เทคนิคการสร้างต้นแบบเร็วก็สามารถสร้างรูพรุนที่เป็นระเบียบและเชื่อมต่อกันได้โดยการกำหนดจุดของรูพรุนเป็นจุดที่ไม่ต้องการเติมเนื้อวัสดุ นอกจากนี้ การทดลองสร้างการจำลอง (Simulation) ก็ทำให้ทราบว่าการเขียนโปรแกรมคำสั่งในการขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์เพียงครั้งเดียว สามารถนำไปใช้ในการผลิตได้ไม่จำกัดครั้ง อันเป็นข้อดีอีกประการหนึ่งของเทคนิคการสร้างต้นแบบเร็ว

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการสรุปผลการทดลองพบว่า การเคลือบวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ชนิด H-PBS ด้วยสารกระตุ้นทางชีวภาพทั้งสองชนิดนั้นสามารถทำได้ รวมถึงสามารถหาสภาวะในการเคลือบที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับหลอดทดลองได้แล้ว แต่การขึ้นรูปด้วยเทคนิค Supercritical Fluids – CO₂ นั้นมีข้อเสียหลายประการ การขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ด้วยเทคนิค Rapid Prototype ควรนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหาที่เป็นข้อเสียของกระบวนการขึ้นรูปแบบ Supercritical Fluids การทดลองในขั้นต่อไปจึงควรนำเอาเทคนิค Rapid Prototype มาใช้ขึ้นรูปวัสดุโครงร่างรองรับเซลล์ โดยมีการผสมอนุภาคไฮดรอกซีอะปาทิตลงไปในเนื้อวัสดุด้วย การศึกษาควรทำตั้งพารามิเตอร์ที่สำคัญในการขึ้นรูปอีกมากมาย และทำการศึกษาพารามิเตอร์เหล่านั้น เพื่อหาสภาวะการขึ้นรูปด้วย Rapid Prototype ที่เหมาะสมที่สุด

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.พรทิพย์ เล็กพิทยา ที่ปรึกษาของโครงการ

ดร.วนิดา จันทร์วิภูถ คุณบุญล้อม ถาวรยุติการต์ และคุณวาสนา โคนสอน ห้องปฏิบัติการวัสดุทางชีวการแพทย์ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าเป็นส่วนหนึ่งของทีมประสบการณ์ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ นายทิวากร อภิรักษ์นกร สำหรับความรู้ในเรื่องเทคนิค Rapid Prototype และการทำ Simulation รวมถึงคำปรึกษา กำลังใจ และความช่วยเหลือในเรื่องอื่นๆ เติมเต็มให้งานชิ้นนี้มีความหลากหลายและน่าสนใจมากขึ้น

สุดท้าย ขอขอบคุณครอบครัวที่อบอุ่น พี่ๆในห้องแลป PaRP บางท่านสำหรับ CAD Model และบุคคลอื่นๆที่อาจไม่ได้กล่าวถึง ณ ที่นี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Hutmacher, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage." *Biomaterials* **21**(24): 2529-2543.

[2] Hutmacher, D. W., M. Sittinger, et al. (2004). "Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems." *Trends in Biotechnology* **22**(7): 354-362.

[3] Yan, X. and P. Gu (1996). "A review of rapid prototyping technologies and systems." *Computer-Aided Design* **28**(4): 307-318.

[4] Landers, R., U. Hübner, et al. (2002). "Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering." *Biomaterials* **23**(23): 4437-4447.

[5] Yeong, W.-Y., C.-K. Chua, et al. (2004). "Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential." *Trends in Biotechnology* **22**(12): 643-652.

[6] L. Geng et al. (2005). "Direct writing of chitosan scaffolds using a robotic system." *Rapid Prototyp J.* **11**(2): 90-97.

[7] K.R. Stone, M.D., et al. (2007) Meniscal sizing based on gender, height, and weight. *Arthroscopy*. 2007 May ;**23**(5):503-8

[8] Y. Yongnian et al. (2009). "Rapid Prototyping and Manufacturing Technology: Principle, Representative Technics, Applications, and Development Trends." *Tsinghua Science and Technology* **14**(S1): 1-12

[9] T. Apirakthanakorn and K. Eiamsa-Ard (2009). "Rapid Prototyping by Using Water Droplet Machine" *ME-NETT* **23**: AMM-029170

[10] Choi, S. H. and K. T. Kwok (2002). "Hierarchical slice contours for layered-manufacturing." *Computers in Industry* **48**(3): 219-239.

[11] Freed, L.E. et al. (1994) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N. Y.)* **12**, 689-693.

[12] Thomson, J.I. et al. (1995) Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineering trabecular bone. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **7**, 23-28.

[13] Wang, Y.-Q. and J.-Y. Cai (2007). "Enhanced cell affinity of poly(L-lactic acid) modified by base hydrolysis: Wettability and surface roughness at nanometer scale." *Current Applied Physics* **7**(Supplement 1): e108-e111.

[14] Wissink, M. J. B., R. Beernink, et al. (2001). "Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation." *Biomaterials* **22**(2): 151-163.

[15] Mueller, S. M., S. Shortkroff, et al. (1999). "Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro." *Biomaterials* **20**(8): 701-709.

[16] Kim, S.-S., M. Sun Park, et al. (2006). "Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials* **27**(8): 1399-1409.