



โครงเลี้ยงเซลล์รุกรานจากพอลิวิทิลีนซัคซิเนตที่เตรียมด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีดและการชะ  
ล้างเกลือ สำหรับนำไปใช้ในการนำส่งยา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

โครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงแท่งจากพอลิเอทิลีนซัดซีเนตที่เตรียมด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด  
และการชะล้างเกลือ สำหรับนำไปใช้ในการนำส่งยา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต  
ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

POLYBUTYLENE SUCCINATE POROUS SCAFFOLD PREPARED BY FUSED  
DEPOSITION MODELING AND SALT LEACHING TECHNIQUES FOR DRUG  
DELIVERY APPLICATION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Master of Engineering (POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING)  
Department of MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING  
Graduate School, Silpakorn University  
Academic Year 2020  
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	โครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนจากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่เตรียมด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีดและการชะล้างเกลือ สำหรับนำไปใช้ในการนำส่งยา
โดย	กษิติศ ตีระสุขชัย
สาขาวิชา	วิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท มหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ ชัยยุตต์

---

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐกาญจน์ หงส์ศรีพันธ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ ชัยยุตต์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศรินทร์ เขษะปะบุตร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์มาณฑุ ปานะโปย)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สอาด ริยะจันทร์ )

60402202 : วิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : ระบบนำส่งยา, โครงเลี้ยงเซลล์, พอลิวิทิลินซัคซิเนต, การชะล้างเกลือ, การพิมพ์แบบสามมิติ

นาย กษิตศ ตีระสุชัย: โครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนจากพอลิวิทิลินซัคซิเนตที่เตรียมด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีดและการชะล้างเกลือ สำหรับนำไปใช้ในการนำส่งยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ ชัยยุตต์

โครงเลี้ยงเซลล์เป็นหนึ่งในวัสดุทางชีวการแพทย์สำหรับฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่มีสมบัติเหมาะสมแก่การนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิวิทิลินซัคซิเนตที่ถูกสร้างขึ้นมาด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีดและการชะล้างเกลือเพื่อเป็นวัสดุนำส่งยาเซฟาโซลิน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณเกลือและรูปแบบการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีต่อสัณฐานวิทยา ความเป็นรูพรุน ความชอบน้ำ สมบัติเชิงกล อัตราการปลดปล่อยยา สมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นปริมาณรูพรุนยิ่งเพิ่มขึ้น โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบสามเหลี่ยมมีปริมาณรูพรุนมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบตารางเมื่อเทียบกับที่ปริมาณเกลือเท่ากัน สำหรับการทดสอบความชอบน้ำพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรมีค่ามุมสัมผัสน้ำอยู่ในช่วงประมาณ  $88^{\circ}$  ถึง  $102^{\circ}$  โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบสามเหลี่ยมมีความชอบน้ำมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบตาราง ผลการทดสอบสมบัติเชิงกลพบว่าความแข็งแรงต่อการดึงและมอดูลัสการดึงมีค่าลดลงเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนเพิ่มขึ้น และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบตารางมีค่าสมบัติเชิงกลสองชนิดนี้สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบสามเหลี่ยม ผลการทดสอบการปลดปล่อยยาเซฟาโซลินพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มีปริมาณเกลือ 60% และมีโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบสามเหลี่ยมมีการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นน้อยที่สุดและมีความสม่ำเสมอของการปลดปล่อยยามากที่สุด สำหรับความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่บรรจุยาเซฟาโซลินมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* อยู่ที่ประมาณ 56-72% และ 36-40% ตามลำดับและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบเมื่อมีปริมาณยาสะสมที่ปลดปล่อยออกมาไม่เกิน 100 ppm

60402202 : Major (POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING)

Keyword : drug delivery system, scaffold, polybutylene succinate, 3D printing, salt leaching

MR. KASIDIS TEERASUCHAI : POLYBUTYLENE SUCCINATE POROUS SCAFFOLD PREPARED BY FUSED DEPOSITION MODELING AND SALT LEACHING TECHNIQUES FOR DRUG DELIVERY APPLICATION THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR NATTAWUT CHAIYUT, Ph.D.

A scaffold is a biomedical appliance for tissue restoration that can be used to achieve drug delivery purposes. The objective of this research was to prepare polybutylene succinate scaffolds fabricated by fused deposition modeling and salt leaching technique for use as a Cefazolin drug carrier. In this study, the effect of salt content and the lay-down pattern of the scaffold on morphology, porosity, wettability, mechanical properties, drug release rate, antibacterial properties, and biocompatibility were investigated. The results showed that when increasing salt content, the porosity increased, in addition, the scaffolds with triangle pattern exhibited more porosity than the grid pattern at the same salt content. For the wettability test, the contact angle of all scaffolds ranged between 88° to 102° where the grid pattern exhibited more hydrophobic than the triangle pattern. Mechanical properties results revealed that both the flexural strength and the flexural modulus decreased with increasing the porosity of the scaffolds. Moreover, the grid pattern was superior to the triangle pattern. For the results of the Cefazolin release rate, the porous scaffold containing 60% wt salt and with a triangle pattern revealed the slowest initial burst release and the most constant drug release rate. For the biocompatibility and antibacterial tests, porous scaffolds containing the Cefazolin showed the antibacterial efficiency against *S. aureus* and *E.coli* approximately 56-72% and 36-40%, respectively, and presented non-toxic to the testing cells when the cumulated drug release was not exceeded 100 ppm.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้เป็นอย่างดี ด้วยความกรุณาจากคณาจารย์หลายท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ พร้อมการสนับสนุนที่ได้รับจากบุคคลรอบข้าง ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ ชัยยุตต์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศรินทร์ เหมชะปะบุตร และรองศาสตราจารย์ มานพ ปานะโปย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภกิจ สุทธิเรืองวงศ์ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลในการทำวิจัย ขอขอบคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐกาญจน์ หงส์ศรีพันธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ ชัยยุตต์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศรินทร์ เหมชะปะบุตร รองศาสตราจารย์ มานพ ปานะโปย และรองศาสตราจารย์ ดร.สอาด ริยะจันทร์ ที่ได้คำปรึกษา ให้แนวคิด และช่วยตรวจแก้ไขส่วนที่บกพร่องต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งวิทยานิพนธ์สำเร็จเป็นรูปเล่ม ขอขอบคุณเหล่าคณาจารย์จากทั่วทุกมุมโลก ที่พร้อมตอบข้อสงสัยผ่านช่องทางออนไลน์อย่างกระตือรือร้นโดยไม่หวังสิ่งใดตอบแทน ขอขอบคุณคนรัก ผู้เติมเต็มชีวิต อยู่เคียงข้างตลอดมาทั้งยามทุกข์และยามสุข ขอขอบใจเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือเกื้อกูลกันด้วยดีตลอดมา สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณบิดามารดา และครอบครัวที่เปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาตลอดจนสำเร็จการศึกษา

กชิติศ ตีระสุขชัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	า
สารบัญรูป.....	ค
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย .....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากผลงานวิจัย .....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	6
2.1 ระบบนำส่งยา .....	6
2.1.1 ระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิม .....	7
2.1.2 ระบบนำส่งยาขั้นสูง.....	7
2.2 โคร่งเลี้ยงเซลล์.....	8
2.3 ปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องพิจารณาสำหรับการเลือกใช้โคร่งเลี้ยงเซลล์.....	10
2.3.1 ความเข้ากันได้กับร่างกาย.....	10
2.3.2 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ .....	10



2.3.3 สมบัติเชิงกล .....	10
2.3.4 ลักษณะของโครงสร้างโครงเลี้ยงเซลล์.....	10
2.3.5 เทคโนโลยีที่ใช้การผลิต.....	11
2.4 เทคโนโลยีในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ .....	11
2.4.1 เทคโนโลยีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์รูปท่อนหรือโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดฟองน้ำ .....	11
2.4.2 เทคโนโลยีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบเส้นใย non-woven.....	11
2.4.3 เทคโนโลยีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบเส้นใย woven .....	12
2.5 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับวัสดุชีวภาพที่นำมาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ .....	12
2.5.1 โลหะ .....	13
2.5.2 เซรามิค.....	13
2.5.3 พอลิเมอร์ .....	14
2.5.4 คอมโพสิต.....	15
2.6 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น.....	15
2.6.1 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น.....	16
2.7 การพิมพ์แบบสามมิติ .....	17
2.8 ประวัติโดยสังเขปของการพิมพ์แบบสามมิติ .....	18
2.9 องค์ประกอบพื้นฐานของการพิมพ์แบบสามมิติ.....	22
2.10 เทคโนโลยีต่างๆของการพิมพ์แบบสามมิติ.....	25
2.10.1 การทำให้วัสดุเหลวในอ่างแข็งด้วยแสง (Vat Photopolymerization) .....	25
2.10.2 การหลอมผงวัสดุ (Power Bed Fusion) .....	27
2.10.3 การพ่นวัสดุ (Material Jetting).....	28
2.10.4 การฉีดวัสดุผ่านหัวฉีด (Material Extrusion).....	29
2.10.5 การเพิ่มวัสดุด้วยการฉายพลังงาน (Directed Energy Deposition) .....	30

2.10.6 การพ่นกาว (Binder Jetting).....	31
2.10.7 การยัดวัสดุแผ่นเข้าหากัน (Sheet Lamination) .....	32
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	33
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....	50
3.1 แนวคิดของการวิจัย .....	50
3.2 วัสดุและสารเคมีที่ใช้.....	50
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์และทดสอบ.....	52
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	53
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	65
4.1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ kPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PBS .....	66
4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy).....	68
4.3 การศึกษาความเป็นรูพรุนด้วยเทคนิคการหาค่าความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity determination technique).....	71
4.4 การศึกษาความชอบน้ำด้วยการวัดมุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle measurement) .	73
4.5 การศึกษาสมบัติเชิงกลด้วยการทดสอบแรงดัดงอ (Flexural testing).....	75
4.6 การทดสอบการปลดปล่อยยา.....	78
4.7 การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย Dynamic shake flask method .	83
4.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay .....	86
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	89
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	89
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	92
รายการอ้างอิง .....	93
ภาคผนวก ก. กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน .....	105

ญ

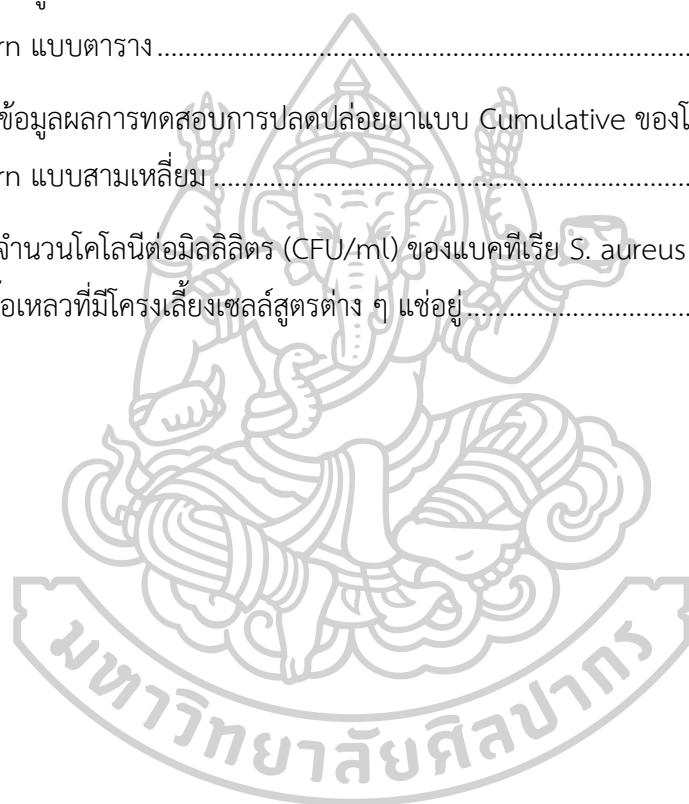
ภาคผนวก ข. กราฟความเค้น - ความเครียด.....	106
ภาคผนวก ค. ตารางผลการทดสอบการปลดปล่อยยา .....	108
ภาคผนวก ง. จำนวนโคโลนีต่อมิลลิตรของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และ <i>E.coli</i> จากผลการทดสอบ ความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย.....	111
ภาคผนวก จ. ตัวอย่างการคำนวณเกี่ยวกับงานวิจัย.....	112
ประวัติผู้เขียน.....	114



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 ข้อดี - ข้อสังเกต ของระบบนำส่งยาชั้นสูง [19].....	8
ตารางที่ 2-2 การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทโลหะชนิดต่าง ๆ [41].....	13
ตารางที่ 2-3 การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทเซรามิกชนิดต่าง ๆ [41].....	14
ตารางที่ 2-4 การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ [41].....	14
ตารางที่ 2-5 การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทคอมโพสิตชนิดต่าง ๆ [41].....	15
ตารางที่ 2-6 ชื่อทางการค้าของพอลิบิวทิลีนซักซิเนตตามบริษัทผู้ผลิต [59] .....	16
ตารางที่ 2-7 มาตรฐานของเทคนิค AM จำแนกตามวัสดุ กระบวนการผลิต และการใช้งาน [70]....	20
ตารางที่ 2-8 ประเภทของเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติพร้อมตัวอย่างวัสดุที่เหมาะสมในการนำมาใช้งานทางการแพทย์ และตัวอย่างผู้จัดจำหน่าย [70] .....	21
ตารางที่ 2-9 ชนิดของวัสดุและการนำมาใช้งานทางการแพทย์โดยวิธีการพิมพ์แบบสามมิติ [76] .....	24
ตารางที่ 2-10 เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ [29].....	33
ตารางที่ 2-11 ค่าต่าง ๆ ของโครงสร้างเซลล์แต่ละสูตร [92].....	37
ตารางที่ 2-12 ค่าที่ได้จากการวัดขนาดต่าง ๆ ของโครงสร้างเซลล์ PCL ด้วยรูป SEM [92].....	38
ตารางที่ 2-13 ปริมาณยา Indomethacin ในเส้นใยพอลิคาโพรแลคโตน [93].....	39
ตารางที่ 3-1 รหัสชื่อของโครงสร้างเซลล์แต่ละสูตร.....	56
ตารางที่ 4-1 ร้อยละความเป็นรูพรุนของโครงสร้างเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกล็ดและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน .....	72
ตารางที่ 4-2 ค่ามุมสัมผัสพื้นน้ำของโครงสร้างเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกล็ดและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน .....	74
ตารางที่ 4-3 ค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอและโมดูลัสต่อการดัดงอของโครงสร้างเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกล็ดและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน.....	77
ตารางที่ 4-4 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และ <i>E.coli</i> ที่พบบนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงสร้างเซลล์สูตรต่าง ๆ แยกอยู่.....	83

ตารางที่ 4-5 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่ผ่านกระบวนการ MTT cytotoxicity assay.....	86
ตารางที่ ค.1 ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Non-cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี lay-down pattern แบบตาราง .....	108
ตารางที่ ค.2 ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Non-cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม.....	108
ตารางที่ ค.3 ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบตาราง.....	109
ตารางที่ ค.4 ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม .....	110
ตารางที่ ง.1 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิเมตร (CFU/ml) ของแบคทีเรีย S. aureus และ E. coli ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ แห่อยู่.....	111



## สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2-1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยาในร่างกายผู้ป่วยที่เวลาต่าง ๆ เมื่อมีการให้ยาด้วยระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิม (---) กับแบบควบคุมการปลดปล่อยได้ (ชั้นสูง) (—) [21] .....	7
รูปที่ 2-2 เส้นทางของยาที่เข้าสู่ร่างกายด้วยระบบส่งยาแบบดั้งเดิม ตั้งแต่การรับเข้ามาจนกระทั่งถึงการขับถ่ายออก [19].....	7
รูปที่ 2-3 องค์ประกอบต่างๆของกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [1] .....	9
รูปที่ 2-4 การจำแนกชนิดของวัสดุชีวภาพสำหรับนำมาขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ [41] .....	12
รูปที่ 2-5 (a) ปฏิกริยาการสังเคราะห์กรดซึกซินิก; (b) ปฏิกริยาการสังเคราะห์ 1,4-บิวเทนไดออล และ (c) ปฏิกริยาการสังเคราะห์พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต .....	17
รูปที่ 2-6 องค์ประกอบต่างๆของการพิมพ์แบบสามมิติ [70] .....	22
รูปที่ 2-7 รายการของชนิดเครื่องพิมพ์ในแบบต่างๆที่ใช้ในทางการแพทย์ [70] .....	22
รูปที่ 2-8 (A) แผนภาพของเครื่องพิมพ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (SLA) [78] และ (B) ภาพถ่ายภาพ CT และภาพ SEM ของโครงสร้างเนื้อเยื่อพอลิเอพซิลอนคาโพรแลคโตนที่สร้างขึ้นโดยเทคนิคการพิมพ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต [79] เมื่อใช้ Macromer ขนาด 1500 เมตร .....	25
รูปที่ 2-9 แผนภาพของเครื่องพิมพ์ชีวภาพ (Bioprinter) ที่ใช้เทคนิค DLP [81] .....	26
รูปที่ 2-10 แผนภาพของกระบวนการ SLS [83].....	27
รูปที่ 2-11 แผนภาพของกระบวนการพ่นวัสดุ (Material jetting) [84].....	28
รูปที่ 2-12 แผนภาพของกระบวนการฉีดวัสดุผ่านหัวฉีด (FDM extrusion) [88].....	29
รูปที่ 2-13 แผนภาพของกระบวนการ DED [89].....	30
รูปที่ 2-14 แผนภาพของกระบวนการพ่นกาว (Binder Jetting) [90].....	31
รูปที่ 2-15 แผนภาพของกระบวนการยัดวัสดุแผ่นเข้าหากัน (Sheet Lamination) [91].....	32
รูปที่ 2-16 (a) Lay-down pattern ที่ 0/90° ลักษณะรูพรุนเป็นแบบรังผึ้งสี่เหลี่ยม มุมมองตามทิศทาง Z โดยใช้เทคนิค FDM (b) การจัดเรียงตัวของเส้นใยเป็นโครงสร้างเซลล์ โดยเรียงแนวแบบ Out-of-layer (OL) แบบ In-layer-vertical (ILV) และ In-layer-horizontal (ILH) ที่ระนาบ XY XZ และ YZ ตามลำดับ และ (c) มุมมองหน้าตัดในแนวระนาบ XZ [92].....	36

- รูปที่ 2-17** (a) Lay-down pattern ที่  $0/60/120^\circ$  ลักษณะรูพรุนเป็นแบบรังผึ้งสามเหลี่ยม มุมมองตามทิศทาง Z โดยใช้เทคนิค FDM (b) การจัดเรียงตัวของเส้นใยเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเรียงแนวแบบ Out-of-layer (OL) แบบ In-layer-vertical (ILV) และ In-layer-horizontal (ILH) ที่ระนาบ XY XZ และ YZ ตามลำดับและ (c) มุมมองหน้าตัดในแนวระนาบ XZ [92]..... 36
- รูปที่ 2-18** ภาพ SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ (A) PDLLA, porosity: 77.2%; ขนาดรูพรุน 250-425  $\mu\text{m}$  (B) PDLLA, porosity: 90.0%; ขนาดรูพรุน 250-425  $\mu\text{m}$  (C) PDLLA, porosity: 95.7%; ขนาดรูพรุน 250-425  $\mu\text{m}$  (D) 100PEOT70PBT30, porosity: 85.8%; ขนาดรูพรุน 106-250  $\mu\text{m}$  (E) 100PEOT70PBT30, porosity: 88.3%; ขนาดรูพรุน 250-425  $\mu\text{m}$  (F) 100PEOT70PBT30, porosity: 93.2%; ขนาดรูพรุน 500-710  $\mu\text{m}$  (G) PCL, porosity: 91.7%; ขนาดรูพรุน 106-250  $\mu\text{m}$  (H) PCL, porosity: 92.4%; ขนาดรูพรุน 250-425  $\mu\text{m}$  และ (I) PCL, porosity: 92.4%; ขนาดรูพรุน 500-710  $\mu\text{m}$  [35]..... 41
- รูปที่ 2-19** ปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมด้วยกระบวนการกดอัดด้วยแม่พิมพ์และชะล้างเกลือ ที่ปริมาณเกลือสัมพันธ์กับมวลของพอลิเมอร์ โดยมีขนาดของอนุภาคเกลือแตกต่างกัน (A) PDLLA; (B) 100PEOT70PBT30; และ (C) PCL [35] ..... 42
- รูปที่ 2-20** กราฟเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟาโซลินจากโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ที่มีรูพรุนขนาดเล็กชนิดที่เคลือบด้วย GelMA และ PCL ปกติ โดยใช้ปริมาณยาเซฟาโซลินแตกต่างกันที่ 6 ชั่วโมงแรกและที่ระยะเวลาจนเข้าสู่สมดุล (7 วัน) โดย (a) ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ (b) ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาสะสม [94] ..... 44
- รูปที่ 2-21** กราฟเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟาโซลินจากโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PCL ทั้งแบบเคลือบด้วย GelMA และไม่ได้เคลือบที่ 6 ชั่วโมงแรกและที่ระยะเวลาจนเข้าสู่สมดุล (7 วัน) โดย (a) คือปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ (b) คือปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาสะสม [94] ..... 45
- รูปที่ 2-22** ผลการทดสอบความเข้ากันได้กับร่างกายและการตอบสนองทางชีวภาพในหลอดทดลองของเซลล์ 3 T3 Fibroblast บนโครงเลี้ยงเซลล์ [94]..... 46
- รูปที่ 2-23** โมเดลการออกแบบรูปร่างด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (คอลัมน์ซ้าย) และรูป SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์จริงที่ขนาดและปริมาณรูพรุนแตกต่างกัน โดยใช้สเกลบาร์ 500 ไมโครเมตร (A) Hexagonal (B) Curved (C) Rectangular และ (D) Zigzag (E) รูป SEM พื้นผิวหน้าตัดของโครงเลี้ยงเซลล์ (F) โครงสร้างระดับไมโครของโครงเลี้ยงเซลล์ Sr-HT-Gahnite ที่ประกอบไปด้วยสามเฟส

คือเม็ด Sr-HT ผลึกของ $ZnAl_2O_4$ และเฟสของแก้ว (G) กราฟความสัมพันธ์ของค่า Flexural strength ต่อปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร [95].....	48
<b>รูปที่ 3-1</b> โครงสร้างทางเคมีของพอลิบิวทีลีนซัคซิเนต.....	50
<b>รูปที่ 3-2</b> โครงสร้างทางเคมีของเซฟาโซลินโซเดียม.....	51
<b>รูปที่ 3-3</b> โครงสร้างทางเคมีของไดคลอโรมีเทน.....	51
<b>รูปที่ 3-4</b> รูปแบบ Lay-down patterns แบบตาราง.....	54
<b>รูปที่ 3-5</b> รูปแบบ Lay-down patterns แบบสามเหลี่ยม.....	54
<b>รูปที่ 3-6</b> แผนภาพการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PBS ที่มีปริมาณรูพรุน 3 อัตราส่วน และการทดสอบสมบัติทางกายภาพและเชิงกล.....	59
<b>รูปที่ 3-7</b> แผนภาพการนำโครงเลี้ยงเซลล์มาบรรจุยา แล้วทดสอบการปลดปล่อยยา.....	61
<b>รูปที่ 3-8</b> แผนภาพการทดสอบสมบัติทางชีวภาพ.....	64
<b>รูปที่ 4-1</b> รูปถ่าย SEM ที่พื้นผิวของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ (a) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบตาราง: nPBS-g (a11-a12), 6:4PBS-g (a21-a22), 5:5PBS-g (a31-a32) และ 4:6PBS-g (a41-a42) และ (b) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบสามเหลี่ยม: nPBS-t (b11-b12), 6:4PBS-t (b21-b22), 5:5PBS-t (b31-b32) และ 4:6PBS-t (b41-b42) โดยมีกำลังขยายของรูปในแถวที่หนึ่งกับแถวที่สามอยู่ที่ 50x และแถวที่สองกับแถวที่สี่อยู่ที่ 300x.....	69
<b>รูปที่ 4-2</b> รูปถ่าย SEM แบบภาคตัดขวางของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ (a) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบตาราง: nPBS-g (a11-a13), 6:4PBS-g (a21-a23), 5:5PBS-g (a31-a33) และ 4:6PBS-g (a41-a43) และ (b) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบสามเหลี่ยม: nPBS-t (b11-b13), 6:4PBS-t (b21-b23), 5:5PBS-t (b31-b33) และ 4:6PBS-t (b41-b43) โดยมีกำลังขยายของรูปในแถวที่หนึ่งกับแถวที่สี่อยู่ที่ 100x แถวที่สองกับแถวที่ห้าอยู่ที่ 300x และแถวที่สามกับแถวที่หกอยู่ที่ 1500x.....	70
<b>รูปที่ 4-3</b> ร้อยละความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน.....	72
<b>รูปที่ 4-4</b> ค่ามุมสัมผัสน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน.....	75



รูปที่ 4-5 ค่าความแข็งแรงต่อการตั้งของของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน.....	77
รูปที่ 4-6 ค่าโมดูลัสการตั้งของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ lay-down patterns แตกต่างกัน .....	78
รูปที่ 4-7 ปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยในแต่ละช่วงเวลา; (A) ตั้งแต่ 1 นาที จนถึง 60 นาที และ (B) ตั้งแต่ 1 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมง.....	81
รูปที่ 4-8 ร้อยละปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสมในแต่ละช่วงเวลา; (A) ตั้งแต่ 1 นาที จนถึง 60 นาที และ (B) ตั้งแต่ 1 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมง.....	82
รูปที่ 4-9 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และ <i>E. coli</i> ที่พบบนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ แซ่อยู่.....	84
รูปที่ 4-10 กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของวงแหวน $\beta$ -lactam [111].....	85
รูปที่ ก.1 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายเซฟาโซลินความเข้มข้น 0.1 1 5 10 50 และ 100 ppm ตามลำดับ โดยมีค่า $R^2 = 0.99998$ .....	105
รูปที่ ข.1 กราฟความเค้น – ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน.....	106
รูปที่ ข.2 กราฟความเค้น – ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 6:4PBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน.....	106
รูปที่ ข.3 กราฟความเค้น – ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 5:5PBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน.....	107
รูปที่ ข.4 กราฟความเค้น – ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน.....	107
รูปที่ ง.1 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และ <i>E. coli</i> ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ แซ่อยู่.....	112

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องสำอางค์สำหรับนำส่งโมเลกุลและเซลล์บำบัด โดยมีเป้าหมายในการซ่อมแซมและฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่ติดโรคหรือเกิดข้อบกพร่อง ซึ่งสมบัติหนึ่งที่ถูกให้ความสำคัญในการพัฒนาเครื่องสำอางค์เหล่านี้คือความเป็นรูพรุนของเครื่องสำอางค์ ความเป็นรูพรุนทั้งในเชิงขนาด ปริมาณ และการกระจายตัวที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการนำส่งสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ได้ และเป็นการป้องกันการสะสมของเสียในบริเวณรอบ ๆ เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต อีกทั้งยังส่งผลอย่างมากต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และแพร่กระจายของเซลล์ทั้งบนพื้นผิวและการแพร่เข้าสู่ภายในเครื่องสำอางค์อีกด้วย [1]

จากสมบัติเชิงรูพรุนดังกล่าว ทำให้มีการประยุกต์ใช้เครื่องสำอางค์มาบรรจุยาเพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยา (Drug delivery system) หลากหลายชนิด ทั้งยาปฏิชีวนะ ยาต้านเชื้อรา ยาต้านแบคทีเรีย [2] สารต้านอนุมูลอิสระ [3] และยาต้านมะเร็ง [4] ระบบนำส่งยาคือสูตรหรืออุปกรณ์ที่สามารถนำพาหรือสารบำบัดต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายไปยังบริเวณเป้าหมายได้ และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ รวมไปถึงความปลอดภัยในการใช้ยาหรือสารบำบัดนั้น ๆ ที่ได้จากการควบคุมอัตราการปล่อยตัวยาหรือสารบำบัดนั้นให้ได้ระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสม [5] โดยจะต้องสามารถควบคุมการนำยาเข้าสู่เครื่องสำอางค์ และการปลดปล่อยยาเพื่อนำพาตัวยายังบริเวณเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย [6] หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญคือคุณสมบัติของวัสดุที่เลือกใช้ขึ้นรูปเป็นเครื่องสำอางค์

ไบโอพอลิเมอร์บางชนิดเช่น พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) พอลิไกลโคไลด์ (Polyglycolide, PGA) พอลิคาโพรแลคโตน (Polycaprolactone, PCL) และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-beta-hydroxybutyrate, PHB) เป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพและสมบัติการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ที่ดี จึงเป็นที่นิยมในการนำมาใช้เป็นวัสดุในการขึ้นรูปเครื่องสำอางค์สำหรับใช้ในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์เหล่านี้ก็มีข้อสังเกตบางประการ เช่น ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายทางชีวภาพค่อนข้างนาน [7] หรือมีต้นทุนวัตถุดิบที่สูง พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate, PBS) เป็นไบโอพอลิเมอร์ที่มีระยะเวลาในการย่อยสลายภายในร่างกายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic degradation) ได้ 65 เปอร์เซ็นต์ใน 105 วัน [8] จึงเป็นพอลิเมอร์ที่โดดเด่นในการขึ้นรูปเครื่องสำอางค์สำหรับใช้ในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตเป็นพอลิเอสเทอร์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการเป็นวัสดุตั้งต้นสำหรับผลิตวัสดุสำหรับปลูกถ่ายทางชีวแพทย์ ด้วยสมบัติการย่อยสลายได้ทั้งด้วยจุลินทรีย์ใน

สิ่งแวดล้อมและย่อยสลายภายในร่างกาย ไม่เกิดสารประกอบที่เป็นพิษจากกระบวนการย่อยสลาย มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ รวมไปถึงมีสมบัติในการขึ้นรูป สมบัติเชิงกล และสมบัติทางความร้อนที่ดีเยี่ยม [9] โดยพอลิเอทิลีนซัคซิเนตได้ถูกนำมาใช้ในการเป็นวัสดุพื้นผิวสำหรับกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก [10-12] และเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cell) [13]

นอกจากปัจจัยด้านวัสดุที่นำมาใช้แล้ว เทคนิคที่ใช้ในการบรรจุยาและการขึ้นรูปก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการนำส่งยา ด้วยโครงสร้างที่มีรูพรุนขนาดเล็กของโครงเลี้ยงเซลล์นั้นจะเพิ่มพื้นที่ผิวและช่วยให้ตัวยาสสามารถถูกดึงจากสารละลายมากักเก็บเอาไว้ในโครงสร้างได้มากขึ้นเมื่อใช้วิธีการบรรจุตัวยาดด้วยเทคนิคการหยดสารละลาย (Solution drop loading technique) สำหรับการขึ้นรูป เทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด (Fused deposition modelling technique, FDM) ซึ่งเป็นหนึ่งในเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติ (3D printing) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนแบบเชื่อมต่อกัน (Interconnected pores) สามารถออกแบบได้อย่างอิสระ และมีสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิด จึงสามารถนำมาใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับนำไปใช้ในการนำส่งยาได้ [14]

ในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีดร่วมกับการชะล้างเกลือเพื่อพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยาและปลดปล่อยยาในระยะเวลาที่เหมาะสม โดยใช้พอลิเอทิลีนซัคซิเนตเป็นวัสดุหลักในการขึ้นรูป เลือกใช้เกลือ (NaCl) เป็นสารช่วยทำให้เกิดรูพรุน (Porogent) คิดเป็นอัตราส่วนต่อน้ำหนักระหว่างพอลิเมอร์กับเกลือสามระดับคือ 6:4 5:5 และ 4:6 ตามลำดับ เนื่องจากมีงานวิจัยของ V. Karageorgiou และคณะได้กล่าวไว้ว่าที่ปริมาณรูพรุนที่อยู่ในช่วง 40% ถึง 90% ของเนื้อวัสดุทั้งหมดจะช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเนื้อเยื่อกับโครงเลี้ยงเซลล์ [15] และเลือกใช้ยาเซฟาโซลิน (Cefazolin) เป็นยาทดสอบ เนื่องจากยาเซฟาโซลินเป็นยาปฏิชีวนะชนิด Time dependent คือจะต้องให้ยาในปริมาณหนึ่งที้อย่างพอต่อการรักษาในระยะเวลาหนึ่ง แล้วให้ยาเพิ่มอย่างสม่ำเสมอเพื่อรักษาระดับยาให้เพียงพอต่อการรักษา [16] จึงเหมาะสมกับการนำมาใช้กับระบบนำส่งยาที่มุ่งเน้นการควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาให้สม่ำเสมอ โดยยาเซฟาโซลินนิยมใช้ในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) และ *Escherichia coli* (*E. coli*) สำหรับ *S. aureus* นั้นเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง เนื้อเยื่ออ่อนเช่นเอ็นต่าง ๆ กระดูก และ ข้อ [17] ซึ่ง *S. aureus* นี้สามารถทำให้เกิดการอักเสบ และกระจายไปทั่วร่างกายได้ [18] อีกทั้งตัวยานี้มีความอ่อนไหวต่อความร้อนและสารเคมีมาก จึงเหมาะสมที่จะใช้เทคนิคดังกล่าวในการขึ้นรูปวัสดุนำส่งยาชนิดนี้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถขึ้นรูปวัสดุทั้งหมดจนเสร็จสมบูรณ์ก่อนที่จะนำมาบรรจุยาได้ ตัวยานี้จึงไม่จำเป็นต้องผ่านความร้อน ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้ตัวยาสลายสภาพก่อนได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของปริมาณเกลือที่มีต่อสัณฐานวิทยา ความเป็นรูพรุน ความชอบน้ำ และสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์
2. เพื่อศึกษาผลของการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีต่อสัณฐานวิทยา ความเป็นรูพรุน ความชอบน้ำ และสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์
3. เพื่อศึกษาผลของการมีรูพรุน ปริมาตรรูพรุน และลักษณะการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีต่ออัตราการปลดปล่อยยา
4. เพื่อศึกษาสมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของโครงเลี้ยงเซลล์

## 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ปริมาณเกลือส่งผลต่อสัณฐานวิทยา ความเป็นรูพรุน ความชอบน้ำ และสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์
2. โครงสร้างการจัดเรียงของโครงเลี้ยงเซลล์ ส่งผลต่อสัณฐานวิทยา ความเป็นรูพรุน ความชอบน้ำ และสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์
3. ปริมาตรรูพรุนและลักษณะการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ ส่งผลต่ออัตราการปลดปล่อยยา
4. โครงเลี้ยงเซลล์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ร่างกายและสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต เกรด BioPBS™ FZ71PM เป็นวัตถุดิบในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์
2. ใช้เกลือ NaCl ความบริสุทธิ์ 99% เกรด AR116-P1KG เป็นสารช่วยทำให้เกิดรูพรุน โดยในงานวิจัยนี้จะใช้อัตราส่วนของพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตต่อเกลือสามปริมาณ คือ 6:4 5:5 และ 4:6 โดยน้ำหนัก
3. กำหนดลักษณะของการจัดเรียงของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นสองลักษณะ คือ แบบตารางที่เส้นใยในแนวแกน x และ แกน y ตัดกันทำมุม 90 องศา และแบบสามเหลี่ยมที่เส้นใยในแนวแกน x และ แกน y ตัดกันทำมุม 60 องศา

4. ใช้ยาเซฟาโซลินโซเดียม เครื่องหมายการค้า Cefazol เป็นยาที่ใช้ในการทดสอบอัตราการปลดปล่อยยา ความเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกาย และ ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของโครงเลี้ยงเซลล์
5. ใช้แบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* เป็นแบคทีเรียสำหรับทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของโครงเลี้ยงเซลล์
6. ใช้เซลล์เนื้อเยื่อ L-929 Mouse Fibroblast Cells รหัส ATTCC CCL1, NCTC 929 เป็นเซลล์ตัวแทนเซลล์ร่างกายสำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์

### 1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเบื้องต้น
2. รวบรวมข้อมูลที่สำคัญและสอดคล้องกับงานวิจัย
3. ออกแบบและวางแผนการสำหรับงานวิจัย
4. เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
5. ดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ต้น (nPBS) และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PBS ที่มีปริมาตรรูพรุน 3 อัตราส่วน โดยทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิวิทาไลน์ ซิแซนิตและเกลือที่อัตราส่วนแตกต่างกันด้วยกระบวนการ Solvent casting และ 3D printing ให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะตามรูปแบบที่สร้างขึ้นด้วยระบบคอมพิวเตอร์ จากนั้นทำการสร้างรูพรุนจากการชะล้างเกลือด้วยน้ำไร้ประจุ และทดสอบสมบัติทางกายภาพคือ ลักษณะสัญญาณวิทยา ความเป็นรูพรุน ความชอบน้ำ และสมบัติเชิงกล

ตอนที่ 2 นำโครงเลี้ยงเซลล์มาบรรจุกยา ด้วยเทคนิคการหดยดสารละลาย เตรียม Calibration curve แล้วทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนมีอัตราของการปลดปล่อยยาเข้าสู่สมดุล

ตอนที่ 3 ทดสอบสมบัติทางชีวภาพ โดยแบ่งออกเป็นสองการทดสอบคือทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย Cytotoxicity testing แบบ MTT assay และทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย Dynamic shake flask method

### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากผลงานวิจัย

สามารถสร้างโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงแปดเหลี่ยมที่เตรียมจากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตซึ่งเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่มีราคาไม่สูงมาก และสามารถจัดหาได้ง่ายในประเทศไทย เพื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุนและโครงสร้างที่เหมาะสมไปใช้เป็นวัสดุนำส่งยาที่สามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาให้เกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถใส่บรรจุยาที่มีความอ่อนไหวต่อความร้อนได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อร่างกายด้วย



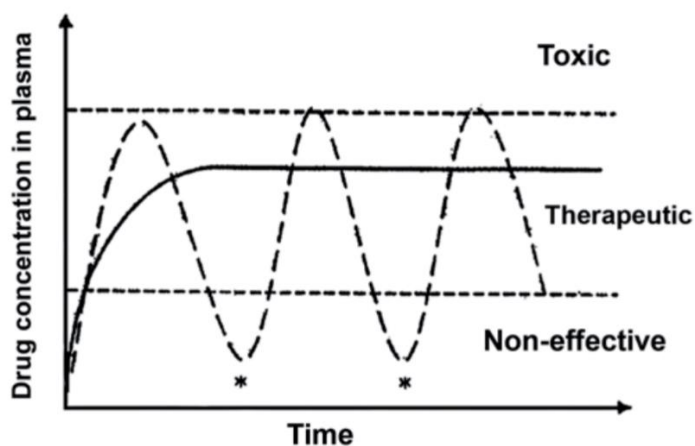
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ระบบนำส่งยา

ความเจ็บป่วย เป็นเรื่องที่อยู่คู่กับมนุษย์มาเป็นเวลาช้านาน ตั้งแต่โบราณที่มนุษย์พยายามหาวิธีในการเอาชนะความเจ็บป่วย ไม่ว่าจะเป็นการใช้สมุนไพร การเพิ่มความอบอุ่นให้กับร่างกาย การดูแลจัดการแผลด้วยวิธีการต่าง ๆ ไปจนกระทั่งการสวดภาวนา เมื่อมนุษย์มีวิวัฒนาการมากขึ้น พัฒนาการของศาสตร์แห่งการเอาชนะความเจ็บป่วย หรือที่เรียกว่าการแพทย์ก็พัฒนาตามไปด้วยอย่างไม่ลดละ นับตั้งแต่การหาพืชสมุนไพรมาบำบัดรักษา จนถึงแผ่นแปะผิวหนังบรรจุยาที่มีเข้มข้นสูงในการปล่อยยาซึมเข้าใต้ผิวหนัง เหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นการใช้สารที่มีฤทธิ์บรรเทาความเจ็บป่วย เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ‘ยา’ ด้วยกันทั้งสิ้น

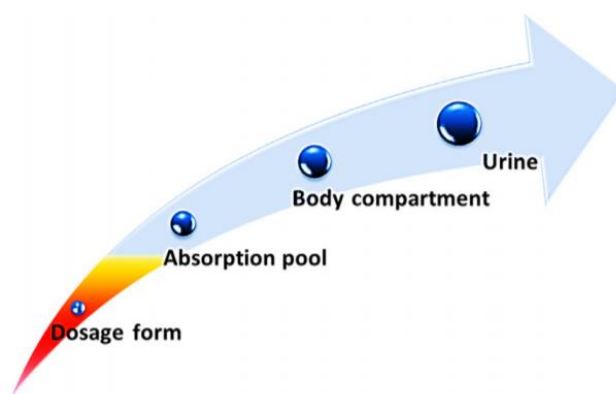
การนำยาเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยเพื่อทำการรักษามีหลากหลายวิธี เรียกวิธีการนำยาเข้าสู่ร่างกายเหล่านี้รวม ๆ ว่า ระบบนำส่งยา (Drug delivery systems; DDSs) วิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมาเป็นเวลานานเรียกว่าวิธีการนำส่งยาแบบดั้งเดิม (Conventional drug-delivery systems) ตัวอย่างเช่น การให้ยาผ่านการรับประทานในรูปแบบยาเม็ด ยาแคปซูล ยาน้ำ หรือการให้ยาผ่านระบบไหลเวียนโลหิต เช่นการฉีดยาเข้าเส้นเลือด เป็นต้น วิธีการนำส่งยาแบบดั้งเดิมนี้อาจมีข้อสังเกตหลายประการ เช่น ยาบางชนิดมีความสามารถในการถูกดูดซึมต่ำ ยาบางชนิดมีผลข้างเคียงมากหากได้รับยาปริมาณมาก ในระยะเวลาสั้น ๆ ยาบางชนิดมีความเสถียรต่ำจนไม่เหมาะกับการนำส่งยาแบบดั้งเดิม หรือมีความผันแปรของระดับยาในพลาสมาจากส่งผลให้ไม่ได้ผลการรักษาตามที่ต้องการ ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงมีความพยายามพัฒนาระบบนำส่งยาแบบใหม่ที่สามารถก้าวข้ามข้อจำกัดของระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิมด้วยการประยุกต์หลายศาสตร์เข้าด้วยกันทั้งเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) เภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamics) ระบบภูมิคุ้มกัน (Immunogenicity) ความเป็นพิษ (Toxicity) และการควบคุมปริมาณยา (Adequacy of medications) [19] เรียกวิธีการนำส่งยาแบบใหม่นี้ว่า ระบบนำส่งยาขั้นสูง (Advanced drug delivery systems) หลักการของวิธีนำส่งยาแบบใหม่นี้คือการนำส่งยาในปริมาณที่กำหนดไปสู่บริเวณที่ต้องการ (เช่นเนื้อเยื่อหรือเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ) โดยควบคุมให้มีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อเนื้อเยื่อรอบ ๆ ที่ปกติน้อยที่สุด [20] โดยอาศัยความได้เปรียบเมื่อเทียบกับระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิมคือความสามารถในการควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาได้อย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอมากกว่า จึงสามารถรักษาระดับความเข้มข้นของยาให้คงที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการรักษา (Therapeutic window) ได้มากกว่า แสดงดังรูปที่ 2-1 อีกทั้งยังลดจำนวนครั้งในการรับยาตลอดการรักษา ลดโอกาสหลงลืม โดยเฉพาะในกรณีของยาปฏิชีวนะ ระบบนำส่งยาขั้นสูงจึงช่วยอำนวยความสะดวกต่อผู้ป่วยได้ด้วย



รูปที่ 2-1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยาในร่างกายผู้ป่วยที่เวลาต่าง ๆ เมื่อมีการให้ยาด้วยระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิม (---) กับแบบควบคุมการปลดปล่อยได้ (ขั้นสูง) (—) [21]

### 2.1.1 ระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิม

ระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิม เป็นระบบนำส่งยาที่นำยาเข้าสู่ร่างกายเป็นครั้ง ๆ ผ่านการรับประทาน การสูดดม การฉีดเข้าเส้นเลือด การซึมผ่านชั้นเมือกในจมูก กระพุ้งแก้ม ลิ้น ตา ช่องคลอด ทวารหนัก การซึมผ่านชั้นผิวหนัง และการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ [22] การปลดปล่อยยาของวิธีนำส่งยาแบบดั้งเดิมนี้จะเป็นการปลดปล่อยยาทั้งหมดที่ให้เข้าสู่ร่างกายในครั้งนั้นแบบทันทีทันใด (Immediate release; IR) ผ่านระบบต่าง ๆ ของร่างกาย แสดงดังรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 เส้นทางของยาที่เข้าสู่ร่างกายด้วยระบบส่งยาแบบดั้งเดิม ตั้งแต่การรับเข้ามาจนกระทั่งถึงการขับถ่ายออก [19]

### 2.1.2 ระบบนำส่งยาขั้นสูง

การพัฒนาปรับปรุงระบบส่งยาในระยะหลังมานี้จะให้ความสำคัญกับ ตัวพาหยา (Drug carrier) เป็นหลัก หน้าที่ของตัวพาหยาในระบบนำส่งยาแบบดั้งเดิม (เช่นแคปซูล) คือการรักษาตัวยาให้



อยู่ในสภาพเดิมจนกระทั่งพาไปถึงบริเวณเป้าหมาย แต่ตัวพายาของระบบนำส่งยาชั้นสูงจะมีหน้าที่เพิ่มเติมคือเป็นตัวควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาเมื่อตัวพายาอยู่ในบริเวณเป้าหมายแล้ว หรือสามารถควบคุมการเริ่มต้นปลดปล่อยยาได้จากตัวกระตุ้นบางอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงค่า pH การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ หรือการถูกกระตุ้นด้วยแสง [23] นอกจากนี้ตัวพายายังสามารถใช้เพิ่มสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ และเพิ่มความสามารถในการดูดซึมของตัวยาที่ไม่ละลายน้ำได้

การมาถึงของระบบส่งยาชั้นสูง เปรียบเสมือน ‘ตัวเปลี่ยนเกม’ ของการวิจัยทางด้านยาอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงมุมมองในการวิจัยไปในทางสรีรวิทยาที่มากขึ้น แทนที่จะคิดค้นสูตรยาสูตรใหม่หรือโมเลกุลยาชนิดใหม่เพื่อต่อสู้กับโรคที่ซับซ้อนขึ้นซึ่งมีต้นทุนทั้งในด้านเงินตราและเวลาที่สูงมาก การมุ่งเน้นที่ระบบนำส่งยาแทนหลายครั้งก็เป็นการทลายข้อจำกัดของตัวยาเมื่อใช้กับวิธีการนำส่งยาแบบดั้งเดิม [24] ช่วยให้สามารถทำการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นจนอาจจะไม่จำเป็นต้องพึ่งพาตัวยาชนิดใหม่ การวิจัยและพัฒนาระบบส่งยาชั้นสูงนี้ถูกวางแผนและนำมาใช้ในทางคลินิกเป็นเวลากว่า 50 ปีแล้ว โดยเลือกใช้ระบบนำส่งยาหลากหลายวิธีด้วยกัน ตัวอย่างเช่น ยาเม็ดที่มีการเคลือบด้วยพอลิเมอร์เพื่อป้องกันการถูกย่อยในระบบย่อยอาหารและชะลอการปลดปล่อยยาในระดับที่กำหนด ยาบรรจุแคปซูลชนิดฝังใต้ผิวหนัง ยาที่ถูกบรรจุลงในพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายในร่างกายได้ และยาที่บรรจุในแผ่นแปะผิวหนังสำหรับปลดปล่อยยาอย่างช้า ๆ เป็นต้น [25]

สำหรับข้อดี - ข้อสังเกต ของระบบนำส่งยาชั้นสูงแสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ข้อดี - ข้อสังเกต ของระบบนำส่งยาชั้นสูง [19]

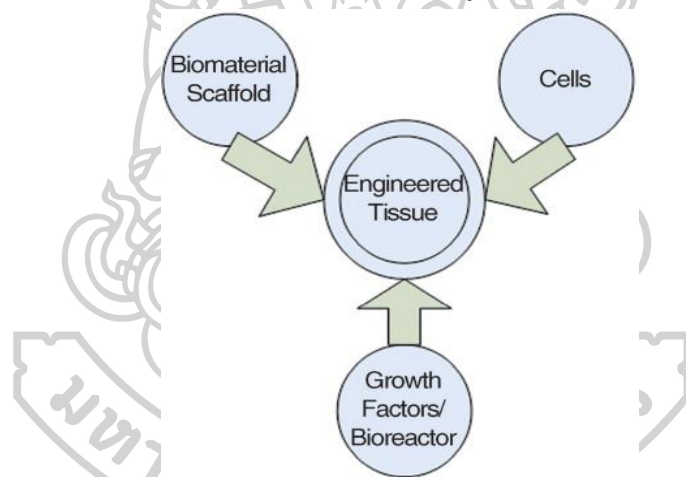
ข้อดี	ข้อสังเกต
1. ลดปริมาณยาที่สูญเสียไปก่อนถึงบริเวณเป้าหมาย	1. อาจเกิดความเป็นพิษจากตัววัสดุที่นำมาใช้
2. ช่วยป้องกันผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ของยา	2. การย่อยสลายของวัสดุอาจก่อความเป็นพิษ
3. ลดจำนวนครั้งในการให้ยา	3. ผลิตภัณฑ์มีต้นทุนการผลิตสูง
4. ลดความผันผวนของความเข้มข้นยาในพลาสมา	
5. เพิ่มความหลากหลายในการใช้งานของยา	
6. เพิ่มความสะดวกในการใช้ยาตามใบสั่งแพทย์ของผู้ป่วย	

## 2.2 โครงเลี้ยงเซลล์

โรค อากาบาดเจ็บ และอาการอักเสบต่างๆ ล้วนแล้วแต่สร้างความเสียหายและขัดขวางการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์ จึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีในการรักษา ซ่อมแซม ปลุกถ่ายหรือฟื้นฟูบริเวณที่เสียหายนั้น โดยทั่วไปแล้วหากความเสียหายที่เกิดขึ้นร้ายแรงเกินกว่าจะใช้ยารักษา แพทย์มักจะเลือกการปลุกถ่ายเนื้อเยื่อจากบริเวณหนึ่งมายังบริเวณที่เสียหายภายในตัวคนไข้คนเดียวกัน เรียกว่าวิธี Autograft หรืออีกวิธีการหนึ่งคือการปลุกถ่ายเนื้อเยื่อจากผู้บริจาค เรียกว่าวิธี Allograft แต่ทั้งสองวิธีนี้มีปัญหาใหญ่คือ วิธี Autograft นั้นกระบวนการเก็บเกี่ยวเนื้อเยื่อมีราคา

แพ่ง รวมไปถึงการเลือกเนื้อเยื่อในบริเวณที่เหมาะสมและไม่ติดเชื้อก็ทำได้ยาก ส่วนวิธี Allograft นั้นจะมีปัญหาเกี่ยวกับการต่อต้านเนื้อเยื่อใหม่โดยระบบภูมิคุ้มกันของคนไข้ อีกทั้งยังมีความเสี่ยงในการนำเชื้อหรือโรคจากผู้บริจาคเข้าสู่ผู้ป่วยได้ ด้วยสาเหตุดังกล่าว กระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงมุ่งมั่นที่จะฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่เสียหายแทนที่จะปลูกถ่ายใหม่ โดยการพัฒนาวัสดุทดแทนสำหรับช่วยคงสภาพและสนับสนุนการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ [26, 27]

กระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อในปัจจุบันนิยมใช้โครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติที่มีรูพรุน (Porous 3D scaffolds) ในการสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการฟื้นฟูเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ โครงเลี้ยงเซลล์นี้จะทำหน้าที่เสมือนแม่แบบที่จะกำหนดทิศทางการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ โดยเนื้อเยื่อในโครงเลี้ยงเซลล์สามารถถูกเพาะเลี้ยงได้จากกระบวนการในหลอดทดลอง (In vitro) แล้วนำไปปลูกถ่ายลงบนบริเวณที่บาดเจ็บ หรือใช้การปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์โดยตรงที่บริเวณที่บาดเจ็บ (In vivo) แล้วจึงเกิดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเพื่อฟื้นฟูส่วนที่เสียหาย กระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีองค์ประกอบสามส่วนหลักๆ แสดงดังรูปที่ 2-3 [1]



รูปที่ 2-3 องค์ประกอบต่างๆของกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [1]

องค์ประกอบแรกคือโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมาจากวัสดุชีวภาพ เพื่อเป็นพื้นที่หรือบ้านให้กับเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ยึดเกาะและเจริญเติบโต ดังนั้นองค์ประกอบที่สองก็คือเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่จะมาเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ และการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหรือเซลล์จะต้องมีปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญเติบโต เช่นอาหาร สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสม เหล่านี้นับเป็นองค์ประกอบที่สาม หากสามองค์ประกอบนี้มีความสอดคล้องกัน ก็จะสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ และเรียกกระบวนการทั้งหมดนี้ว่าวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

## 2.3 ปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องพิจารณาสำหรับการเลือกใช้โครงเลี้ยงเซลล์

### 2.3.1 ความเข้ากันได้กับร่างกาย

ความเข้ากันได้กับร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นปัจจัยแรกที่จะถูกพิจารณาเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาใช้งาน วิเคราะห์ได้จากการทดสอบเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเซลล์ต้นแบบจะต้องยึดติดกับโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี สามารถเจริญเติบโตและทำหน้าที่ได้ตามปกติ รวมไปถึงสามารถแผ่ขยายหรือเคลื่อนย้ายเข้าไปในโพรงหรือรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ นอกจากนี้ โครงเลี้ยงเซลล์จะต้องเกิดปฏิกิริยาในการสร้างภูมิคุ้มกันเล็กน้อย เพื่อป้องกันอาการอักเสบรุนแรงที่จะไปลดความสามารถในการรักษา และป้องกันการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [1]

### 2.3.2 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ

เป้าหมายของวิศวกรรมเนื้อเยื่อคือทำให้เซลล์จากร่างกายค่อย ๆ เจริญเติบโตแทนที่โครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์จะต้องไม่อยู่ในร่างกายอย่างถาวรและถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ โดยผลที่ได้จากการกระบวนการย่อยสลายควรจะไม่เป็นพิษและสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้โดยไม่เกิดการรบกวนอวัยวะอื่น ๆ [28]

### 2.3.3 สมบัติเชิงกล

โครงเลี้ยงเซลล์ควรมีสมบัติเชิงกลที่สอดคล้องกับลักษณะกายวิภาคในบริเวณที่นำโครงเลี้ยงเซลล์ไปปลูกถ่าย และต้องแข็งแรงพอที่จะนำมาปลูกถ่ายด้วยวิธีการผ่าตัดได้ การสังเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสมบัติเชิงกลที่สูงพอนับว่าเป็นความท้าทายอย่างมากเมื่อนำมาใช้เป็นโครงสร้างกระดูกหรือกระดูกอ่อน เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์จะต้องคงสภาพสมบัติเชิงกลไว้ให้ได้จนกระทั่งการเจริญเติบโตของเซลล์เสร็จสมบูรณ์ [29] ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวนี้จะแตกต่างกันไปตามแต่ช่วงอายุของผู้ป่วยด้วย เช่นในคนหนุ่มสาว เมื่อกระดูกมีการแตกหักจะใช้ระยะเวลาประมาณหกสัปดาห์ในการฟื้นฟูสภาพเซลล์กระดูกบริเวณที่แตกหักนั้น และใช้เวลาอีกประมาณหนึ่งปีเพื่อให้เซลล์บริเวณที่สร้างใหม่มีความสมบูรณ์แข็งแรงเช่นเดิม แต่ในขณะที่ผู้สูงอายุอัตราการฟื้นฟูก็จะมีช้าลงไปอีก อย่างไรก็ตาม ได้มีการถกเถียงกันในแวดวงวิชาการว่าการมุ่งเน้นพัฒนาวัสดุให้มีสมบัติเชิงกลให้ใกล้เคียงกับกระดูกและกระดูกอ่อนที่สุดไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่ควรคำนึงถึง เพราะวัสดุจำนวนมากที่มีสมบัติเชิงกลที่ใกล้เคียงกับกระดูกและกระดูกอ่อน แต่ทำให้มีรูพรุนเยอะ ๆ ได้ยาก ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (In vitro) ก่อนนำเข้าสู่ร่างกาย (In vivo) ดังนั้นจึงต้องหาจุดสมดุลระหว่างสมบัติเชิงกล และลักษณะของโครงสร้างเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีรูพรุนมากพอให้เซลล์สามารถแทรกซึมเข้าไปเจริญเติบโตได้ [1]

### 2.3.4 ลักษณะของโครงสร้างโครงเลี้ยงเซลล์

ลักษณะของโครงสร้างโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญมาก โดยโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีโครงสร้างที่มีจำนวนรูพรุนมากและเชื่อมต่อกัน เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์จะสามารถเจริญเติบโตเข้าไป

ภายในโครงสร้างเซลลูลาร์ได้ และอาหารเซลลูลาร์จะสามารถแพร่เข้าไปภายในเพื่อหล่อเซลลูลาร์ได้อย่างทั่วถึง นอกจากนี้โครงสร้างที่รูพรุนเชื่อมต่อกันจะช่วยให้ของเสียต่าง ๆ สามารถแพร่ผ่านออกมาจากโครงสร้างเซลลูลาร์ได้ง่ายขึ้น และเมื่อโครงสร้างเซลลูลาร์เกิดการย่อยสลายก็จะช่วยให้สามารถขับออกจากร่างกายได้โดยไม่รบกวนอวัยวะอื่น ๆ และเนื้อเยื่อที่อยู่รอบ ๆ เพราะปัญหาหลักของการย่อยสลายที่บริเวณแกนกลางโครงสร้างเซลลูลาร์คือการนำของเสียจากการย่อยสลายในแกนกลางออกมา [30, 31] อีกปัจจัยที่ต้องพิจารณาคือขนาดของรูพรุน โดยขนาดของรูพรุนจะต้องใหญ่พอให้เซลลูลาร์สามารถเคลื่อนที่เข้าไปภายในโครงสร้างได้แล้วเกิดพันธะกันระหว่างลิแกนด์กับพื้นที่ภายในรูพรุน แต่ก็ต้องเล็กพอที่จะควบคุมความหนาแน่นของลิแกนด์ที่เข้าไปในรูพรุนให้ยังสามารถเกาะกับผนังรูพรุนได้ดี ดังนั้นจะมีขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมค่าหนึ่ง ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลลูลาร์ที่ใช้และรูปแบบของเนื้อเยื่อที่ต้องการ [32, 33]

### 2.3.5 เทคโนโลยีที่ใช้การผลิต

ในการทำให้โครงสร้างเซลลูลาร์สามารถนำไปใช้ทางการแพทย์และผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ เทคโนโลยีในการผลิตโครงสร้างเซลลูลาร์ควรมีความคุ้มค่าในการลงทุนและสามารถขยายขนาด (Scale-up) จากการทำขึ้นต่อขึ้นภายในห้องปฏิบัติการวิจัยมาเป็นการผลิตเป็นชุดได้ นอกจากนี้การพัฒนากระบวนการผลิตให้ได้มาตรฐาน Good manufacturing practice (GMP) ก็เป็นสิ่งสำคัญยิ่งที่จะทำให้นักวิจัยมั่นใจได้ว่าสามารถนำวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ได้จริงกับวงการสาธารณสุข [34]

## 2.4 เทคโนโลยีในการผลิตโครงสร้างเซลลูลาร์

ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการผลิตโครงสร้างเซลลูลาร์หลากหลายวิธี จำแนกตามลักษณะของโครงสร้างเซลลูลาร์ที่ได้ดังนี้

### 2.4.1 เทคโนโลยีการผลิตโครงสร้างเซลลูลาร์รูพรุนหรือโครงสร้างเซลลูลาร์ชนิดฟองน้ำ

เทคนิคอย่างการชะล้างอนุภาค (Particulate leaching) [35], การอัดแก๊ส (Gas foaming) [36] การทำให้แห้งแข็ง (Freeze drying) [37] และการแยกเฟส (Phase separation techniques) [38] เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการขึ้นรูปร่างโครงสร้างเซลลูลาร์รูพรุนแบบฟองน้ำ วิธีการเหล่านี้จะทำการผสมวัสดุชีวภาพกับสารช่วยทำให้เกิดรูพรุน (Porogen) เข้าด้วยกันจากนั้นทำการหล่อ (Cast) หรืออัดรีด (Extrude) เป็นโครงสร้างเซลลูลาร์ แล้วนำไปผ่านกระบวนการนำสารช่วยทำให้เกิดรูพรุนออกเช่น การระเหิด การระเหย หรือการละลาย เพื่อให้ได้โครงสร้างรูพรุนภายในโครงสร้างเซลลูลาร์

### 2.4.2 เทคโนโลยีการผลิตโครงสร้างเซลลูลาร์แบบเส้นใย non-woven

โครงสร้างเซลลูลาร์แบบเส้นใยไม่ว่าจะเป็นชนิด woven หรือ non-woven สามารถกำหนดขนาดของรูพรุน รูปร่างและเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยได้หลากหลาย ข้อดีของโครงสร้างเซลลูลาร์ชนิดนี้คือมีพื้นที่ผิวมากสำหรับให้เซลลูลาร์ยึดเกาะและเอื้อให้การแพร่ของสารอาหารมีความรวดเร็ว ส่งผล

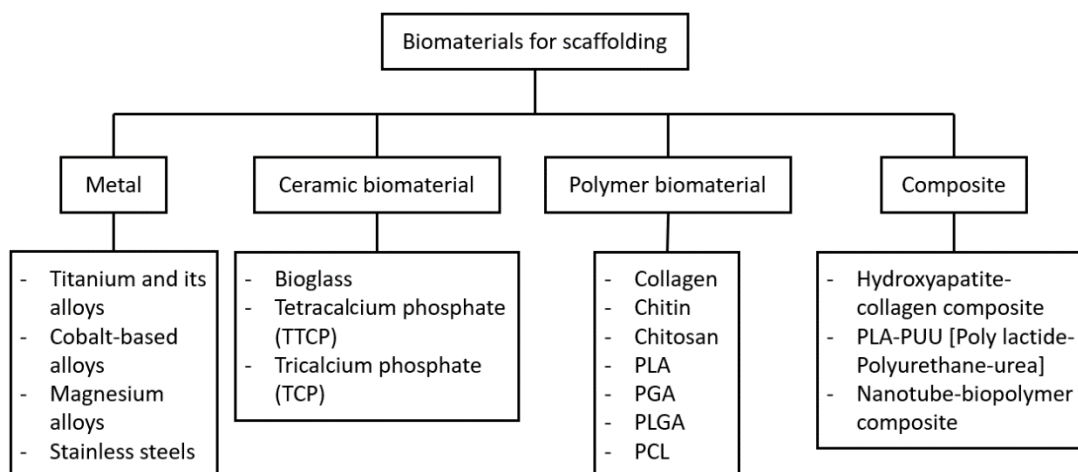
ต่อความอยู่รอดและการเจริญเติบโตของเซลล์ สำหรับเทคนิคที่นิยมใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ชนิดนี้คือเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (Electrospinning) ที่สามารถขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเส้นใยเล็กในระดับนาโนได้

### 2.4.3 เทคโนโลยีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แบบเส้นใย woven

เทคโนโลยีการพิมพ์แบบ 3 มิติ (3D printing) เป็นเทคนิคที่สามารถควบคุมลักษณะทางสถาปัตยกรรมของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ทั้งภายในและภายนอกด้วยคอมพิวเตอร์ มีความแม่นยำสูง โดยมีลักษณะการขึ้นรูปแบบทีละชั้น (Layer by layer) ตัวอย่างเทคนิคที่นิยมใช้คือเทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด (Fused deposition modeling, FDM) ซึ่งสามารถขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุสังเคราะห์ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอยู่ในช่วง 100 – 500 ไมโครเมตรได้ [39] และสามารถออกแบบให้มีรูพรุนแบบเชื่อมต่อกันได้อีกด้วย [40]

### 2.5 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับวัสดุชีวภาพที่นำมาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

การเลือกใช้วัสดุชีวภาพที่นำมาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น วัสดุชีวภาพที่เลือกใช้ควรมีสมบัติที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ มีความเสถียร ทั้งเชิงกลและเคมีที่ดี มีความยืดหยุ่นในการออกแบบและการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เป็นต้น นักวิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาวัสดุชีวภาพหลายชนิดที่เหมาะสมกับการนำมาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ทั้งชนิดที่ได้มาจากธรรมชาติและชนิดที่สังเคราะห์ขึ้น โดยสามารถจำแนกเป็นประเภทต่าง ๆ ได้ดังแสดงในรูปที่ 2-4



รูปที่ 2-4 การจำแนกชนิดของวัสดุชีวภาพสำหรับนำมาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ [41]

### 2.5.1 โลหะ

ในปัจจุบัน โลหะผสมจากโคบอลต์ (Cobalt-based alloys) ไททาเนียมและโลหะผสมไททาเนียม (Titanium and its alloys) [42] โลหะผสมแมกนีเซียม (Magnesium alloys) [43] และเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steels) [44] เป็นวัสดุที่สำคัญในงานทางด้านศัลยกรรมกระดูกและฟัน [45] เนื่องจากมีความเข้ากันได้กับร่างกายได้ดี มีความแข็งแรงเชิงกลสูง และต้านทานการกัดกร่อนได้ดี [46] โดยสามารถจำแนกประเภทตามลักษณะการใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทโลหะดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทโลหะชนิดต่าง ๆ [41]

Materials	Applications
Titanium and its alloys	Maxillofacial, oral, cardiovascular surgery, hip implants
Cobalt-based alloys	Artificial joint implants
Magnesium alloys	Bioresorbable scaffolds, bone regeneration
Stainless steels	Implant dentistry

### 2.5.2 เซรามิก

วัสดุที่จะนำไปใช้ในงานผ่าตัดนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เซรามิกเป็นวัสดุชีวภาพที่สามารถตอบสนองความต้องการนี้ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งเซรามิกยังมีความเสถียรต่อความร้อนและสารเคมีสูง มีความแข็งแรงสูง คงทนต่อแรงกดอัดได้ดี เหมาะสมกับการนำไปใช้งานทางด้านการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อที่ใช้วิธีผ่าตัด (Surgical implants) [47] เซรามิกชีวภาพ (Bio ceramics) สามารถนำไปใช้ฟื้นฟูและซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการใช้งานเซรามิกก็จะแตกต่างกันไปตามลักษณะทางกายภาพของเซรามิก โดยเซรามิกชีวภาพที่เป็นของแข็งจะเหมาะกับการประเภทวัสดุค้ำยันหรือรับน้ำหนัก และการเคลือบลงบนวัสดุปลูกถ่ายเนื้อเยื่อประเภทโลหะ ถ้าเป็นเซรามิกชีวภาพที่เป็นผงและเม็ดขนาดเล็กจะใช้สำหรับเป็นสารเติมเนื้อกระดูก และทำโครงเลี้ยงเซลล์

ถ้าจำแนกชนิดของเซรามิกชีวภาพตามลักษณะการตอบสนองของเนื้อเยื่อ จะสามารถแบ่งได้เป็นสามประเภทหลัก ๆ คือ ประเภทเกือบเฉื่อย (Nearly inert) เช่นอะลูมินา (Alumina) และเซอร์โคเนีย (Zirconia) ประเภทตอบสนองทางชีวภาพ (Bioactive) เช่นแก้วชีวภาพ (Bioactive glass) และประเภทดูดซับซ้มาได้ (Resorbable ceramics) เช่น Tetracalcium phosphate (TTCP) และ Tricalcium phosphate (TCP) เป็นต้น [48] สำหรับลักษณะการใช้งานของเซรามิกบางชนิดที่นิยมนำมาใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แสดงดังตารางที่ 2-3

**ตารางที่ 2-3** การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทเซรามิกชนิดต่าง ๆ [41]

Particulars	Applications
Bioglass	Bone and soft tissue replacement
HAp (derived from <i>Labeo rohita</i> )	Artificial hip joints, dental implants and screws, bone cavity fillings
Tetracalcium phosphate (TTCP)	Dental cement
Tricalcium phosphate (TCP)	Bone replacement

### 2.5.3 พอลิเมอร์

ในวงการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ทั้งพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์ถูกใช้ในการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์มาโดยตลอด โดยหากต้องการโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อที่อ่อนนุ่ม พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติจะเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากพอลิเมอร์ประเภทนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับของเหลวภายนอกเซลล์ที่พบในร่างกายมนุษย์ [49] และมีพื้นผิวของพอลิเมอร์คล้ายคลึงกับพื้นผิวของเซลล์ [50] ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติเช่น คอลลาเจน (Collagen) ไคติน (Chitin) และ ไคโตซาน (Chitosan) เป็นต้น ในทางกลับกันพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่โดยทั่วไปแล้วมีความแข็งแรงเชิงกลมากกว่าก็เป็นตัวเลือกที่ถูกนำมาใช้งานบ่อย ๆ ในงานทางด้านชีวการแพทย์ เนื่องจากมีสมบัติในการย่อยสลายที่รวดเร็ว มีรูพรุนและสมบัติเชิงกลที่ดี ซึ่งสมบัติเหล่านี้สามารถปรับแต่งให้เหมาะสมกับการใช้งานได้ อีกทั้งยังมีต้นทุนที่ไม่สูงมากนัก สามารถนำมาผลิตเป็นจำนวนมาก ๆ ได้ และมีอายุการเก็บรักษาได้นานนำไปใช้งานได้ยาวนาน ในปัจจุบันพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่นิยมใช้งานอย่างแพร่หลายในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีหลายชนิด เช่น PLA PGA PLGA และ PCL เป็นต้น [51] ข้อดีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมาจากพอลิเมอร์สังเคราะห์คือมีความแข็งแรงเชิงกลสูง สามารถออกแบบรูพรุนให้เชื่อมต่อกันภายในโครงสร้างได้ สามารถปรับปรุงหมู่ฟังก์ชันทางเคมีที่บริเวณผิวได้ และสามารถออกแบบรูปร่างได้อย่างอิสระ [52] สำหรับตัวอย่างการนำไปใช้งานของโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์บางชนิดจะแสดงดังตารางที่ 2-4

**ตารางที่ 2-4** การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ [41]

Components	Applications
PLGA, PTFE, Collagens	Orthopedic application
Chitosan, HAp	Bone, cartilage, or osteochondral tissue engineering
Gelatin, HAp, and Collagen	Sustainable and controllable drug delivery

Components	Applications
PPF, Collagen, and Chitosan	Tissue engineering scaffolds
Collagen (derived from Tilapia fish scale)	Food, medical, and cosmetic industries

#### 2.5.4 คอมโพลีเมอร์

โครงข่ายเซลล์ที่เป็นวัสดุคอมโพลีเมอร์สามารถทำได้จากการผสมวัสดุสองชนิดขึ้นไปโดยควบคุมอัตราส่วนโดยปริมาตร ลักษณะสัณฐานวิทยา และการกระจายตัวของวัสดุที่เป็นอนุภาคในเมทริกซ์ให้เหมาะสม เพื่อปรับปรุงสมบัติต่าง ๆ ของโครงข่ายเซลล์ให้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างการพัฒนาวัสดุคอมโพลีเมอร์สำหรับใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเช่น วัสดุคอมโพลีเมอร์ระหว่างไฮดรอกซีอะพาไทต์กับคอลลาเจน (Hydroxyapatite and collagen composite) สำหรับเป็นสารเคลือบผิวโครงข่ายเซลล์เพื่อนำไปใช้ซ่อมแซมกระดูก [53] โดยวัสดุคอมโพลีเมอร์นี้จะช่วยเพิ่มความเข้ากันได้กับทั้งร่างกายของมนุษย์และสัตว์ หรือวัสดุคอมโพลีเมอร์ระหว่างสารประกอบแคลเซียมหรือฟอสเฟตกับแผ่นคอลลาเจนเพื่อเพิ่มความเสถียรของแผ่นคอลลาเจน [54] เป็นต้น สำหรับตัวอย่างการนำไปใช้งานของโครงข่ายเซลล์จากวัสดุคอมโพลีเมอร์บางชนิดจะแสดงดังตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 การนำไปใช้งานของวัสดุชีวภาพประเภทคอมโพลีเมอร์ชนิดต่าง ๆ [41]

Name	Application
Col-HAp	Skeletal bones replacement
PLA-PUU [Poly lactide-Polyurethane-urea]	Tissue engineering
Nanotube-biopolymer composite	Tissue engineering

#### 2.6 พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต

พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate, PBS) คือโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์มาจากธรรมชาติบางส่วน (Partially biobased polymer) ผ่านปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันแบบควบแน่นของ 1,4-บิวเทนไดออล (1,4-Butane diol) และกรดซัคซินิก (Succinic acid) หรือสารประกอบตระกูลแอนไฮไดรด์ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นตัวช่วย [55] โดยกรดซัคซินิกสามารถสังเคราะห์ได้จากกระบวนการหมักของพืชตระกูลแซคคาไรด์เช่นอ้อยหรือข้าวโพด พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตเป็นโพลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิหลอมเหลวค่อนข้างสูง ( $T_m = 115\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) และมีสมบัติเชิงกลที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับโพลิเมอร์ที่มีการใช้งานอย่างกว้างขวางเช่น พอลิเอทิลีน (Polyethylene) และพอลิ



โพรไพลีน (Polypropylene) [56] อีกทั้งพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตยังมีระยะเวลาในการย่อยสลายภายในร่างกายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic degradation) ได้ถึง 65 เปอร์เซ็นต์ใน 105 วัน [8] นอกจากนี้ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตยังมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับวัสดุที่ย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในดินชนิดอื่น ๆ เช่น พอลิคาโพรแลคโตน (Polycaprolactone) ที่มีความสามารถในการเข้ากันได้กับพอลิเมอร์อินทรีย์ตัวอื่นน้อยกว่า [57] และขึ้นรูปยากจากการที่มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าพอลิเมอร์ทั่วไปในท้องตลาดส่วนใหญ่ หรือพอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid) ที่มีสมบัติเชิงกลดีมากแต่ก็มีราคาที่สูงกว่าพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต [58]

การเรียกชื่อพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตสามารถเรียกได้หลายแบบทั้งชื่อทางเคมี และชื่อทางการค้า เช่น Bionolle™, GsPLa®, Ecoflex® และ BioPBSTM เป็นต้น โดยตัวอย่างชื่อทางการค้าที่แพร่หลายในท้องตลาดจะแสดงดังตารางที่ 2-6

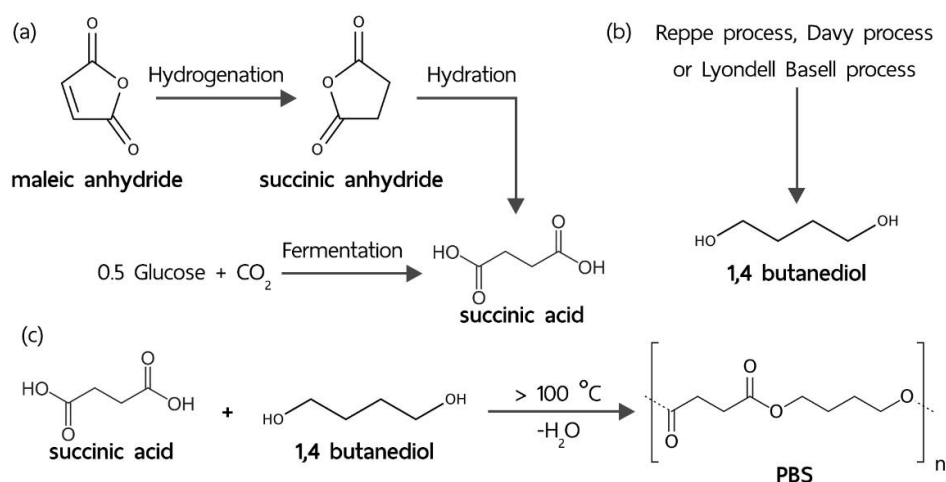
**ตารางที่ 2-6** ชื่อทางการค้าของพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตตามบริษัทผู้ผลิต [59]

ชื่อบริษัท	ชื่อทางการค้า
SHOWA DENKO K.K.	Bionolle™
SK Chemicals	SkyGreen™
ABM composite	ArcBiox™
Mitsubishi Chemical Co., Ltd.	GsPLa®
Mitsubishi Gas Chemicals Co., Ltd.	Lupec
BASF	Ecoflex®
IRE Chemical Ltd.	EnPol
PTT MCC Biochem Co., Ltd	BioPBS™
Northern Technologies International Co., Ltd	Natur-Tec®

### 2.6.1 การสังเคราะห์พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต

ในทางการค้า การสังเคราะห์กรดซัคซินิกจะสังเคราะห์ได้สองวิธีหลัก ๆ หนึ่งคือผ่านกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) ของมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (Maleic anhydride) เป็นซัคซินิกแอนไฮไดรด์ (Succinic anhydride) ตามด้วยกระบวนการไฮเดรชัน (Hydration) ทำให้เป็นกรดซัคซินิก และสองคือผ่านกระบวนการหมักของจุลินทรีย์กับวัตถุดิบที่ปลูกทดแทนได้ เช่น แป้ง น้ำตาล กลูโคส (Glucose) และน้ำตาลไซโลส (Xylose) ที่ได้จากอ้อยหรือข้าวโพด [60] โดยแบคทีเรียที่เหมาะสมกับหมักเพื่อให้ได้กรดซัคซินิกคือ *Escherichia coli Mannheimia succiniciproducens* และ *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [61] สำหรับการสังเคราะห์ในทางการค้าของ

1,4-บิวเทนไดออลจะใช้วัตถุดิบจากผลผลิตทางปิโตรเลียมมาผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนเช่น Reppe process, Davy process และ Lyondell Basell process เป็นต้น โดยทั้งกรดซัคซินิกและ 1,4-บิวเทนไดออลในทางอุตสาหกรรมเกือบทั้งหมดจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อนำมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต แสดงดังรูปที่ 2-5a และรูปที่ 2-5b



**รูปที่ 2-5** (a) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดซัคซินิก; (b) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 1,4-บิวเทนไดออล และ (c) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต

การสังเคราะห์พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตแสดงดังรูปที่ 2-5c สามารถแบ่งออกเป็นสองขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ การก่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) และการก่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น (Polycondensation) [61] ในขั้นแรกจะใช้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดซัคซินิกและ 1,4-บิวเทนไดออลเพื่อสังเคราะห์โอลิโกเมอร์ (Oligomers) ก่อน จากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นเพื่อเติมโมเลกุลของ 1,4-บิวเทนไดออลเพิ่มเข้าไปจนได้พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยระบบจะต้องใช้อุณหภูมิประมาณ 160 ถึง 190 องศาเซลเซียสที่บรรยากาศไนโตรเจนในการหลอมเหลวสารประกอบที่เป็นกรด และใช้อุณหภูมิประมาณ 220 ถึง 240 องศาเซลเซียสร่วมกับตัวเร่งปฏิกิริยาเช่น เตตราไอโซโพรพิล ไททานेट (Tetraisopropyl titanate) แลนทาไนด์ ไทรเฟต (Lanthanide triflates) และทิน(II) คลอไรด์ ( $\text{SnCl}_2$ ) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น [61]

## 2.7 การพิมพ์แบบสามมิติ

การพิมพ์แบบสามมิติ (3D printing) หรือที่รู้จักกันในหลายชื่อเช่น กระบวนการผลิตแบบเพิ่มเนื้อ (Additive manufacturing, AM) กระบวนการสร้างชิ้นงานต้นแบบด้วยความรวดเร็ว (Rapid prototyping, RP) การสร้างของแข็งโดยอิสระ (Solid free form fabrication) หรือ กระบวนการผลิตแบบทีละชั้น (Layered manufacturing) [62] เป็นเทคโนโลยีล่าสุดที่ปฏิวัติวงการวิศวกรรม การออกแบบผลิตภัณฑ์ และกระบวนการผลิต รวมไปถึงปฏิวัติวงการแพทย์ เนื่องจากการ

พิมพ์แบบสามมิตินี้จะทำให้สามารถเปลี่ยนแบบจำลองสามมิติในระบบดิจิทัลให้เป็นวัสดุทางกายภาพได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำสูง โดยในเทคนิคกระบวนการผลิตแบบดั้งเดิมนั้น วัสดุจะถูกสกัด เจาะ เซาะ มาจากของแข็งลักษณะเป็นกล่องให้ได้รูปทรงตามต้องการ เรียกว่ากระบวนการผลิตแบบลบออก (Subtractive manufacturing) แต่สำหรับการพิมพ์แบบสามมิติ ขั้นตอนในการผลิตจะเป็นการสร้างวัตถุทีละชั้น (Layer-by-layer) โดยมีแนวคิดแรกเริ่มมาจากการพัฒนากระบวนการพิมพ์สารยึดเกาะชนิดเหลว (Liquid binder) ลงบนชั้นผง bed บาง ๆ เรียกว่าเทคนิค Thin powder bed ของสถาบันเทคโนโลยีแมสซาชูเซตส์ (MIT) จากนั้นเทคโนโลยีนี้ได้ถูกพัฒนามาโดยตลอดจนในปัจจุบันมีเครื่องพิมพ์แบบสามมิติให้เลือกใช้หลากหลายประเภท และทุกประเภทสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมได้ เครื่องพิมพ์แบบสามมิติประเภทต่าง ๆ ล้วนแล้วแต่พิมพ์วัตถุออกมาตามแบบที่สร้างจากการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบ (Computer-aided-design, CAD) โดยข้อมูลการออกแบบจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะถูกส่งออกมาเป็นไฟล์เพื่อนำไปพิมพ์ ซึ่งไฟล์ที่ส่งออกมานี้จะแบ่งรูปทรงสามมิติที่ออกแบบไว้เป็นชั้น ๆ แล้ววัตถุจะถูกพิมพ์ออกมาทีละชั้น ๆ เทคนิคนี้สามารถใช้ได้ทั้งการพิมพ์วัสดุชนิดเดียว หรือวัสดุที่มีการผสมของหลายวัสดุเข้าด้วยกันโดยแบ่งประเภทวัสดุเป็นชั้น ๆ ในทุกรูปทรง เทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติยังมีประสิทธิภาพในการพัฒนาการออกแบบเนื้อเยื่อและอวัยวะเทียมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางชีวการแพทย์ได้ เช่นการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ หรือ Cancer drug screening โดยการพิมพ์วัตถุจากวัสดุที่มีความเข้ากันได้กับร่างกายหรือแม้กระทั่งพิมพ์เซลล์มีชีวิตลงบนโครงสร้างเนื้อเยื่อแบบสามมิติ (โดยทั่วไปเรียกกระบวนการนี้ว่าการพิมพ์ชีวภาพ (Bioprinting)) [63]

## 2.8 ประวัติโดยสังเขปของการพิมพ์แบบสามมิติ

หากกล่าวถึงที่มาของเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติต้องย้อนกลับไปในช่วงทศวรรษที่ 1980 เมื่อเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติถูกประดิษฐ์ขึ้นครั้งแรกโดยนายชัค ฮัลล์ เขาเรียกเทคโนโลยีนี้ว่า สเตอริโอลิโทกราฟี (Stereolithography) หรือ SLA [64] โดย SLA จะใช้โฟตอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) มากกระทบบริเวณผิวของมอนอเมอร์เหลวที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางเมื่อได้รับแสงได้แล้วสแกนที่รูปแบบต่าง ๆ กัน มอนอเมอร์ที่ถูกสแกนจะมีความว่องไวต่อแสงและเกิดการเชื่อมขวางได้ถ้าให้แหล่งกำเนิดแสงที่เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วโฟตอนจะซึมผ่านผิวค่อนข้างยาก จึงทำให้มอนอเมอร์ในบริเวณลึกลงไปไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ฮัลล์เป็นคนแรกที่พบวิธีการใช้ไฟล์ CAD ในการพัฒนาแบบจำลองโดยใช้คอมพิวเตอร์เพื่อแก้ปัญหาที่ ฮัลล์ได้จดสิทธิบัตรเทคโนโลยีนี้ในปี 1986 นับเป็นสิทธิบัตรแรกของเครื่องพิมพ์แบบสามมิติ จากนั้นฮัลล์ได้ตั้งบริษัทชื่อ 3D Systems เพื่อนำเทคโนโลยี SLA มาใช้ในเชิงพาณิชย์ จึงเกิดเครื่องพิมพ์แบบสามมิติในเชิงพาณิชย์เป็นครั้งแรกขึ้น ภายหลังได้เกิดเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติขึ้นอีกสองชนิดคือ เทคนิคการเผาผนึกวัตถุด้วยแสง เลเซอร์ (Selective laser sintering, SLS) คิดค้นโดยนายคาร์ล อาร์ เดคการ์ด นักศึกษาระดับ

บัณฑิตศึกษาจากมหาวิทยาลัยเทกซัส [65] เทคนิค SLS จะเตรียมผงวัสดุกระจายเป็นชั้น bed อยู่บนฐานแล้วแสงเลเซอร์จะทำการหลอมผงวัสดุนั้นในบริเวณเฉพาะเจาะจงตามที่กำหนดจากข้อมูลทางดิจิทัลที่ได้จากไฟล์ CAD ซึ่งแนวคิดในเรื่องของผงชั้น bed นี้ถูกนำไปต่อยอดเป็นเทคโนโลยีอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญมาก คือการพิมพ์สามมิติแบบอิงค์เจ็ท (Inkjet 3D printing) ถูกคิดค้นโดยกลุ่ม Sachs จากสถาบันเทคโนโลยีแมสซาชูเซตส์ (MIT) เทคโนโลยีนี้จะพิมพ์ได้ทั้งตัวประสานและผงวัสดุเป็นชั้น ๆ โดยใช้ข้อมูลจากไฟล์ CAD ทำให้สามารถพิมพ์ผลิตภัณฑ์จากพอลิเมอร์ โลหะ และเซรามิกที่มีรูปร่างซับซ้อนได้ อย่างไรก็ตามหลังจากกระบวนการหลอมจำเป็นต้องมีขั้นตอนในการเพิ่มความแข็งแรงสูงสุด (Ultimate strength) ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ [66] นายสก๊อตและนางลิซ่า ครัม จึงนำเสนอเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติอีกชนิดคือการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด (Fused deposition modeling, FDM) โดยเทคนิคนี้จะทำการให้ความร้อนแก่เส้นใยเทอร์โมพลาสติกชนิดไม่มีผลึกจนอยู่ในสถานะกึ่งของเหลว แล้วจึงทำการอัด (Extrude) ออกมาอย่างช้า ๆ ลงบนพื้นผิวที่ไม่เหนียวเพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ทีละชั้น ๆ โดยอาศัยข้อมูลจากไฟล์ CAD [63] ต่อมานายรอยด์เดน แชนเดอร์ จูเนียร์ได้ประดิษฐ์เครื่องพิมพ์แบบสามมิติที่สามารถพิมพ์พอลิเมอร์ชนิดเทอร์โมพลาสติกโดยใช้วิธีอิงค์เจ็ทได้ [67] ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้างที่ดีตามแบบและผลิตได้ง่าย เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมานี้จัดเป็นเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติเบื้องต้นในการนำมาผลิตชิ้นงานต้นแบบด้วยความรวดเร็ว (RP) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์และสรุปแบบจำลองที่จับต้องได้ก่อนนำไปผลิตจริง

ตลอดระยะเวลา 15 ปี เทคโนโลยีได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นลำดับทำให้ขอบเขตในการใช้งานเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติขยายออกไปมากยิ่งขึ้น ทั้งจากการนำมาใช้ผลิตชิ้นงานต้นแบบด้วยความรวดเร็ว (RP) ไปสู่กระบวนการผลิตแบบเพิ่มเนื้อ (AM) รวมไปถึงความก้าวหน้าของเทคโนโลยีเลเซอร์และลำอเล็กตรอนที่ปฎิบัติการใช้งานในด้านอุตสาหกรรมของเทคโนโลยีการพิมพ์ สำหรับการใช้งานด้านชีวการแพทย์ ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคการพิมพ์โดยใช้หุ่นยนต์ หรือเทคนิคการพิมพ์ทางชีวภาพโดยใช้เลเซอร์มาช่วยในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ มากมาย [68] ในปี 2009 คณะกรรมการระหว่างประเทศที่กำหนดมาตรฐานการทดสอบทางด้านวัสดุได้ถูกจัดตั้งขึ้นในชื่อ American Society for Testing and Materials (ASTM) [69] และกำหนดมาตรฐาน ASTM F42 สำหรับการจัดกลุ่มเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติทั้งหมดออกเป็น 7 กลุ่มใหญ่ ๆ แสดงในตารางที่ 2-7 และเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติที่แบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามมาตรฐาน ASTM นี้จะแสดงในตารางที่ 2-8 พร้อมกับข้อมูลผู้จัดจำหน่ายและตัวอย่างวัสดุที่ใช้ในแต่ละการใช้งานทางการแพทย์

ตารางที่ 2-7 มาตรฐานของเทคนิค AM จำแนกตามวัสดุ กระบวนการผลิต และการใช้งาน [70]

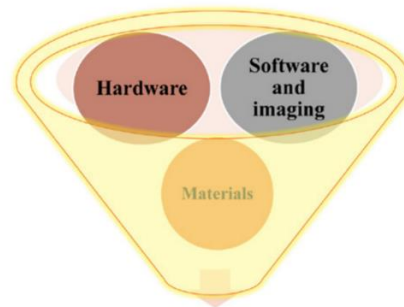
Standards	Category AM Standards (specific to material category or process category)	Applications	Test methods
Feedstock materials	Metal powders, ceramic powders, photopolymer resins, polymer powders, polymer filaments, etc.	Aerospace, medical, automotive, etc.	Mechanical test method, post-processing methods, NDE/NDT methods, bio-compatibility test method, chemical test methods, etc.
Process/equipment	Material jetting, powder bed fusion, binder jetting, directed energy deposition, material extrusion, sheet lamination, vat photopolymerization, etc.	Aerospace, medical, automotive, etc.	Mechanical test method, post-processing methods, NDE/NDT methods, bio-compatibility test method, chemical test methods, etc.
Finished part	Titanium alloy, paper, sand, nylon, ABS, aluminum alloy, nickel-based alloy, etc.	Aerospace, medical, automotive, etc.	Mechanical test method, post-processing methods, NDE/NDT methods, bio-compatibility test method, chemical test methods, etc.

**ตารางที่ 2-8** ประเภทของเทคโนโลยีการพิมพ์แบบสามมิติพร้อมตัวอย่างวัสดุที่เหมาะสมในการนำมาใช้งานทางด้านทางการแพทย์ และตัวอย่างผู้จัดจำหน่าย [70]

Types of 3D printing technologies	Examples of materials for processes application in medicine	Examples of commercial vendors
Vat photopolymerization	A large variety of photocurable polymers	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stereolithography from 3D Systems</li> <li>• Bioplotters from Envisiontec</li> <li>• Large Area Maskless Photopolymerization from DDM Systems</li> <li>• Lithoz Lithography-Based Ceramic Manufacturing</li> </ul>
Power bed fusion	A large variety of polymers, metals, and ceramic materials have been used with this technique, including PCL, HA, PLLA, tricalcium phosphate, and poly(3-hydroxybutyrate)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selective Laser Sintering from 3D Systems</li> <li>• Electron Beam Melting from Arcam AB</li> <li>• Direct Metal Laser Sintering from EOS</li> <li>• Selective Laser Melting from SLM Solutions</li> </ul>
Material jetting	A variety of polymers and ceramics have already been used, including polycaprolactone (PCL), hydroxyapatite (HA), bioactive glasses, polylactic acid (PLA)/polyethylene glycol (PEG), and hydroxymethylglycolideco-ε-caprolactone	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Objet from Stratasys</li> <li>• Solidscape 3D Printers from Solidscape</li> <li>• Multi-jet Fusion Technology from HP</li> </ul>
Material extrusion	Structural and biopolymers, ceramic-polymer, or metal-polymer composites	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fused Deposition Modeling from Stratasys</li> </ul>
Directed energy deposition	HA/PLA, HA/PCL, and bioactive glass (6P53B)/PCL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laser Engineered Net Shaping from Optomec Inc.</li> <li>• Direct Metal Deposition from DM3D</li> <li>• Electron Beam Welding from Sciaky Inc.</li> </ul>
Binder jetting	HA/PLA, HA/PCL, and bioactive glass (6P53B)/PCL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zcorp</li> <li>• ExOne</li> <li>• Voxeljet</li> </ul>
Sheet lamination	A variety of materials, including HA, zirconia, HA/MG63 (osteoblastlike cell), human osteoprogenitor cell (i.e., a cell that has the potential to transform into one that forms bone), and human umbilical vein endothelial cell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mcor Technologies</li> </ul>

## 2.9 องค์ประกอบพื้นฐานของการพิมพ์แบบสามมิติ

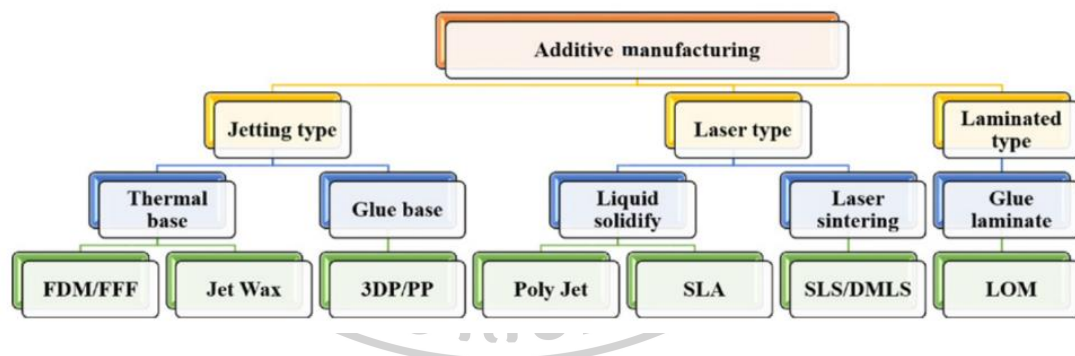
องค์ประกอบพื้นฐานของการพิมพ์แบบสามมิติสามารถแบ่งออกได้เป็นสามกลุ่มคือ (1) ส่วนอุปกรณ์ (Hardware) หมายถึงตัวเครื่องพิมพ์แบบสามมิติด้วย (2) ส่วนชุดคำสั่ง (Software) ใช้สำหรับสื่อสารกับส่วนอุปกรณ์และแปลงรูป CAD ไปเป็นรูปทางสเตอร์ิโอลิโทกราฟีให้กับเครื่องพิมพ์ และ (3) วัสดุที่ใช้ในการพิมพ์ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในรูปที่ 2-6



Components of 3D printing

รูปที่ 2-6 องค์ประกอบต่างๆของการพิมพ์แบบสามมิติ [70]

ในรูปที่ 2-7 แสดงรายการของชนิดเครื่องพิมพ์ในแบบต่างๆที่ใช้ในงานในด้านการแพทย์



รูปที่ 2-7 รายการของชนิดเครื่องพิมพ์ในแบบต่างๆที่ใช้ในทางการแพทย์ [70]

จากรูปที่ 2-7 จะเห็นว่าชนิดของเครื่องพิมพ์ที่จะเลือกใช้ขึ้นอยู่กับวัสดุ โดยการเลือกวัสดุจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับการใช้งานด้วย ในทางการแพทย์มีการเลือกใช้วัสดุค่อนข้างหลากหลายมาใช้ผลิตอุปกรณ์ทางการแพทย์ อวัยวะเทียม หรือวัสดุปลูกถ่ายต่างๆ ด้วยกระบวนการ AM ตัวอย่างเช่น ไททาเนียม (Ti) และไททาเนียมผสม (Alloys) เป็นวัสดุที่เคยได้รับความนิยมในกระบวนการ AM สำหรับวัสดุปลูกถ่ายทางการแพทย์ [71] เนื่องจากมีสมบัติทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่ดีเยี่ยม เช่นทนทานต่อการกัดกร่อน มีความแข็งแรงสูง และมีความเข้ากันได้กับร่างกายดี อย่างไรก็ตาม วัสดุที่เป็นโลหะเหล่านี้มีข้อจำกัดว่าอาจทำปฏิกิริยากับสารบางชนิดได้ จึงนำไปใช้งาน

ได้ค่อนข้างจำกัด [72] วัสดุกลุ่มเซรามิกและพอลิเมอร์จึงเป็นกลุ่มวัสดุที่ถูกนำมาศึกษาความเป็นไปได้ และปัจจุบันก็ได้รับความนิยมในกระบวนการพิมพ์แบบสามมิติ

ในการพิมพ์โครงสร้างสามมิติ เครื่องพิมพ์จะต้องทราบทั้งรูปร่างและขนาดของแบบ จึงจำเป็นต้องเชื่อมต่อส่วนอุปกรณ์ (เครื่องพิมพ์สามมิติ) กับส่วนชุดคำสั่งให้ถูกต้อง เพื่อให้เครื่องพิมพ์สามมิติสามารถอ่านและดำเนินการตามแบบรูปทรงเชิงสามมิติที่กำหนดได้ ในการพิมพ์ผลิตภัณฑ์ที่มีความซับซ้อนมาก ๆ จะต้องใช้แบบที่มีความละเอียดสูง หรือแบบที่ได้จากการสแกนวัตถุจริงโดยใช้เทคนิคเช่นการถ่ายภาพส่วนตัดโดยอาศัยคอมพิวเตอร์ (Computed axial tomography, CT) การถ่ายภาพส่วนตัดโดยอาศัยคอมพิวเตอร์ด้วยลำแสงชนิดกรวย (Cone beam CT, CBCT) หรือเครื่องสร้างภาพด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic resonance imaging, MRI) เป็นต้น [73] การถ่ายภาพส่วนตัดโดยอาศัยคอมพิวเตอร์หรือ CT นั้นจะใช้คลื่นเอกซเรย์ในการสแกนวัตถุ (หรือผู้ป่วย) ได้ทั้งแบบตลอดทั้งชิ้นงานและบางส่วนของชิ้นงานโดยการถ่ายภาพสองมิติเป็นส่วน ๆ ในทุก ๆ มุมที่ช่วงระยะห่างแต่ละภาพประมาณ 0.5-2 มิลลิเมตร แล้วโปรแกรมจะนำภาพมาต่อกันได้เป็นรูปทรงสามมิติที่สามารถบ่งบอรายละเอียดได้อย่างชัดเจน สำหรับเครื่องสร้างภาพด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้าหรือ MRI จะใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและคลื่นวิทยุในการสแกนและสร้างภาพตัดขวางของวัตถุ มักจะใช้ในการสแกนเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค MRI สามารถแยกความแตกต่างของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้จากความแตกต่างของความไว (Sensitive) ต่อการสแกนในแต่ละบริเวณของเนื้อเยื่อ ทำให้ความเข้มสัญญาณที่ได้จากเนื้อเยื่อต่างชนิดกันจะมีความเข้มสัญญาณที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามทั้งสองเทคนิคมีข้อจำกัดในการบอกการกระจายตัวของเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงมีการใช้กระบวนการก่อสร้างรูปแบบทางมิถุนวิทยาขึ้นมาใหม่ (Reconstructed histological sections) มาช่วยในการเก็บข้อมูลเชิงรายละเอียดในแต่ละองค์ประกอบด้วย ขั้นตอนถัดไปคือการสร้างแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์ของอวัยวะหรือเนื้อเยื่อขึ้นมาจากข้อมูลที่ได้ โดยในปัจจุบันได้มีชุดคำสั่งที่สามารถสร้างแบบจำลองของอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่มีความแม่นยำวางจำหน่ายในท้องตลาดแล้ว [74] กล่าวโดยสรุปคือ การทำงานร่วมกันของภาพถ่ายแบบที่เป็นข้อมูลขั้นต้น การคำนวณทางคณิตศาสตร์และการทำแบบจำลอง (Simulation) ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ จะทำให้สามารถสร้างแบบจำลองสามมิติของอวัยวะและเนื้อเยื่อได้อย่างถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สำหรับชุดคำสั่ง CAD ที่ใช้ในการวิเคราะห์และนำภาพสองมิติมาประกอบกันเป็นรูปทรงสามมิตินิยมใช้โปรแกรม SolidWorks ของบริษัท Dassault Systemes โปรแกรม MIMICS และ 3Matic ของบริษัท Materialise และโปรแกรม Pro/Engineer ของบริษัท PTC เป็นต้น เมื่อผ่านกระบวนการวิเคราะห์และประมวลผลจนได้เป็นรูปทรงสามมิติแล้ว ไฟล์ CAD จะถูกแปลงเป็นไฟล์ Stereolithography หรือ STL เพื่อนำไปพิมพ์ต่อไป [75]



เทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติมีความสามารถในการออกแบบและปรับแต่งโครงสร้างที่ซับซ้อนและเฉพาะเจาะจงได้ ซึ่งช่วยเพิ่มทางเลือกในการนำไปใช้งานได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ โดยเฉพาะในงานทางการแพทย์ ซึ่งต้องการความละเอียดและแม่นยำสูง อย่างไรก็ตามนอกจากความสามารถของเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติแล้ว การเลือกใช้วัสดุให้เหมาะสมกับการใช้งานก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถตอบสนองต่อการใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงตัวอย่างการเลือกใช้วัสดุให้เหมาะกับการนำไปใช้งานทางการแพทย์ในตารางที่ 2-9

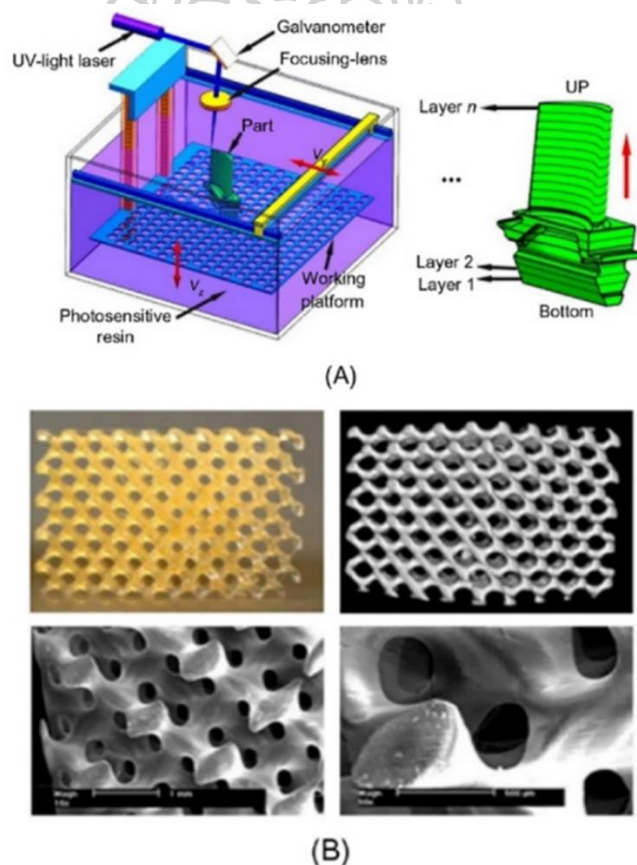
**ตารางที่ 2-9** ชนิดของวัสดุและการนำมาใช้งานทางการแพทย์โดยวิธีการพิมพ์แบบสามมิติ [76]

Material	Applications
Titanium alloys	Dental implants, femoral stems, pacemaker cans, heart valves, fracture plates, spinal cages
Cobalt-chromium alloys	Bearing surfaces, heart valves, stents, pacemaker leads
Platinum group alloys	Electrodes
NiNiNOL	Shape memory applications
Stainless steel	Stents, orthopedic implants
Alumina	Bearing surfaces
Calcium phosphates	Bioactive surfaces, bone substitutes
Carbon	Heart valves
UHMW polyethylene	Bearing surfaces
PEEK	Spinal cages
PMMA	Bone cement, intraocular lenses
Silicones	Soft tissue augmentation, insulating leads, ophthalmological devices
Polyurethane	Pacemaker lead insulation
Expanded PTFE	Vascular grafts, heart valves
Polyester textile	Vascular grafts, heart valves

## 2.10 เทคโนโลยีต่างๆของการพิมพ์แบบสามมิติ

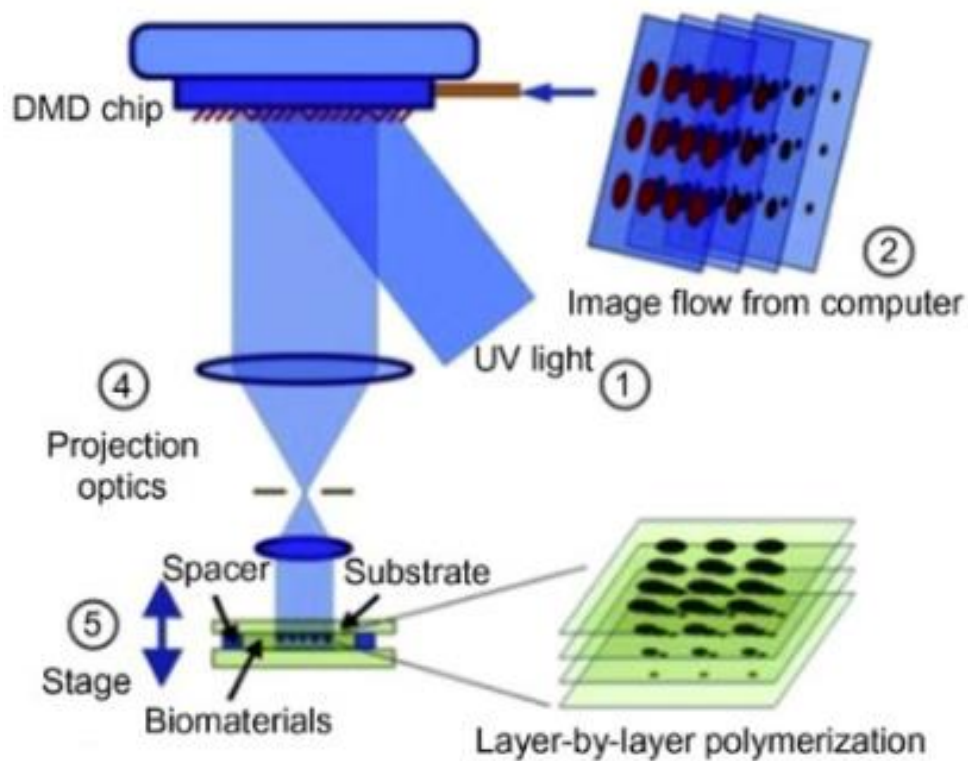
### 2.10.1 การทำให้วัสดุเหลวในอ่างแข็งด้วยแสง (Vat Photopolymerization)

เทคโนโลยีการทำให้วัสดุเหลวในอ่างแข็งด้วยแสงจะใช้กับพอลิเมอร์กลุ่มที่ไวต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV light) หรือเรียกว่าพอลิเมอร์กลุ่มไวต่อแสง (Photopolymer) มาใช้ขึ้นรูป เทคนิคนี้จะใช้เรซินหลอมเหลวมาเทลงบนถาด แล้วใช้แสง UV มาทำการบ่ม (Curing) กับพอลิเมอร์เฉพาะจุด ทำให้พอลิเมอร์บริเวณนั้นแข็งตัวจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่บริเวณผิวเมื่อได้รับแสง UV หลังจากชั้นแรกของเรซินหลอมเหลวถูกบ่ม (Cure) แล้ว ถาดจะถูกยกขึ้นหรือกดลง ตามค่าความละเอียดที่กำหนดแล้วจึงทำการฉายแสง UV ให้กับเรซินหลอมเหลวในชั้นถัดไป เรซินจะเชื่อมต่อกันไปเรื่อย ๆ จนเกิดเป็นวัตถุสามมิติขึ้น จากนั้นจึงนำวัตถุสามมิติที่ได้มาให้ความร้อนในเตาที่ควบคุมอุณหภูมิได้ หรือนำมาบ่มอีกครั้งด้วยแสง UV ตลอดทั้งชิ้นงาน เพื่อให้ปฏิกิริยาพอลิเมอร์เซชันสิ้นสุด [77] โดยรูปที่ 2-8 จะแสดงชิ้นส่วนพื้นฐานของเครื่องพิมพ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต



รูปที่ 2-8 (A) แผนภาพของเครื่องพิมพ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (SLA) [78] และ (B) ภาพถ่ายภาพ CT และภาพ SEM ของโครงสร้างเนื้อเยื่อพอลิเอพซิลอนคาโพรแลคโตนที่สร้างขึ้นโดยเทคนิคการพิมพ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต [79] เมื่อใช้ Macromer ขนาด 1500 เมตร

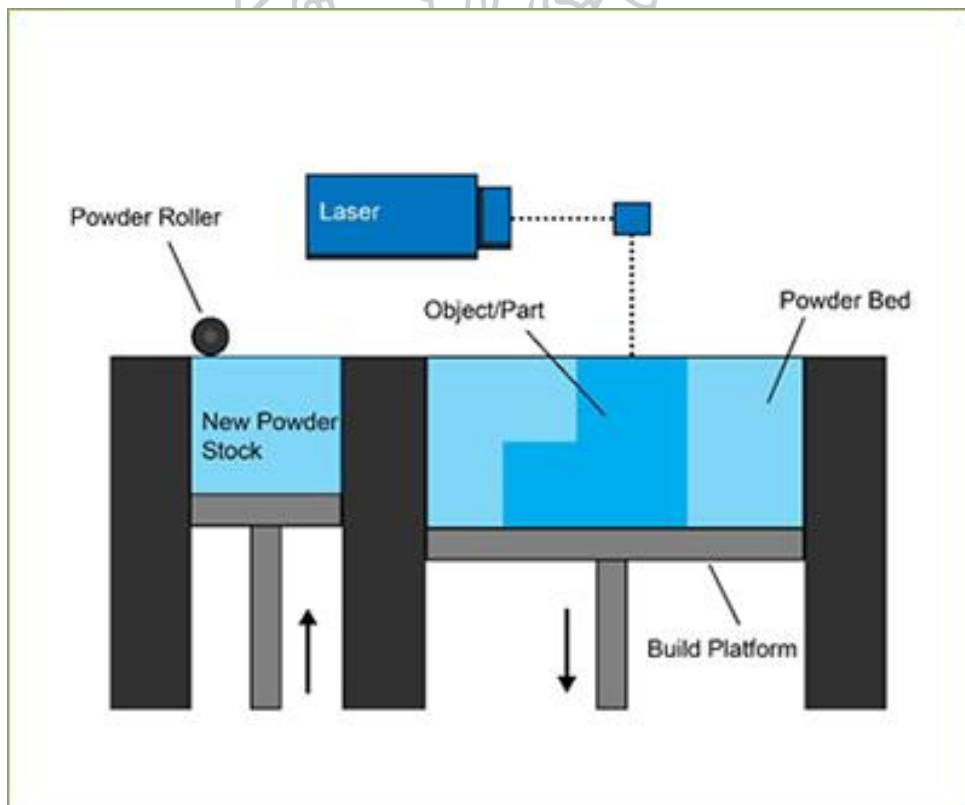
เทคนิคที่ต่อยอดมาจาก SLA คือการสร้างภาพแบบดิจิทัล (Digital light projection) หรือ DLP เป็นเทคโนโลยีใหม่สำหรับการขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ที่ต้องการความละเอียดสูง ภายในเครื่องจะประกอบด้วยกระจกชิ้นเล็ก ๆ เป็นจำนวนนับล้านชิ้นที่สามารถหมุนได้อย่างอิสระ เพื่อปรับแสง UV ให้ได้รูปแบบที่เหมาะสมและฉายลงไปในบริเวณที่กำหนดที่ตั้งแสดงในรูปที่ 2-9 ในปี 2006 ลูและคณะ [80] ได้พัฒนาเทคนิคนี้ให้มีความเรียบง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยใช้อุปกรณ์เพียงแหล่งกำเนิดแสง UV โปรเจกเตอร์สำหรับคอมพิวเตอร์ทั่วไป และอุปกรณ์กระจกขนาดเล็กแบบดิจิทัล (Digital micro device) หรือ DMD แล้วฉายรูปแบบพิกเซลสองมิติลงบนแผ่นโปร่งใส วิธีนี้ทำให้สามารถสิ้นสุดการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้พร้อม ๆ กับการบ่ม ช่วยให้ลดระยะเวลาในการขึ้นรูป และสามารถขึ้นรูปชิ้นงานรูปร่างภายในซับซ้อนได้ พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการควบคุมการกระจายเชิงพื้นที่ของปัจจัยต่าง ๆ ทางชีวภาพภายในโครงสร้างเซลล์มากขึ้นอีกด้วย



รูปที่ 2-9 แผนภาพของเครื่องพิมพ์ชีวภาพ (Bioprinter) ที่ใช้เทคนิค DLP [81]

### 2.10.2 การหลอมผงวัสดุ (Power Bed Fusion)

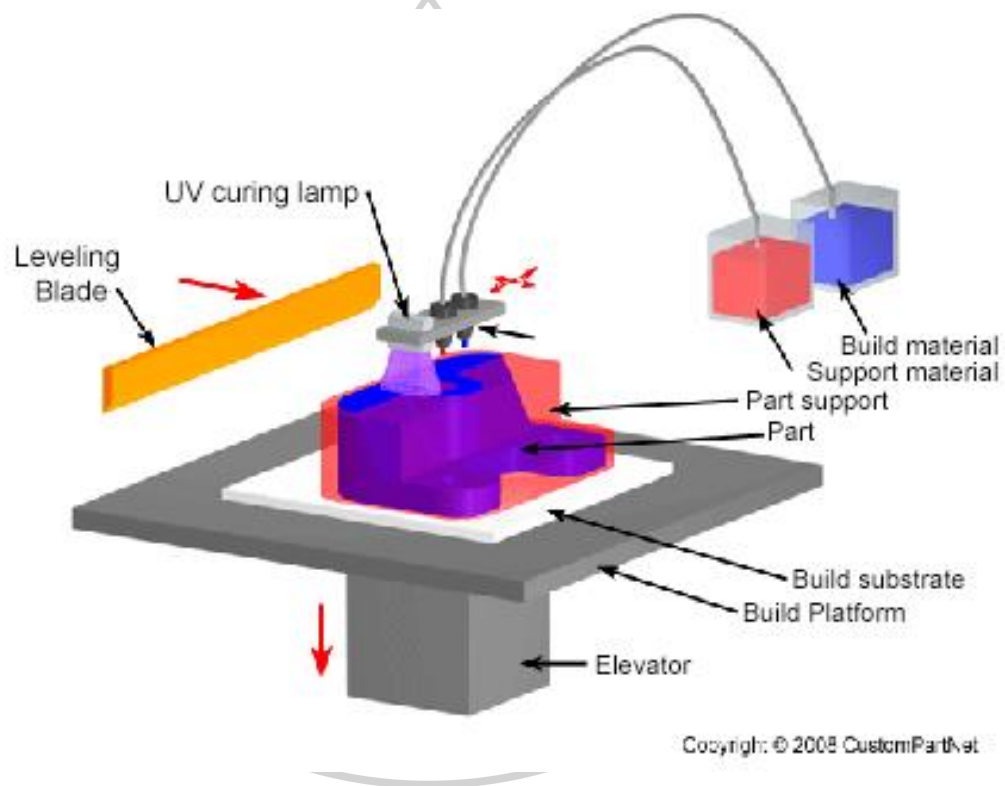
เทคโนโลยีนี้จะใช้กับวัสดุที่เป็นผงได้ โดยมีหลักการคือใช้เลเซอร์ที่มีกำลังสูงยิงลงไปบนวัสดุที่เป็นผงให้เกิดการเชื่อมติดกันอย่างหลวมๆ เรียกว่ากระบวนการเผาซินเทอร์ (Sintering) เทคนิคที่ใช้หลักการนี้จะเรียกว่าเทคนิคการเผาพูนที่ควบคุมด้วยแสงเลเซอร์ (Selective laser sintering, SLS) มีขั้นตอนคือทำการยิงเลเซอร์กำลังสูงไปยังบริเวณชั้นผงสองมิติที่กำหนด ชั้นผงบริเวณดังกล่าวจะฟอร์มตัวเป็นวัตถุรูปทรงสามมิติ จากนั้นทำการเลื่อนชั้นที่ฟอร์มตัวแล้วลงเล็กน้อย แล้วจะมีชั้นผงใหม่มาทดแทนด้านบน ทำการยิงเลเซอร์กำลังสูงอีกครั้งตามรูปแบบของชั้นที่สองที่กำหนดไว้ ชั้นที่สองกับชั้นแรกจะเป็นสองชั้นที่ติดกันเป็นชั้นเดียวกัน ทำไปทีละชั้น ๆ จนได้เป็นผลิตภัณฑ์ แสดงดังรูปที่ 2-10 โดยขนาดอนุภาคที่แนะนำสำหรับการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ที่มีความละเอียดสูงคือ 10-150 ไมโครเมตร [82] และกระบวนการเชื่อมกันอย่างหลวมๆ จะเกิดเมื่อได้รับแสงเลเซอร์และมีความร้อนของชั้นผงเพิ่มขึ้นไปจนมีค่าอยู่ในช่วงระหว่างครึ่งหนึ่งของอุณหภูมิหลอมผลึกไปจนถึงอุณหภูมิหลอมผลึกของพอลิเมอร์ชนิดนั้น ๆ เทคโนโลยีนี้จะคล้ายกับเทคโนโลยีการพ่นกาว (Binder jetting) ที่ไม่ต้องมีตัวรองรับงาน (Support) เพราะตัวผงวัสดุสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรองรับงานได้



รูปที่ 2-10 แผนภาพของกระบวนการ SLS [83]

### 2.10.3 การพ่นวัสดุ (Material Jetting)

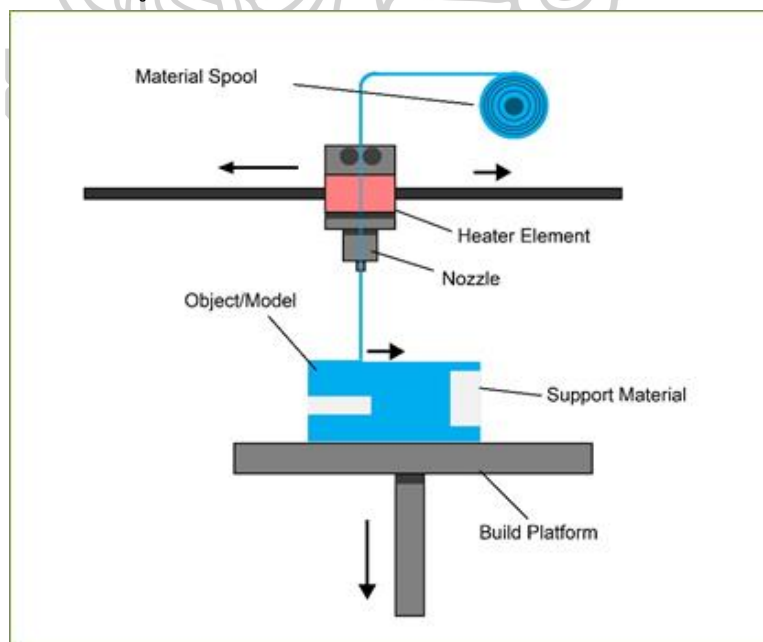
เป็นวิธีการพิมพ์ที่คล้ายกับการพิมพ์เอกสาร โดยเปรียบพลาสติกหลอมเหลวเป็นเหมือนน้ำหมึกในเครื่องพิมพ์เอกสาร มีหลักการทำงานคือเมื่อหัวฉีดอยู่ในตำแหน่งที่ต้องการเหนือฐานรองแล้วหยดพลาสติกหลอมเหลวจะถูกขับออกมา (Jetting) ลงบนผิวของฐานรอง จากนั้นจะถูกทำให้แข็งตัวโดยใช้แสง UV จะได้ชั้นแรกของผลิตภัณฑ์ ทำการหยดพลาสติกหลอมเหลวในชั้นต่อไปลงบนชั้นแรกทำต่อเนื่องเป็นชั้น ๆ ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์ที่สมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 2-11 วิธีการนี้จำเป็นต้องให้พอลิเมอร์หลอมเหลวออกมาเป็นหยดได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าความหนืดและแรงตึงผิวของพอลิเมอร์แต่ละชนิด ดังนั้นพอลิเมอร์ที่สามารถใช้เทคนิคนี้ได้จะค่อนข้างจำกัด [84]



รูปที่ 2-11 แผนภาพของกระบวนการพ่นวัสดุ (Material jetting) [84]

#### 2.10.4 การฉีดวัสดุผ่านหัวฉีด (Material Extrusion)

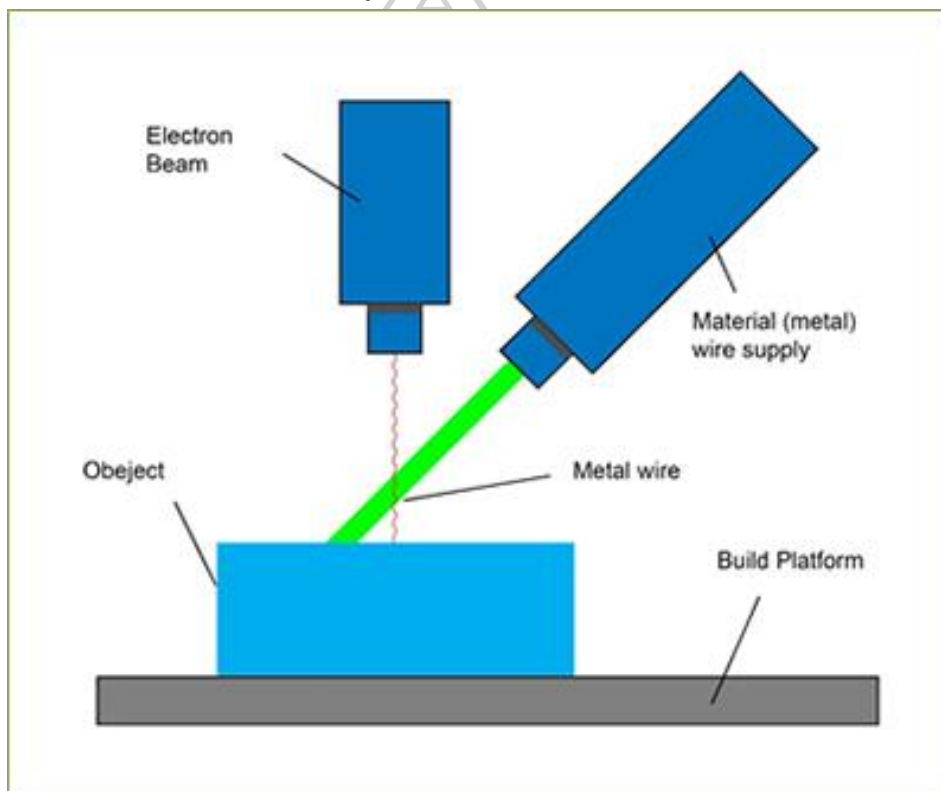
เทคโนโลยีการฉีดวัสดุผ่านหัวฉีดเป็นเทคโนโลยีที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายที่สุด จากข้อดีเรื่องของกลไกที่เรียบง่าย มีต้นทุนต่ำเมื่อเทียบกับเทคโนโลยีอื่น ๆ ในการผลิตวัตถุแบบอิสระ (Free form fabrication) สำหรับเทคนิคที่ใช้มากที่สุดในกลุ่มนี้คือเทคนิค Fuse deposition modeling หรือ FDM เนื่องจากข้อดีดังที่ได้กล่าวมา อีกทั้งชุดคำสั่งของเทคนิค FDM นี้เป็นโอเพนซอร์ซที่สามารถนำไปใช้ได้โดยไม่ติดลิขสิทธิ์อีกด้วย หลักการทำงานของเทคโนโลยีนี้ก็คือทำการป้อนเส้นใย (Filament) เทอร์โมพลาสติกเข้าไปยังหัวฉีดโดยใช้ระบบปั๊มที่มีความแม่นยำ ซึ่งจะให้ความร้อนจนกระทั่งเส้นใยพอลิเมอร์หลอมเหลว ระบบคอมพิวเตอร์จะควบคุมการเคลื่อนที่ของหัวฉีดให้เคลื่อนที่บนระนาบ  $x$  และ  $y$  ไปยังพื้นที่ผิวที่กำหนดแล้วฉีดพอลิเมอร์หลอมเหลวออกมา เมื่อชั้นแรกแข็งตัวหัวฉีดจะเคลื่อนที่ขึ้นตามแนวแกน  $z$  เพื่อฉีดชั้นต่อไปทับซ้อนกันไปเรื่อย ๆ จนเกิดเป็นรูปวัตถุ 3 มิติขึ้นมาดังแสดงในรูปที่ 2-12 วัสดุที่นิยมใช้กับเทคโนโลยีนี้คือพลาสติกจำพวกพอลิคาร์บอเนต (Polycarbonate, PC) เอบีเอส (Acrylonitrile butadiene styrene, ABS) พอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSF) และพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิคาร์บอเนตกับเอบีเอส (PC-ABS blends) เป็นต้น [85] ข้อดีของเทคนิค FDM คือไม่จำเป็นต้องใช้สารละลายที่อาจเป็นพิษได้ และการใช้เส้นใยเป็นวัตถุดิบทำให้กระบวนการขึ้นรูปมีความต่อเนื่องและประหยัดวัตถุดิบได้มาก รวมไปถึงสามารถใช้กับวัสดุได้หลากหลายประเภท [86] แต่เทคนิค FDM ก็มีข้อจำกัดคือเป็นเทคนิคที่ตัวแปรต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อคุณภาพของชิ้นงานจะขึ้นอยู่กับขนาดของเส้นใยและตัวชิ้นงานเองมากกว่าเทคนิคอื่น ๆ [87]



รูปที่ 2-12 แผนภาพของกระบวนการฉีดวัสดุผ่านหัวฉีด (FDM extrusion) [88]

### 2.10.5 การเพิ่มวัสดุด้วยการฉายพลังงาน (Directed Energy Deposition)

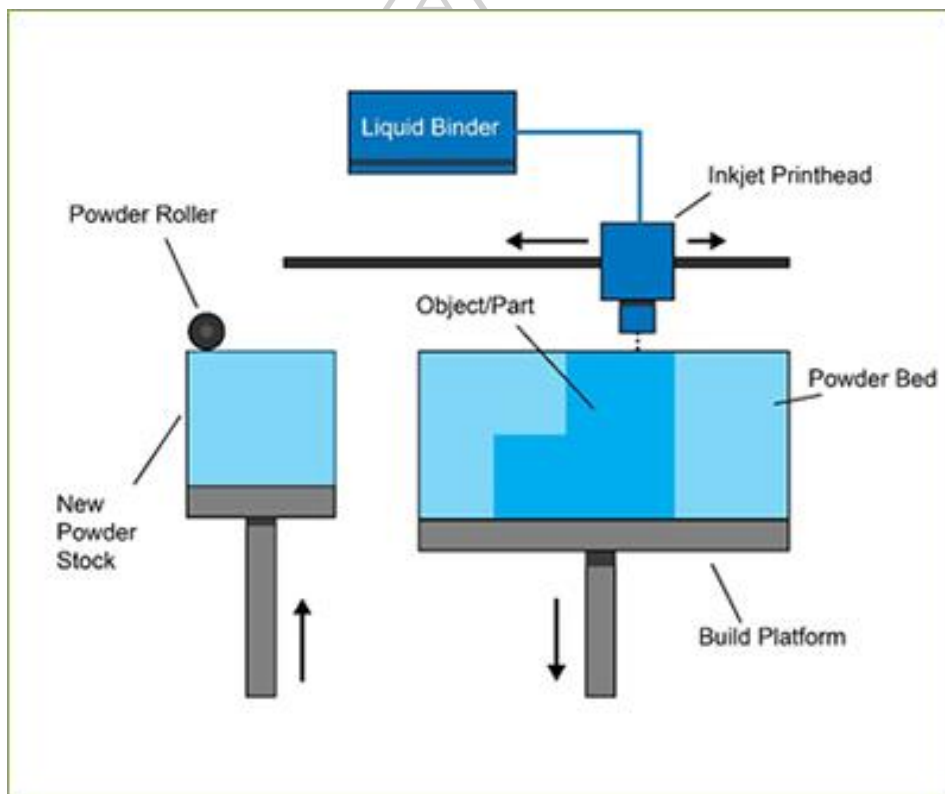
การเพิ่มวัสดุด้วยการฉายพลังงานหรือ DED เป็นเทคโนโลยีการพิมพ์แบบขับเคลื่อนที่มักใช้ใน งานซ่อมแซมหรือเพิ่มเติมส่วนต่าง ๆ ลงบนวัตถุเดิม นิยมใช้ในอุตสาหกรรมไฮเทค มีหลักการคือ เครื่อง DED จะติดตั้งหัวฉีดที่สามารถเคลื่อนที่ได้ในหลายทิศทาง มีแกนทิศทางเคลื่อนที่ 4 ถึง 5 แกน จึงสามารถเข้าไปยังพื้นผิวเฉพาะที่ต้องการได้ ขั้นตอนการทำงานจะคล้ายกับเทคโนโลยีการฉีดวัสดุ ผ่านหัวฉีด โดยพ่นผงหรือลวดโลหะลงไปพร้อมกับใช้ลำอิเล็กตรอน ลำเลเซอร์ หรือพลาสมาในการ หลอมละลายโลหะ จากนั้นโลหะจะแข็งตัวเป็นชั้น ๆ ตามแบบ ดังแสดงในรูปที่ 2-13 แต่ต่างกันว่า หัวฉีดของเครื่อง DED สามารถเคลื่อนที่ได้หลายทิศทางมากกว่า เทคโนโลยีนี้สามารถใช้ได้กับทั้งพอลิ เมอร์และเซรามิก แต่นิยมใช้กับโลหะในรูปแบบผงและลวดมากกว่า [89]



รูปที่ 2-13 แผนภาพของกระบวนการ DED [89]

### 2.10.6 การพ่นกาว (Binder Jetting)

เทคโนโลยีนี้จะใช้วัสดุ 2 ชนิดได้แก่ วัสดุที่เป็นผง และตัวเชื่อมผงที่เป็นของเหลว ตัวเชื่อมผงจะทำหน้าที่เป็นเสมือนกาวยึดชั้นผงวัสดุแต่ละชั้นเข้าด้วยกัน โดยมีหลักการทำงานคือ เครื่องจะเกลี่ยผงแบ่งให้เป็นแผ่นบาง ๆ บนฐานรับ จากนั้นหัวพ่นของเทคโนโลยีนี้จะพ่นตัวเชื่อมผงลงบนชั้นผง และเคลื่อนที่ไปในแนวระนาบแกน x และ y ในบริเวณที่กำหนดเพื่อให้ผงเชื่อมติดกัน หลังจากนั้นฐานรับก็จะเลื่อนลงตามค่าความละเอียดที่ถูกกำหนดไว้ ตัวเกลี่ยผงก็จะเข้ามาเพิ่มเนื้อของชั้นผง แล้วเกลี่ยให้ผงเรียบเสมอกัน เพื่อเริ่มพิมพ์ในชั้นถัดไปจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการ ดังแสดงในรูปที่ 2-14 หลังจากนั้นจะทำการเคาะเอาชั้นผงที่ยึดชิ้นงานไว้ ออก จะได้ชิ้นงานตามต้องการ [90] ข้อดีของเทคโนโลยีนี้ก็คือ ไม่ต้องสร้างตัวรองรับ เพราะผงจะทำหน้าที่เป็นตัวรองรับชิ้นงานตัวเอง

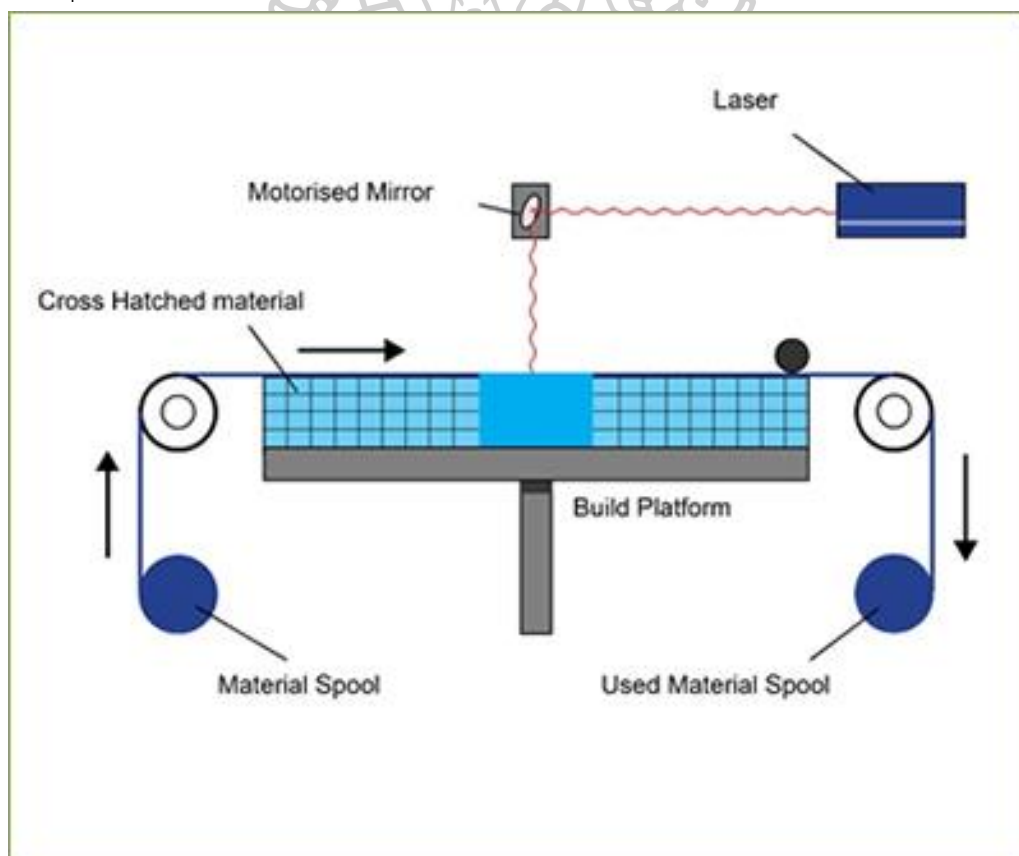


รูปที่ 2-14 แผนภาพของกระบวนการพ่นกาว (Binder Jetting) [90]



### 2.10.7 การยัดวัสดุแผ่นเข้าหากัน (Sheet Lamination)

การยัดวัสดุแผ่นเข้าหากันเป็นเทคโนโลยีหนึ่งในกระบวนการ AM ที่ใช้ในการขึ้นรูปโดยใช้โลหะที่เป็นแผ่นหรือรีบบิ้น แล้วเชื่อมแบบอัลตราโซนิกเพื่อเชื่อมแต่ละแผ่นให้ติดกัน แบ่งเป็นสองประเภทคือ อัลตราโซนิก AM (Ultrasonic additive manufacturing, UAM) และ การขึ้นรูปผลิตภัณฑ์แบบแผ่น (Laminated object manufacturing, LOM) สำหรับเทคนิค UAM มีขั้นตอนคือแผ่นโลหะจะถูกลำเลียงผ่านลูกกลิ้งมายังบริเวณฐานรับ จากนั้นจะถูกตัดด้วยเลเซอร์ให้ได้รูปร่างตามที่ออกแบบไว้ จะได้ชิ้นแรก สำหรับชั้นถัดมาแผ่นโลหะจะถูกลำเลียงผ่านลูกกลิ้งเหมือนเดิมมาทับแผ่นโลหะชั้นแรก แล้วถูกเชื่อมกับชั้นแรกด้วยวิธีอัลตราโซนิก จากนั้นจึงใช้เลเซอร์ตัดให้ได้ตามรูปร่างที่ออกแบบไว้ ทำเช่นนี้ไปทีละชั้น ๆ จนกระทั่งได้ชิ้นงานออกมา ดังแสดงในรูปที่ 2-15 ส่วนเทคนิค LOM จะใช้วิธีการคล้ายกันแต่เปลี่ยนวัสดุจากโลหะเป็นกระดาษและเชื่อมติดกันโดยใช้กาว (Adhesive) แทน วิธีการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำและใช้วัสดุที่แตกต่างกันในแต่ละชั้นได้ครบใดที่สองวัสดุนั้นสามารถเชื่อมติดกันได้โดยใช้การเชื่อมหรือกาว [91]



รูปที่ 2-15 แผนภาพของกระบวนการยัดวัสดุแผ่นเข้าหากัน (Sheet Lamination) [91]

## 2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**Dietmar W. Hutmacher และคณะ** [29] ทำการศึกษาการใช้โครงเลี้ยงเซลล์มาทดแทนกระดูก และกระดูกอ่อนด้วยเทคนิคทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยใช้วัสดุที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (Biodegradable) และดูดซับน้ำทางชีวภาพได้ (Bioresorbable) ในทางทฤษฎีนั้น โครงเลี้ยงเซลล์ควรจะมีลักษณะเป็นรูปทรงสามมิติที่มีรูพรุนมากและรูพรุนเชื่อมต่อกันเป็นโครงข่ายภายในโครงสร้าง เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและให้การลำเลียงสารอาหารรวมถึงของเสียจากเซลล์เป็นไปได้อย่างสะดวก โดยสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายและการดูดซับน้ำได้เพื่อให้สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อทั้งในหลอดทดลองหรือในร่างกาย และมีสมบัติทางเคมีของพื้นผิวที่เหมาะสมสำหรับการยึดเกาะของเซลล์ การขยายตัวของเซลล์ และการแบ่งตัวของเซลล์ รวมไปถึงสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์จะต้องสอดคล้องกับลักษณะของเนื้อเยื่อในบริเวณที่ทำการปลูกถ่าย สำหรับเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เช่น การทำพันธะระหว่างเส้นใย (Fiber bonding) การหล่อด้วยตัวทำละลาย (Solvent casting) การชะล้างด้วยอนุภาค (Particulate leaching) การเคลือบผิวเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane lamination) และการหลอมด้วยแม่พิมพ์ (Melt molding) แสดงดังตารางที่ 2-10

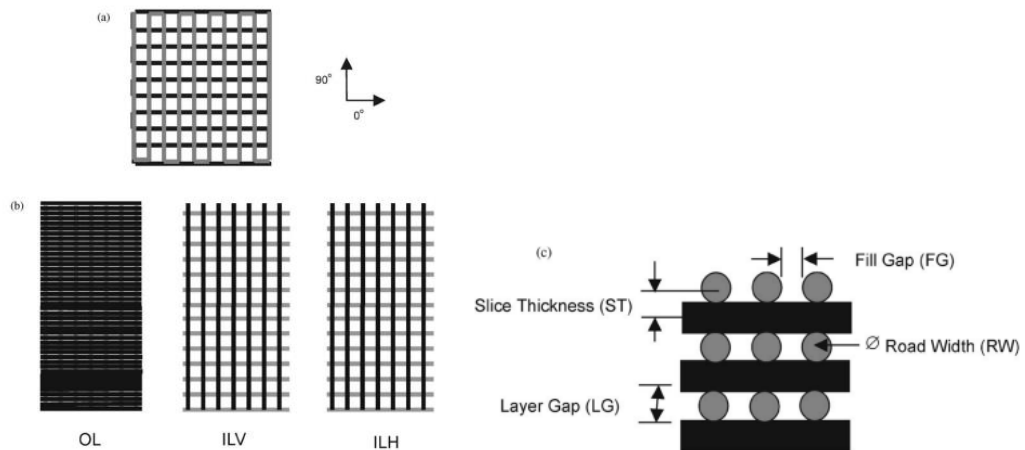
**ตารางที่ 2-10** เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ [29]

Fabrication technology	Material properties required for processing	Scaffold design and reproducibility	Achievable pore size in $\mu\text{m}$	Porosity in %	Architecture
Solvent casting in combination with particular leaching	Soluble	User, material, and technique sensitive	30-300	20-50	Spherical pores, salt particles remain in matrix
Membrane lamination	Soluble	User, material, and technique sensitive	30-300	<85	Irregular pore structure
Fabrication of non-woven	Fibers	Machine controlled	20-100	<95	Insufficient mechanical properties
Melt molding	Thermoplastic	Machine controlled	50-500	<80	

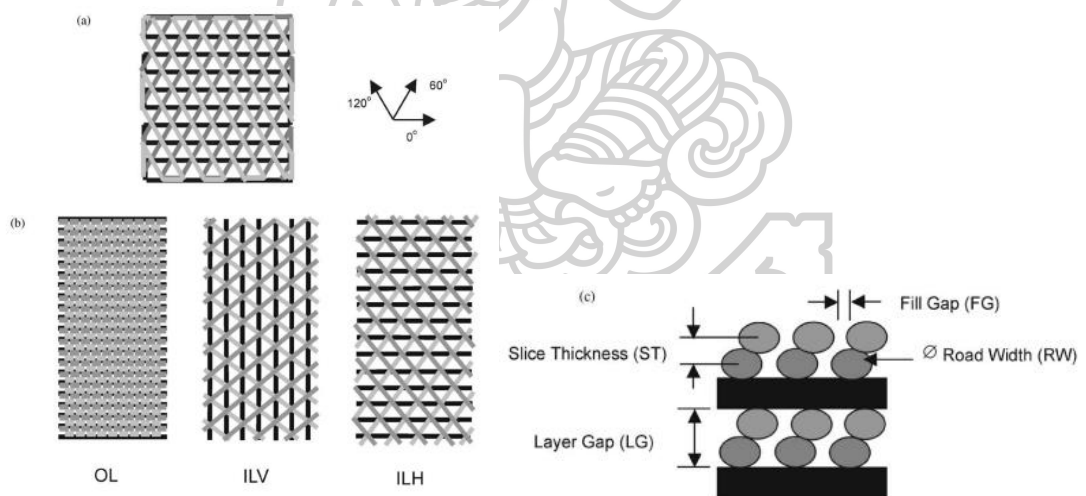
Fabrication technology	Material properties required for processing	Scaffold design and reproducibility	Achievable pore size in $\mu\text{m}$	Porosity in %	Architecture
Extrusion in combination with particular leaching	Thermoplastic	Machine controlled	<100	<84	Spherical pores, salt particles remain in matrix
Emulsion freeze-drying	Soluble	User, material, and technique sensitive	<200	<97	High volume of inter-connected micropore structure
Thermally-induced phase separation	Soluble	User, material, and technique sensitive	<200	<97	High volume of inter-connected micropore structure
Supercritical-fluid technology	Amorphous	Material and technique sensitive	<100	10-30	High volume of non-interconnected micropore structure
Supercritical-fluid technology in combination with particle leaching	Amorphous	Material and technique sensitive	Micropores <50 macropore <400	<97	Low volume of non-interconnected micropore structure combined with interconnected macropore structure
3d printing in and without a combination of particle leaching	Soluble	Machine and computer-controlled	45-150	<60	100% interconnected macropore. design and fabrication layer by layer, by use of water-based binder incorporation of biological agents into matrix possible
Fused deposition modeling	Thermoplastic	Machine and computer-controlled	>150	<80	100% interconnected macropore structure. design and fabrication layer by layer

จากตารางที่ 2-10 บ่งชี้ว่าเทคนิค 3d printing ร่วมกับ particle leaching และเทคนิค Fused deposition modeling เป็นเทคนิคการขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ที่ควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่ได้ % porosity สูง และมีลักษณะพิเศษคือได้โครงสร้างรูพรุนขนาดใหญ่ที่เชื่อมต่อกัน 100% แต่เทคนิค 3d printing ร่วมกับ particle leaching นั้นจากในงานวิจัยนี้จะใช้วัตถุดิบตั้งต้นในรูปแบบสารละลาย ส่วนเทคนิค Fused deposition modeling นั้นใช้เทอร์โมพลาสติก ซึ่งมีความสะดวกในการจัดหาวัตถุดิบมากกว่า แต่ข้อเสียคือได้ขนาดรูพรุนขนาดใหญ่กว่า (>150 ไมโครเมตร) เนื่องจากไม่มีรูพรุนขนาดเล็กภายใน ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดว่าจะนำเทคนิค Fused deposition modeling มาใช้ร่วมกับเทคนิค particle leaching น่าจะสามารถปรับปรุงข้อสังเกตของแต่ละเทคนิคได้

**Iwan Zein และคณะ [92]** ทำการศึกษาการขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์โดยใช้เทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด (Fused deposition modeling, FDM) สำหรับนำไปใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เลือกใช้พอลิเอพซิลลอนคาโพรแลคโตน (Poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL) ชนิดเส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.70 มิลลิเมตร น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 80,000 มาเป็นวัสดุในการขึ้นรูป ออกแบบลักษณะเป็นโครงตาข่ายซ้อนกันเป็นชั้น ๆ ใช้ระบบคอมพิวเตอร์ในการควบคุมกระบวนการขึ้นรูป และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโครงสร้างเซลล์เมื่อมีลักษณะทางสถาปัตยกรรมแตกต่างกัน รวมไปถึงผลของปริมาณรูพรุนและช่องว่างภายในโครงสร้างเซลล์ที่แตกต่างกันต่อสมบัติเชิงกล โดยโครงสร้างเซลล์จาก PCL ที่ได้จะใช้ขนาดหัวฉีดและรูปแบบการจัดวางแต่ละชั้นแตกต่างกันตามแต่ละสูตร แสดงดังรูปที่ 2-16, รูปที่ 2-17 และตารางที่ 2-11 กำหนดให้สัญลักษณ์ RW ขนาดคือเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย FG คือระยะช่องว่างระหว่างเส้นใย ST คือความหนา slide และ LG คือระยะช่องว่างระหว่างชั้น และใช้รหัสเรียกแต่ละสูตรเรียงจากลักษณะ lay-down pattern ขนาดของหัวพิมพ์ที่ใช้ และ set value ของค่า ST FG และค่าประมาณ RW



รูปที่ 2-16 (a) Lay-down pattern ที่  $0/90^\circ$  ลักษณะรูปทรงเป็นแบบรังผึ้งสี่เหลี่ยม มุมมองตามทิศทาง Z โดยใช้เทคนิค FDM (b) การจัดเรียงตัวของเส้นใยเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเรียงแนวแบบ Out-of-layer (OL) แบบ In-layer-vertical (ILV) และ In-layer-horizontal (ILH) ที่ระนาบ XY XZ และ YZ ตามลำดับ และ (c) มุมมองหน้าตัดในแนวระนาบ XZ [92]



รูปที่ 2-17 (a) Lay-down pattern ที่  $0/60/120^\circ$  ลักษณะรูปทรงเป็นแบบรังผึ้งสามเหลี่ยม มุมมองตามทิศทาง Z โดยใช้เทคนิค FDM (b) การจัดเรียงตัวของเส้นใยเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเรียงแนวแบบ Out-of-layer (OL) แบบ In-layer-vertical (ILV) และ In-layer-horizontal (ILH) ที่ระนาบ XY XZ และ YZ ตามลำดับและ (c) มุมมองหน้าตัดในแนวระนาบ XZ [92]

**ตารางที่ 2-11** ค่าต่าง ๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร [92]

Specimen group	Tip size used	Lay-down pattern (°)	ST (mm)	RW (mm) <sup>a</sup>	FG (mm)
C2-10-20	T10	0/90	0.254	0.254	0.508
C2-10-28	T10	0/90	0.254	0.254	0.711
C3-10-20	T10	0/60/120	0.254	0.254	0.508
C3-10-28	T10	0/60/120	0.254	0.254	0.711
C2-16-20	T16	0/90	0.254	0.406	0.508
C2-16-28	T16	0/90	0.254	0.406	0.711
C3-16-20	T16	0/60/120	0.254	0.406	0.508
C3-16-28	T16	0/60/120	0.254	0.406	0.711

<sup>a</sup>ค่าขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของทิวป์ที่ใช้

เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์จากมุมมองด้านข้าง (ทิศแกน X และ Y) จะพบว่าช่องว่างที่เกิดจากการตัดผ่านของเส้นใยนั้นมีลักษณะเป็นโครงข่ายที่เชื่อมต่อกัน (Interconnected pores) อย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปด้วยเทคนิค FDM จึงไม่เพียงแต่สามารถออกแบบให้มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบรังผึ้ง 3 มิติได้เท่านั้น แต่ยังสามารถออกแบบให้มีโครงสร้างเป็นรูพรุนเปิดที่เชื่อมต่อกันตลอดทั้งชิ้นงานได้อีกด้วย จากผลการวัดขนาดจริงของโครงเลี้ยงเซลล์ผ่านรูป SEM แสดงดังตารางที่ 2-12 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี lay-down pattern แบบ 0/90° จะมีขนาดช่องว่างในทิศแกน Z ใหญ่กว่าแต่มีช่องว่างในทิศแกน X และ Y เล็กกว่าเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตรเดียวกันที่มี lay-down pattern แบบ 0/60°/120° โดยเฉพาะกับสูตรที่ใช้หัวทิวป์ขนาด T16 และยิ่งใช้หัวทิวป์ขนาดเล็กลงเท่าไร ก็จะทำให้ขนาดของช่องว่างระหว่างเส้นใยใหญ่ขึ้นเท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบที่การตั้งค่า FG และ ST เดียวกัน ดังนั้นการใช้หัวทิวป์ขนาดเล็กลง (เช่น T10) จะทำให้ได้เส้นใยขนาดเล็กลงซึ่งส่งผลให้มีพื้นที่ผิวมากกว่าการใช้หัวทิวป์ขนาดใหญ่

ค่า FG หรือ ช่องว่างระหว่างเส้นใยมีส่วนสำคัญต่อความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ ในการที่จะเพิ่มความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ให้มากที่สุด ค่า FG ควรจะมีความกว้างมาก ๆ อย่างไรก็ตาม ค่า FG นั้นไม่สามารถปรับให้เพิ่มขึ้นได้อย่างอิสระเนื่องจากจะทำให้เกิดการหย่อนของเส้นใยที่เป็นสะพานระหว่างช่องว่างนั้นอันเนื่องมาจากความแข็งแรงที่ไม่เพียงพอของเส้นใยดังกล่าว โดยในการทดลองนี้จะตั้งค่า FG ไว้ที่ 500 และ 700 ไมโครเมตร ซึ่งถือว่าใหญ่เพียงพอสำหรับการนำไปใช้เป็นวัสดุปลูกถ่ายกระดูกและข้อ เมื่อพิจารณาที่โครงเลี้ยงเซลล์สูตร T10 ค่าขนาดจริงที่ได้จากการวัดผ่านรูป SEM นั้นมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ตั้งค่าไว้ มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร T16 แสดงให้เห็นว่ายิ่งหัวทิวป์มีขนาดใหญ่ขึ้น ความแม่นยำในการควบคุมขนาดของ FG ยิ่งลดลง

**ตารางที่ 2-12** ค่าที่ได้จากการวัดขนาดต่าง ๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ด้วยรูป SEM [92]

Specimen group	RW ( $\mu\text{m}$ )	ST ( $\mu\text{m}$ )	FG ( $\mu\text{m}$ )	LG ( $\mu\text{m}$ )
C2-10-20	227 $\pm$ 41	256 $\pm$ 22	521 $\pm$ 41	227 $\pm$ 42
C2-10-28	256 $\pm$ 34	246 $\pm$ 20	704 $\pm$ 76	237 $\pm$ 46
C3-10-20	298 $\pm$ 35	250 $\pm$ 19	477 $\pm$ 43	425 $\pm$ 49
C3-10-28	285 $\pm$ 22	253 $\pm$ 15	646 $\pm$ 51	433 $\pm$ 53
C2-16-20	342 $\pm$ 39	213 $\pm$ 20	468 $\pm$ 53	158 $\pm$ 35
C2-16-28	308 $\pm$ 57	216 $\pm$ 21	648 $\pm$ 44	160 $\pm$ 56
C3-16-20	372 $\pm$ 38	210 $\pm$ 22	408 $\pm$ 36	294 $\pm$ 27
C3-16-28	328 $\pm$ 50	215 $\pm$ 18	644 $\pm$ 40	374 $\pm$ 71

<sup>a</sup>RW: ขนาดคือเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย ST: ความหนา slide FG: ระยะช่องว่างระหว่างเส้นใย LG: ระยะช่องว่างระหว่างชั้น

ผลการทดสอบของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค FDM นั้นสามารถขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นโครงข่ายรังผึ้งแบบ 3 มิติได้ ซึ่งลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบนี้จะเอื้ออำนวยแก่การไหลเข้าออกของสารอาหารและของเสียเพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด อีกทั้งเทคนิค FDM ยังมีความเที่ยงตรงในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ให้ได้รูปร่างลักษณะตามที่ต้องการสูง สามารถกำหนดความเที่ยงตรงของโครงเลี้ยงเซลล์จริงที่ได้ให้ใกล้เคียงกับที่ออกแบบด้วยคอมพิวเตอร์ในระดับไมโครเมตร เมื่อกำหนดสถานะต่าง ๆ ในการขึ้นรูปให้เหมาะสม เช่นการใช้หัวทึบขนาดเล็ก สำหรับลักษณะของ Lay-down pattern ทั้งสองแบบพบว่าส่งผลต่อ dimension ของช่องว่างระหว่างเส้นใยและช่องว่างระหว่างชั้น ซึ่งคาดว่าจะส่งผลกระทบต่อสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์

**Jenny Hollander และคณะ** [93] ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิคาโพรแลคโตน (PCL) ด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติชนิดการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด (Fused deposition modeling, FDM) สำหรับใช้เป็นตัวนำส่งยาที่สามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาได้ โดยทำเป็นรูปร่าง T-shaped เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานในระบบสืบพันธุ์เพศหญิง (Intrauterine system) เลือกใช้ตัวยา Indomethacin เป็นตัวยาดันแบบ (Indomethacin เป็นตัวยาบรรเทาอาการปวดกลุ่ม NSAID) นำมาผสมกับ PCL ที่ปริมาณยาแตกต่างกันคือ 5% 15% และ 30% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แล้วขึ้นรูปด้วยกระบวนการอัดรีดร้อน (Hot-melt extrusion) ให้เป็นเส้นใย (Filament) เพื่อนำมาฉีดขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค FDM ต่อไป สำหรับการทดสอบอัตราการปลดปล่อยยาจะทดสอบทั้งการปลดปล่อยยาจากเส้นใยโดยตรงและจากโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีอัตราการปลดปล่อยยาที่รวดเร็วกว่าเส้นใย เพราะลักษณะโครงสร้างทั้งภายในและภายนอก รวมทั้งรูปทรงที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการเกิดผลึกของพอลิเมอร์ซึ่งทำให้รูปแบบในการนำส่งยาออกมาจากเนื้อพอลิเมอร์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการทดสอบปริมาณยาที่ถูกใส่เข้าไปในเนื้อพอลิเมอร์เมื่อถูกอัดขึ้นรูปเป็นเส้นใย

(Drug encapsulation capacity) โดยนำเส้นใยที่ได้มาละลายในคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณของยาด้วยเทคนิค UV/VIS Spectrophotometer ได้ผลดังตารางที่ 2-13

**ตารางที่ 2-13** ปริมาณยา Indomethacin ในเส้นใยพอลิคาโพรแลคโตน [93]

Sample	Theory (mg)	Theory (%)	Theory (ratio)	Actual (mg)	Actual (%)	Actual (ratio)
Filament 5%	6.5 ± 0.1	100 ± 0.1	5.0:95.0	4.8 ± 0.1	73.6 ± 0.3	3.7:96.3
Filament 15%	19.5 ± 0.2	100 ± 0.2	15.0:85.0	15.0 ± 0.2	76.8 ± 1.1	11.5:88.5
Filament 30%	39 ± 0.1	100 ± 0.1	15.0:85.0	35.3 ± 4.0	89.8 ± 10.3	27.0:73.0

Data are presented as mean ± SD, n = 3

จากตารางที่ 2-13 พบว่าปริมาณยาที่ถูกกักเก็บอยู่ในเส้นใยมีปริมาณน้อยกว่าที่เติมลงไปก่อนขึ้นรูป สาเหตุที่ตัวยางบางส่วนหายไป เนื่องจากระยะเวลาในการขึ้นรูป (Residence time) หากน้อยเกินไปการกระจายตัวของยาในเฟสของพอลิเมอร์หลอมเหลวจะไม่ดี แต่หากนานเกินไปความร้อนและแรงเฉือนที่เกิดขึ้นในกระบอกหลอมจะทำให้พอลิเมอร์และยาเกิดการสลายตัว จึงต้องหาค่าเวลาที่เหมาะสมค่าหนึ่งที่ปัจจัยลบลดกล่าวทั้งสองกรณีจะส่งผลต่อชิ้นงานให้น้อยที่สุด สำหรับงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ให้เหตุผลในการเลือกระยะเวลาในการขึ้นรูปจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าการที่พอลิเมอร์และยาเกิดการสลายตัวเล็กน้อยจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการปลดปล่อยยาน้อยกว่าการที่ตัวยางกระจายตัวในเฟสพอลิเมอร์ไม่ดี คณะผู้วิจัยต้องการเลือกระยะเวลาที่กระทบต่อประสิทธิภาพในการปลดปล่อยยาให้น้อยที่สุด ดังนั้นจึงอาจเกิดการสลายตัวของพอลิเมอร์และตัวยางไปเล็กน้อยได้ โดยในงานวิจัยนี้จะใช้อุณหภูมิในการหลอมและผสมพอลิเมอร์กับตัวยาคือ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที มีความเร็วในการหมุนขณะหลอมและผสม 30 รอบต่อนาที และปรับความเร็วในการหมุนเป็น 10 รอบต่อนาทีเมื่อจะทำการอัดรีดพลาสติกหลอมเหลวออกมาเป็นเส้นใยด้วยหัวตายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร

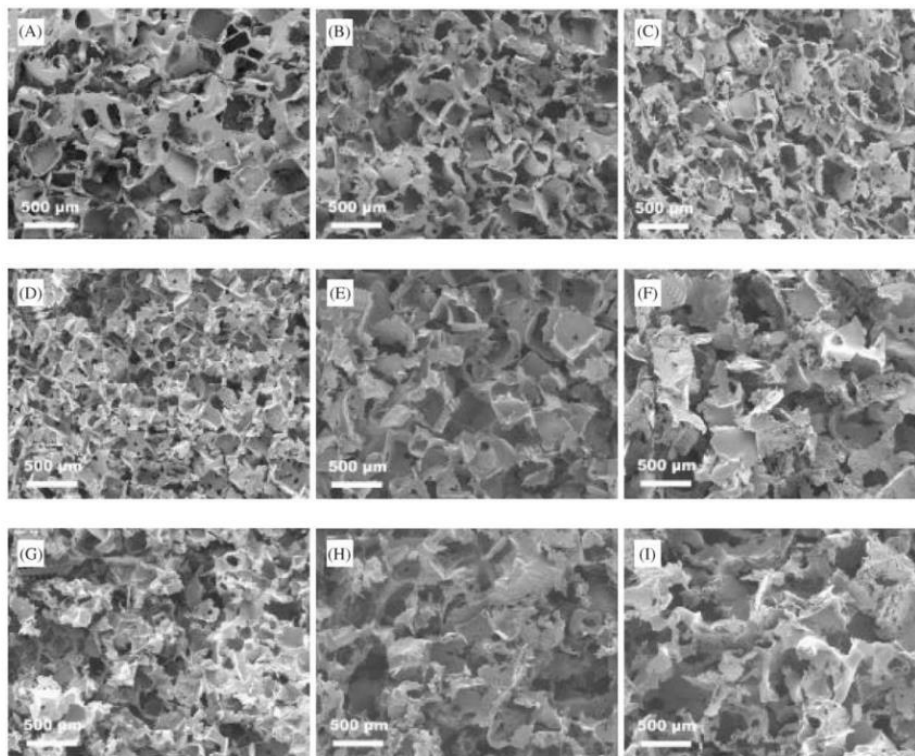
งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การใส่ยาเข้าไปผสมกับเนื้อพอลิเมอร์ก่อนการขึ้นรูปนั้นจะมีข้อจำกัดหลายประการ หนึ่งคือปัจจัยเรื่องการกระจายตัวของยาในเฟสพอลิเมอร์ซึ่งส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมของการปลดปล่อยยา ดังนั้นการควบคุมการกระจายตัวของยาให้สม่ำเสมอมากที่สุด



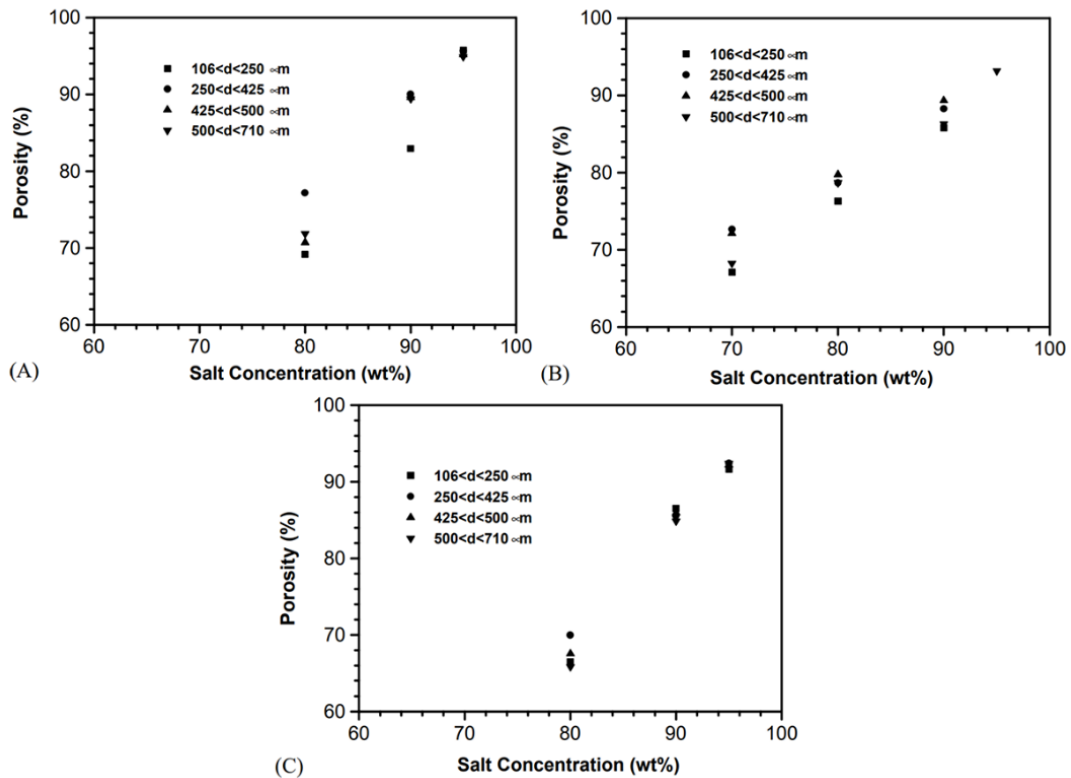
จึงเป็นเป้าหมายสำคัญ อย่างไรก็ตามการควบคุมการกระจายตัวของยาด้วยการเพิ่มระยะเวลาในการขึ้นรูปนั้นก็ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากความร้อนและแรงเฉือนที่เกิดขึ้นจะทำให้พอลิเมอร์และยาเกิดการสลายตัวได้ ยิ่งไปกว่านั้นคือหากตัวยาที่ใช้เป็นตัวยามีความอ่อนไหวต่อความร้อนมาก ก็จะทำให้การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับเป็นระบบนำส่งยาด้วยวิธีนี้นั้นทำได้เลย ต้องปรับเปลี่ยนกระบวนการขึ้นรูปให้บรรจุยาภายหลังจากขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เรียบร้อยแล้วแทนเพื่อหลีกเลี่ยงความร้อนจากกระบวนการขึ้นรูป

**Qingpu Hou และคณะ** [35] ได้ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุนสำหรับใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยวิธีการขึ้นรูปโดยใช้แม่พิมพ์แบบกดอัด (Compression molding) และการชะล้างเกลือ (Salt leaching) เพื่อค้นหาวิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนสำหรับใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมขนาดรูพรุนได้อย่างแม่นยำมากขึ้น และมีรูพรุนที่เชื่อมต่อกันมากขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และทลายข้อจำกัดของเทคนิคที่เคยถูกใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนเช่น liquid-liquid phase separation และ liquid-solid phase separation นั้น ลักษณะสัณฐานวิทยาและสมบัติต่าง ๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์จะขึ้นอยู่กับกลไกการแยกเฟสเป็นอย่างมาก จึงทำให้การควบคุมขนาดและลักษณะของรูพรุนนั้นทำได้ยาก การทดลองนี้เลือกใช้พอลิเมอร์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่พอลิดีแอลแลคไทด์ (Poly(D,L-lactide), PDLLA) พอลิเอพซิลอนคาโพรแลคโตน (Poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL) และพอลิเอทิลีนออกไซด์ (Polyethylene oxide, PEO) ผสมกับพอลิบิวทิลีน เทเรฟทาเลต (Polybutylene terephthalate, PBT) ที่อัตราส่วน 70:30 ใช้รหัสว่า 100PEOT70PBT30 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นงานเริ่มจากนำพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาละลายด้วย  $\text{CHCl}_3$  ความเข้มข้น 10% (w/v) จากนั้นนำมาผสมกับอนุภาคเกลืออัตราส่วน 70-95% โดยน้ำหนักให้สัมพันธ์กับน้ำหนักของสารละลายพอลิเมอร์ที่นำมาผสม อนุภาคเกลือที่นำมาผสมนั้นจะถูกคัดแยกขนาดให้ได้ในช่วง 106-250, 250-425, 425-500 และ 500-710 ไมโครเมตรมาก่อน จะได้พอลิเมอร์ผสมเกลือ (Polymer salt composite) แล้วนำมาขึ้นรูปด้วยแม่พิมพ์แบบกดอัดออกมาเป็นชิ้นงานลักษณะจานความหนา 8 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 17 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปชะล้างเกลือออก ด้วยน้ำไร้ประจุเป็นระยะเวลา 4-5 วัน โดยเปลี่ยนน้ำใหม่ทุก ๆ 2 ชั่วโมงในระยะเวลา 10 ชั่วโมงแรก และ 2-3 ครั้งในทุก ๆ วันเพื่อชะล้างเกลือออก จะได้ชิ้นงานที่มีรูพรุน นำชิ้นงานรูพรุนนี้ไปทำให้แห้งสนิทด้วยเทคนิค vacuum-dried เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบค่าความเป็นรูพรุน (% Porosity) ด้วยเทคนิค SEM พบว่ารูพรุนของชิ้นงานที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์นี้มีค่าระหว่าง 77% ถึง 95% ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของพอลิเมอร์

ต่อเกลือและขนาดของรูพรุนที่สามารถควบคุมได้ด้วยการควบคุมขนาดของอนุภาคเกลือ ดังแสดงในรูปที่ 2-18



**รูปที่ 2-18** ภาพ SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ (A) PDLLA, porosity: 77.2%; ขนาดรูพรุน 250-425 µm (B) PDLLA, porosity: 90.0%; ขนาดรูพรุน 250-425 µm (C) PDLLA, porosity: 95.7%; ขนาดรูพรุน 250-425 µm (D) 100PEOT70PBT30, porosity: 85.8%; ขนาดรูพรุน 106-250 µm (E) 100PEOT70PBT30, porosity: 88.3%; ขนาดรูพรุน 250-425 µm (F) 100PEOT70PBT30, porosity: 93.2%; ขนาดรูพรุน 500-710 µm (G) PCL, porosity: 91.7%; ขนาดรูพรุน 106-250 µm (H) PCL, porosity: 92.4%; ขนาดรูพรุน 250-425 µm และ (I) PCL, porosity: 92.4%; ขนาดรูพรุน 500-710 µm [35]



รูปที่ 2-19 ปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมด้วยกระบวนการกัดด้วยแม่พิมพ์และชะล้างเกลือ ที่ปริมาณเกลือสัมพันธ์กับมวลของพอลิเมอร์ โดยมีขนาดของอนุภาคเกลือแตกต่างกัน (A) PDLLA; (B) 1000PEOT70PBT30; และ (C) PCL [35]

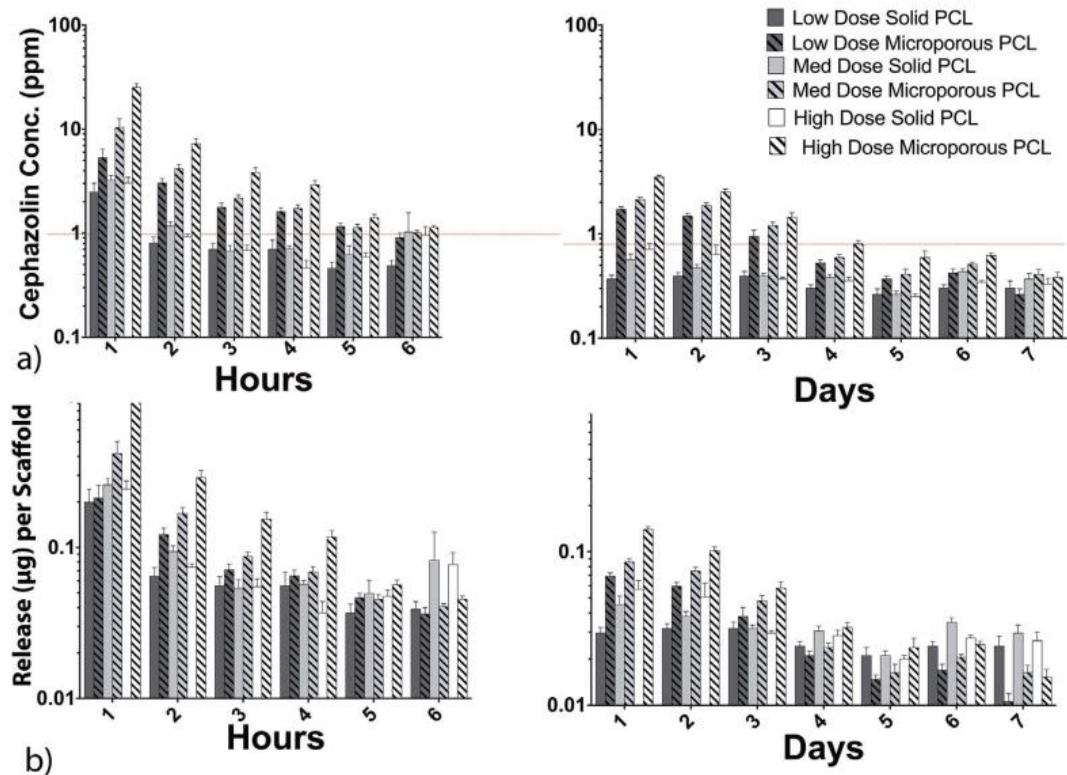
จากรูปที่ 2-18 จะสังเกตได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเตรียมด้วยเทคนิคดังกล่าวจะมีการกระจายตัวและการเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุนค่อนข้างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีปริมาณรูพรุนมากขึ้น การเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุนภายในโครงสร้างก็ยังมีมากขึ้น เมื่อพิจารณาปริมาณรูพรุนต่ออัตราส่วนเกลือและขนาดของอนุภาคเกลือในโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 2-19 พบว่า ปริมาณรูพรุนของทั้งโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ เป็นฟังก์ชันกับปริมาณของเกลือ และขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ ก็เป็นฟังก์ชันกับขนาดของอนุภาคเกลือด้วย อย่างไรก็ตามสองปัจจัยนี้เป็นอิสระต่อกัน กล่าวคือการควบคุมปริมาณรูพรุนโดยการควบคุมปริมาณเกลือที่เติมลงไปนั้นจะไม่ส่งผลต่อขนาดของรูพรุน ในทางกลับกันการควบคุมขนาดของรูพรุนโดยการกำหนดขนาดของอนุภาคเกลือก็ไม่ส่งผลต่อปริมาณรูพรุนเช่นกัน และผลสรุปดังกล่าวนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันแม้ชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้จะแตกต่างกัน ดังนั้นเทคนิคการขึ้นรูปที่งานวิจัยนี้นำเสนอจึงสามารถนำไปใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่

สามารถปรับขนาดและปริมาณของรูพรุนได้ง่ายและอิสระ รวมไปถึงยังได้รูพรุนที่มีการเชื่อมต่อกันภายในมากอันเอื้อแก่การไหลของสารอาหารและของเสียที่เข้าออกเซลล์อีกด้วย

**Luke E. Visscher และคณะ** [94] ได้ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนทั้งใหญ่และเล็กจากพอลิคาโพรแลคโตน (PCL) ด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติชนิด FDM เพื่อนำไปใช้เป็นวัสดุนำส่งยาปฏิชีวนะ ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จะใช้เทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติร่วมกับการสร้างรูพรุนจากอนุภาคของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffer saline, PBS) ด้วยเทคนิคการชะเกลือออก (Salt-leaching) เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ตามที่ต้องการ ออกแบบไว้ และเคลือบด้วยเจลาติน เมทาคริเลท (GelMA) เพื่อลดการปลดปล่อยยาอย่างมากในช่วงระยะเวลาเริ่มต้น (Burst release) ของตัวยาในช่วงแรกของการทดสอบการปลดปล่อยยา ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของรูพรุนโดยการทดสอบค่าปริมาตรรูพรุน พื้นที่ผิวสัมผัส และสมบัติเชิงกล จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์มาบรรจุยาปฏิชีวนะเซฟาโซลินและทำการศึกษาการปลดปล่อยยาเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในหลาย ๆ กรณี สำหรับแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จะพบตามบริเวณผิวหนังของผู้ป่วย โดยทั่วไปแพทย์จะใช้วิธีให้ยาปฏิชีวนะเข้าสู่กระแสเลือดทั้งก่อนและหลังผ่าตัดเพื่อป้องกันการติดเชื้อ เช่นการฉีดยาหรือการรับประทานยา แต่วิธีนี้มีผลข้างเคียงคือความเข้มข้นของยาที่ไปถึงในบริเวณที่ต้องการจะน้อยและไม่ต่อเนื่อง อาจส่งผลให้เกิดแบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้ จึงเกิดแนวคิดว่าหากสามารถสร้างอุปกรณ์สำหรับนำส่งและปลดปล่อยยาโดยปลูกถ่ายไปยังอวัยวะเป้าหมายโดยตรง ก็จะช่วยเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าวได้ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้โครงเลี้ยงเซลล์จาก PCL เป็นตัวนำส่งและปลดปล่อยยา โดยเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สองรูปแบบคือแบบมีรูพรุน และแบบไม่มีรูพรุนเพื่อเปรียบเทียบผล จากผลการศึกษา ลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า รูพรุนขนาดเล็กที่ได้จะมีขนาดอยู่ในช่วง 20 ถึง 70 ไมโครเมตร และมีบางส่วนที่เกิดเป็นรูพรุนขนาดใหญ่เนื่องจากการรวมตัวกันของอนุภาค PBS ในขณะขึ้นรูป โดยกระบวนการชะล้าง PBS ออกจะใช้เวลา 14 วันจึงจะชะล้างออกหมดอย่างสมบูรณ์ การมีรูพรุนขนาดเล็กจะเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสส่งผลให้สามารถใช้เทคนิคการหยดสารละลาย (Solution drop loading technique) ในการนำยาปฏิชีวนะเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้

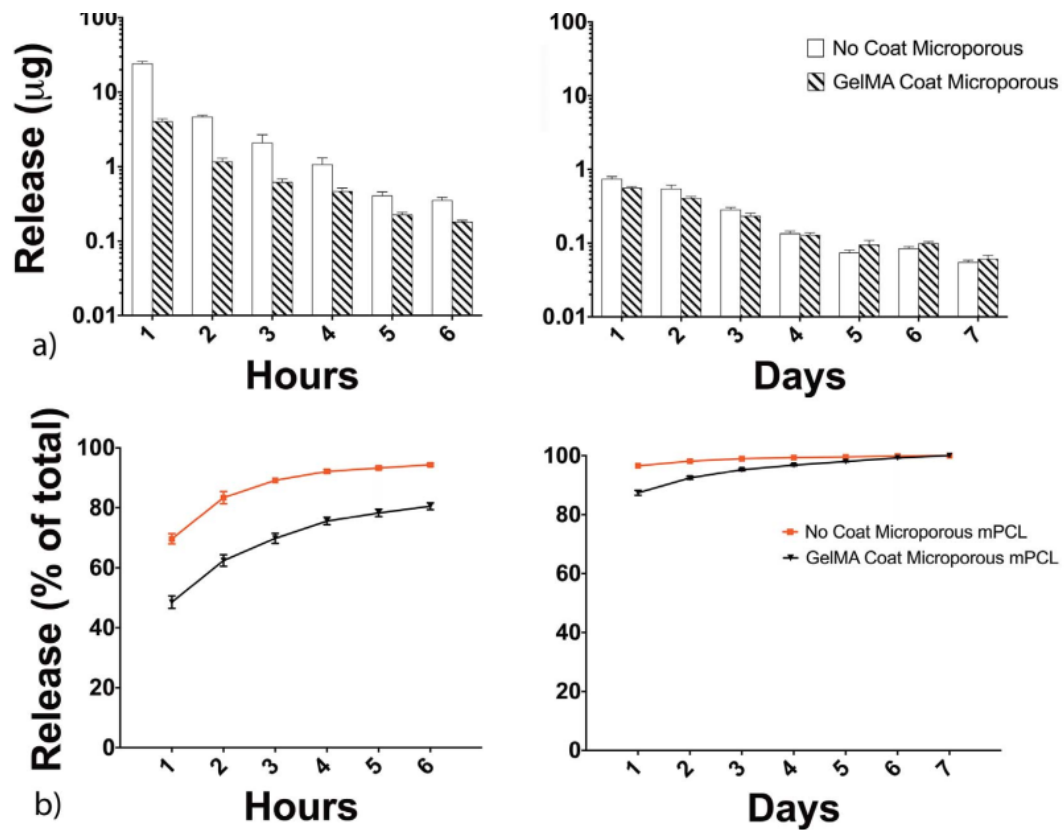
จากผลการทดสอบการปลดปล่อยยาที่รูปแบบความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์และความเข้มข้นยาที่บรรจุแตกต่างกันพบว่า ทั้งโครงเลี้ยงเซลล์แบบมีรูพรุน (Microporous PCL) และแบบไม่มีรูพรุน (Solid PCL) สามารถปลดปล่อยยาออกมาได้ทั้งคู่ โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดสอบที่มีความเข้มข้นยาปานกลาง (1340 ppm) และปริมาณมาก (3350 ppm) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบมีรูพรุนจะมีอัตราการปลดปล่อยยามากขึ้นเมื่อปริมาณยาเพิ่มขึ้น แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์แบบ

ไม่มีรูพรุนจะไม่มี ความแตกต่างของอัตราการปลดปล่อยยาในทุกช่วงเวลาทดสอบ แสดงให้เห็นถึงพื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้นจากรูพรุนส่งผลต่ออัตราการปลดปล่อยยาอย่างมีนัยสำคัญ โดยโครงเลี้ยงเซลล์แบบมีรูพรุนจะมีอัตราการปลดปล่อยยามากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีรูพรุนตลอดช่วง 3 วันแรก แสดงดังรูปที่ 2-20



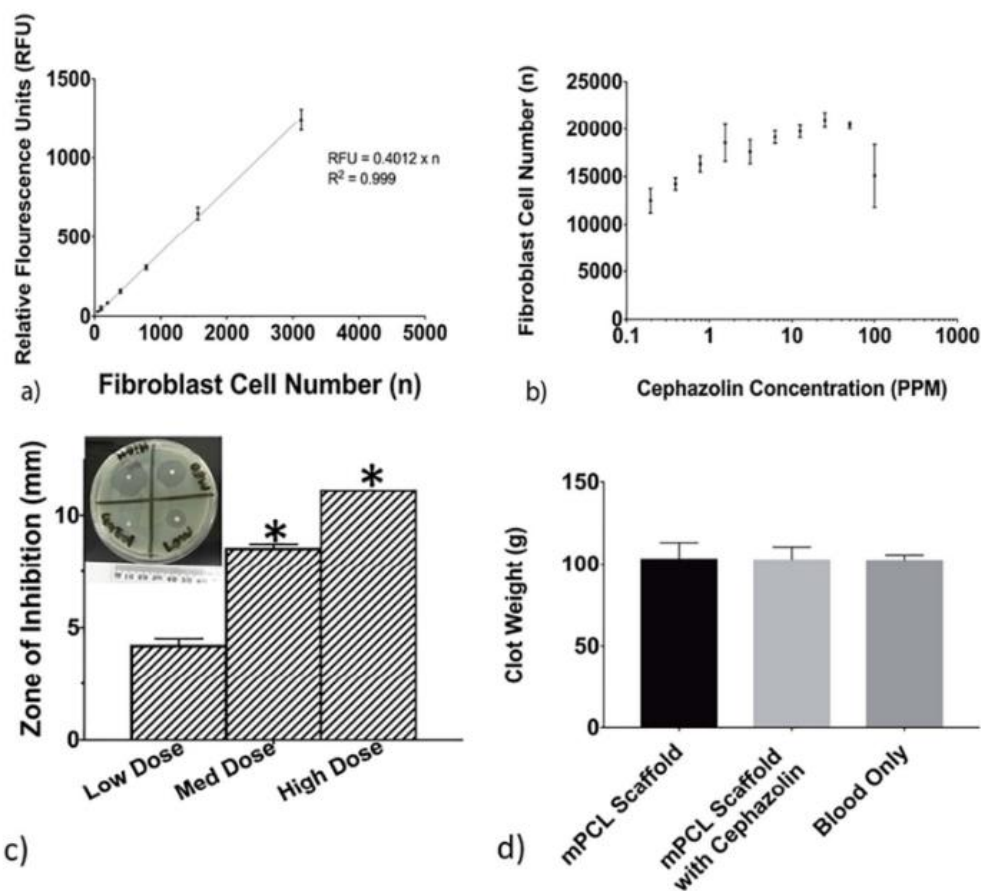
รูปที่ 2-20 กราฟเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟาโซลินจากโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ที่มีรูพรุนขนาดเล็กชนิดที่เคลือบด้วย GelMA และ PCL ปกติ โดยใช้ปริมาณยาเซฟาโซลินแตกต่างกันที่ 6 ชั่วโมงแรกและที่ระยะเวลาจนเข้าสู่สมดุล (7 วัน) โดย (a) ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ (b) ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาสะสม [94]

จากรูปที่ 2-20 ในช่วงชั่วโมงแรก ๆ ของการทดสอบ จะเห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนจะมีการปลดปล่อยยาออกมาปริมาณมากในช่วงชั่วโมงแรก ๆ ก่อนจะปลดปล่อยออกมาเป็นอัตราค่อนข้างคงที่ไปตลอด 7 วัน เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการปลดปล่อยยาอย่างมากในช่วงระยะเวลาเริ่มต้น ซึ่งอาจส่งผลให้ปริมาณยาที่ได้รับต่อหน่วยเวลามากเกินไป (Overdose) จึงทำการทดสอบการเคลือบด้วย GelMA เพื่อลดการปลดปล่อยยาอย่างมากในช่วงระยะเวลาเริ่มต้น จากผลการทดสอบพบว่าการเคลือบด้วย GelMA สามารถลดการปลดปล่อยยาอย่างมากในช่วงระยะเวลาเริ่มต้นได้ประมาณ 20% ในช่วงวันแรกของการทดสอบ แสดงดังรูปที่ 2-21



รูปที่ 2-21 กราฟเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟาโซลินจากโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PCL ทั้งแบบเคลือบด้วย GelMA และไม่ได้เคลือบที่ 6 ชั่วโมงแรกและที่ระยะเวลาจนเข้าสู่สมดุล (7 วัน) โดย (a) คือปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ (b) คือปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาสะสม [94]

จากการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพด้วยวิธี Cytotoxicity test กับเซลล์ตัวแทนเซลล์ร่างกาย 3 T3 Fibroblast พบว่า จำนวนเซลล์ที่ active มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ความเข้มข้นยาต่ำๆ (น้อยกว่า 1 ppm) และยังคงมีจำนวนเซลล์ที่ active มากไปจนกระทั่งความเข้มข้นยามากกว่า 100 ppm จำนวนเซลล์ที่ active จึงจะลดลง บ่งชี้ว่าไม่พบการเป็นพิษหรือต่อต้านเซลล์ 3 T3 Fibroblast เมื่อมีความเข้มข้นของตัวยาเซฟาโซลินต่ำกว่า 100 ppm นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบผลกระทบต่อกระบวนการสร้างลิ่มเลือด (Blood clot formation) พบว่า ทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ PCL และตัวยาไม่ส่งผลต่อกระบวนการสร้างลิ่มเลือด ดังแสดงในรูปที่ 2-22



รูปที่ 2-22 ผลการทดสอบความเข้ากันได้กับร่างกายและการตอบสนองทางชีวภาพในหลอดทดลองของเซลล์ 3 T3 Fibroblast บนโครงเลี้ยงเซลล์ [94]

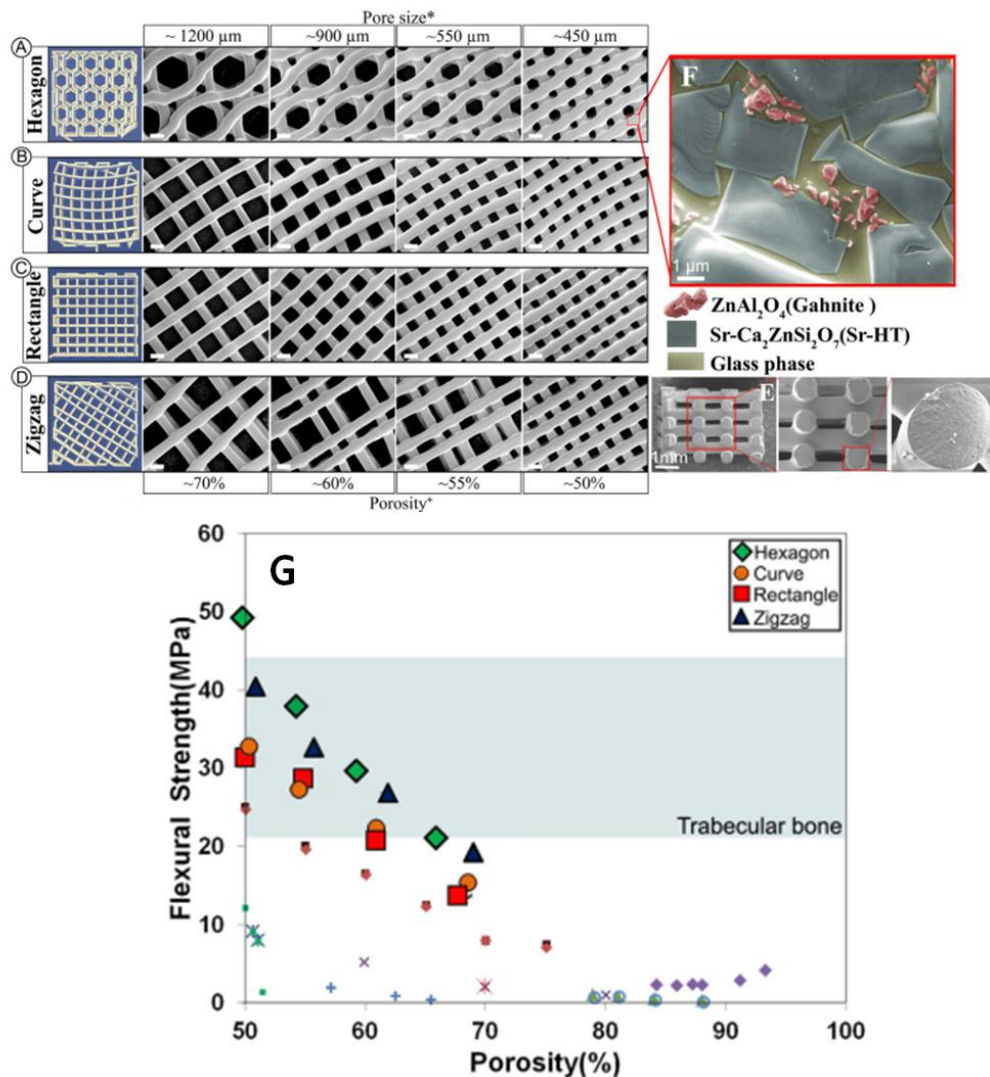
จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้ ให้ข้อสรุปได้ว่าการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนจากวัสดุที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงอย่าง PCL ด้วยเทคนิค FDM และการสร้างรูพรุนจากอนุภาคของ PBS แล้วใช้เทคนิคการหยดสารละลายในการบรรจุยาภายหลังการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้เป็นวัสดุนำส่งยาที่หลีกเลี่ยงความร้อนจากกระบวนการขึ้นรูปได้ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ร่างกายได้ดีทั้งตัวโครงเลี้ยงเซลล์ และตัวยาเซฟาโซลินที่นำมาทดสอบ มีอัตราการปลดปล่อยยาในระยะยาวที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ แต่ในช่วงชั่วโมงแรก ๆ จะมีการปลดปล่อยยาออกมาเป็นปริมาณมากเมื่อเทียบกับปริมาณยาที่บรรจุทั้งหมด (Burst release) จึงมีการใช้ GelMA มาเคลือบโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อลดปรากฏการณ์ดังกล่าว ซึ่งสามารถลดได้จริงประมาณ 20% ของปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาในแต่ละช่วงเวลาของวันแรกของการทดสอบ

**E. Roohani และคณะ** [95] ทำการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับทดแทนเซลล์กระดูกเนื้ออ่อน (Cortical bone) จาก bioactive glass-ceramic ที่เรียกว่า Sr-HT (เป็นผงของ strontium (Sr) ที่ถูก dope ด้วย  $\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7(\text{HT})$ ) ผสมกับผง Gahnite ( $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ ) ด้วยกระบวนการพิมพ์แบบ 3 มิติ ชนิดพ่นวัสดุ (Material jetting) โดยนำผง Sr-HT บดรวมกับผง aluminium oxide ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) และ zirconia balls จากนั้นนำมาผสมกับน้ำบริสุทธิ์เกรดห้องแลปที่อัตราส่วนของผง Sr-HT ต่อน้ำบริสุทธิ์ 45:55 ให้ได้ของเหลวผสมที่เปรียบคล้ายกับน้ำหมึกพิมพ์ แล้วนำของเหลวผสมนี้ไปบรรจุในอุปกรณ์และปรี้นลงบนฐานรับเคลือบน้ำมันเพื่อขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ทำการออกแบบให้มีรูปทรง 4 รูปแบบ คือ Hexagon, Curve, Rectangle และ Zigzag โดยกำหนดปริมาณรูพรุนของแต่ละรูปทรงเป็น 4 ปริมาณ คือ 50% 55% 60% และ 70% ดังแสดงในรูปที่ 2-23 และใช้เทคนิค FE-SEM ในการศึกษาโครงสร้างของรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับการทดสอบสมบัติเชิงกล คณะผู้วิจัยทำการทดสอบความสามารถในการดัดงอด้วยวิธีการทดสอบแรงดัดงอแบบ 3 จุด (Three-point bending method) โดยทำการเตรียมชิ้นงานสำหรับทดสอบที่ขนาด 3 มิลลิเมตร x 5 มิลลิเมตร x 25 มิลลิเมตร ทำการวัดค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอ (Flexural strength;  $\sigma_f$ ) โดยคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$\sigma_f = \frac{3PL}{2bd^2} \quad (1)$$

เมื่อ P คือโหนดที่ให้ (ในหน่วยนิวตัน) L คือความยาว Span (ในหน่วยมิลลิเมตร) b คือความกว้างของชิ้นงาน (ในหน่วยมิลลิเมตร) และ d คือความหนาของชิ้นงาน (ในหน่วยมิลลิเมตร) ได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 2-23G



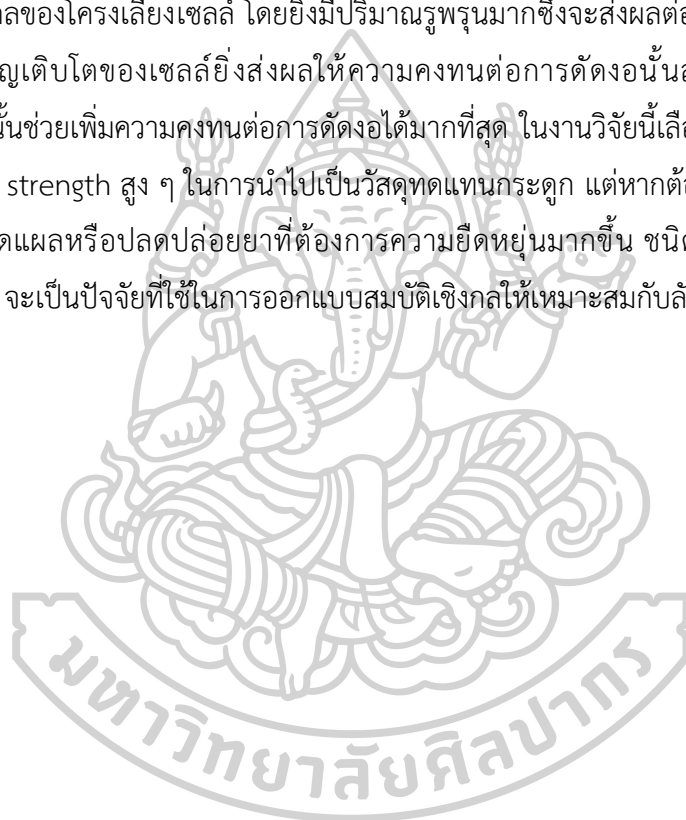


รูปที่ 2-23 โมเดลการออกแบบรูปทรงด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (คอลัมน์ซ้าย) และรูป SEM ของโครง  
 เลี้ยงเซลล์จริงที่ขนาดและปริมาณรูพรุนแตกต่างกัน โดยใช้สเกลบาร์ 500 ไมโครเมตร (A)  
 Hexagonal (B) Curved (C) Rectangular และ (D) Zigzag (E) รูป SEM พื้นผิวหน้าตัดของโครง  
 เลี้ยงเซลล์ (F) โครงสร้างระดับไมโครของโครงเลี้ยงเซลล์ Sr-HT-Gahnite ที่ประกอบไปด้วยสามเฟส  
 คือเม็ด Sr-HT ผลึกของ ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> และเฟสของแก้ว (G) กราฟความสัมพันธ์ของค่า Flexural  
 strength ต่อปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร [95]

จากผลการทดสอบ flexural strength พบว่าค่า flexural strength จะลดลงเมื่อปริมาณรู  
 พรุนเพิ่มขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกรูปทรง เมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างของรูปทรง โครงเลี้ยงเซลล์ Sr-  
 HT-Gahnite รูปทรง Hexagonal จะมีค่า flexural strength มากที่สุด โดยอยู่ในช่วง 21 ถึง 51

MPa สำหรับปริมาณรูพรุนในช่วงประมาณ 70% ถึง 50% ตามลำดับ เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะเมื่อให้แรงแบบดัดงอกับชิ้นงาน พฤติกรรมการแตกหักของชิ้นงานจะขึ้นอยู่กับความคงทนของวัสดุต่อขนาดการกระจาย และทิศทางของรอยแตกที่เป็นจุดศูนย์รวมความเค้น ซึ่งเมื่อภายในชิ้นงานมีรูพรุนเกิดขึ้น รูพรุนนี้จะขัดขวางการกระจายความเค้นจากรอยแตก ทำให้ความเค้นถูกรวมศูนย์และมีความเข้มข้นมากขึ้นในบริเวณใกล้เคียงรอยแตก รอยแตกจึงขยายวงกว้างได้ง่ายขึ้น ค่า flexural strength จึงลดลงเมื่อปริมาณรูพรุนเพิ่มขึ้น

ผลการทดลองของงานวิจัยนี้สรุปได้ว่ารูปทรงและปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์นั้นส่งผลต่อสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยยังมีปริมาณรูพรุนมากซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ยิ่งส่งผลให้ความคงทนต่อการดัดงอนั้นลดลง และรูปทรงแบบ Hexagonal นั้นช่วยเพิ่มความคงทนต่อการดัดงอได้มากที่สุด ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วัสดุเซรามิกเพื่อให้มีค่า flexural strength สูง ๆ ในการนำไปเป็นวัสดุทดแทนกระดูก แต่หากต้องการนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเป็นวัสดุปิดแผลหรือปลดปล่อยยาที่ต้องการความยืดหยุ่นมากขึ้น ชนิดของวัสดุ รูปทรง และปริมาณรูพรุน จะเป็นปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบสมบัติเชิงกลให้เหมาะสมกับลักษณะการใช้งาน



## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 แนวคิดของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนจากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต โดยใช้เทคนิคการขึ้นรูปด้วยการพิมพ์แบบสามมิติ และใช้เทคนิคการชะล้างเกลือในการสร้างรูพรุน เพื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์นี้มาเป็นวัสดุต้นแบบสำหรับการต่อยอดเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัตินำส่งยาและสามารถปลดปล่อยยาปฏิชีวนะเพื่อต้านเชื้อแบคทีเรียอันก่อให้เกิดการอักเสบของแผลภายในร่างกายเช่นแผลผ่าตัดได้ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวยาคีซาโซลิน เป็นตัวยากที่ใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ซึ่งเป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคที่ก่อให้เกิดอาการอักเสบของแผลได้ โดยจะได้ทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา ปริมาตรรูพรุน ความชอบน้ำ สมบัติเชิงกล ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และอัตราการปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนสูตรต่าง ๆ งานวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ตอนดังนี้

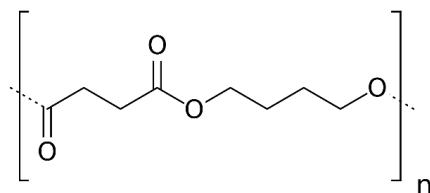
ตอนที่ 1 การศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ต้น nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PBS ที่มีปริมาตรรูพรุน 3 อัตราส่วน และอิทธิพลของลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรต่อสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกล

ตอนที่ 2 การศึกษาการนำโครงเลี้ยงเซลล์มาทดสอบการปลดปล่อยยา และอิทธิพลของลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรต่อความสามารถในการปลดปล่อยยาในแต่ละช่วงเวลา

ตอนที่ 3 การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์และความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

#### 3.2 วัสดุและสารเคมีที่ใช้

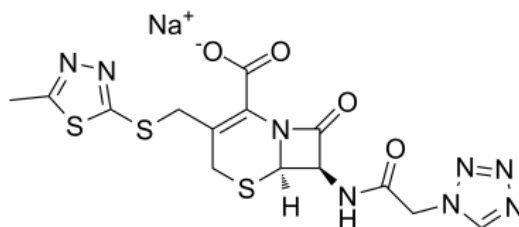
1. พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate; PBS) เกรด BioPBS™ FZ71PM จากบริษัท พีทีที เอ็มซีซี โปโอเคม จำกัด ประเทศไทย



รูปที่ 3-1 โครงสร้างทางเคมีของพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต

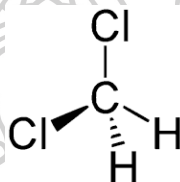
2. โซเดียมคลอไรด์ 99% (NaCl) เกรด AR116-P1KG จากบริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน จำกัด ประเทศไทย

3. เซฟาโซลินโซเดียม (Cefazolin Sodium) เครื่องหมายการค้า เซฟาซอล (Cefazol) จาก บริษัท เยนเนอร์รอลดริ๊กส์เฮ้าส์ จำกัด ประเทศไทย



รูปที่ 3-2 โครงสร้างทางเคมีของเซฟาโซลินโซเดียม

4. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )



รูปที่ 3-3 โครงสร้างทางเคมีของไดคลอโรมีเทน

5. เอทานอล 67% (Ethanol)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient agar) เกรด M001-500G จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. ประเทศอินเดีย
7. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient broths) เกรด M002-500G จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. ประเทศอินเดีย
8. แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)
9. แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*)
10. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
11. เซลล์เนื้อเยื่อ L-929 Mouse Fibroblast Cells รหัส ATCC CCL1, NCTC 929 จากบริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. อาหารเลี้ยงเซลล์ Modified Eagle Medium (MEM)
13. Thermanox (Nunc) coverslip
14. ฟิล์มพอลิยูรีเทน (Polyurethane film) ที่ผสมสาร Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 0.1%
15. สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

16. ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO)

### 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์และทดสอบ

1. หม้อบดเซรามิก Ball mills ขนาด 0.5 kg ใช้ลูกบดเซรามิกจำนวน 17 ลูก
2. ตะแกรงร่อน (Test sieve) เบอร์ 200 และ 400
3. เครื่องเขย่าตะแกรง (Sieve shaker) รุ่น AS200 digit บริษัท Retsch GmbH ประเทศเยอรมนี
4. เครื่องกวนสารละลาย (Mechanical stirrer) รุ่น RW20 digital บริษัท IKA Works (Asia) Co., Ltd. ประเทศมาเลเซีย
5. เครื่องอัดรีดแบบสกรูคู่ (Twin screw extruder) รุ่น SHJ-25 บริษัท NanJing HongMing Extrusion Equipment Co., Ltd. ประเทศจีน
6. เครื่องพิมพ์แบบสามมิติ (3D printing) รุ่น 557E1 บริษัท NTTPro Co., Ltd. ประเทศไทย
7. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) รุ่น TM3030 Tabletop Microscope บริษัท Hitachi High-Technologies Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
8. ชุดทดสอบความหนาแน่น (Density Determination Kit) รุ่น YDK03 บริษัท Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG ประเทศเยอรมนี
9. กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล (USB digital microscope) รุ่น DigiMicro Profi ติดตั้งกับ Axis Feed Auger Stage รุ่น RM-XYZ บริษัท Co., MISUMI Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่องทดสอบแรงเอนกประสงค์ (Universal testing machine; UTM) รุ่น Model 5969 บริษัท Instron Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. UV vis spectrophotometer รุ่น Shimadzu UV-1800 บริษัท Bara Scientific Co.,Ltd. ประเทศไทย
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น MaXterile 47 บริษัท Daihan Scientific Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้
13. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น WIG-105 Daihan Scientific Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้

14. เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader) รุ่น Asys UVM340 บริษัท Biochrom Co., Ltd. ประเทศอังกฤษ

### 3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

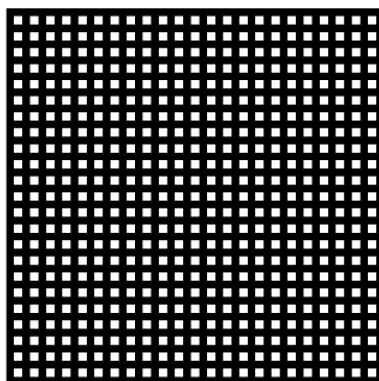
1. ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเบื้องต้น
2. รวบรวมข้อมูลที่สำคัญและสอดคล้องกับงานวิจัย
3. ออกแบบและวางแผนการสำหรับงานวิจัย
4. เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
5. ดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ตอนดังนี้
  - ตอนที่ 1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PBS ที่มีปริมาณรูพรุน 3 อัตราส่วน และการทดสอบสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกล
  - ตอนที่ 2 การนำโครงเลี้ยงเซลล์มาบรรจุยา แล้วทดสอบการปลดปล่อยยา
  - ตอนที่ 3 การทดสอบสมบัติทางชีวภาพ
6. วิเคราะห์และสรุปผลงานวิจัย
7. นำเสนองานวิจัย

#### **ตอนที่ 1: การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PBS ที่มีปริมาณรูพรุน 3 อัตราส่วน และการทดสอบสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกล**

ทำการออกแบบลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยโปรแกรม AutoCAD และ Matter Control โดยมีรูปแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้สองรูปแบบ ดังนี้

- โครงเลี้ยงเซลล์สำหรับทดสอบสมบัติทางกายภาพ ทดสอบอัตราการปลดปล่อยยาและทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

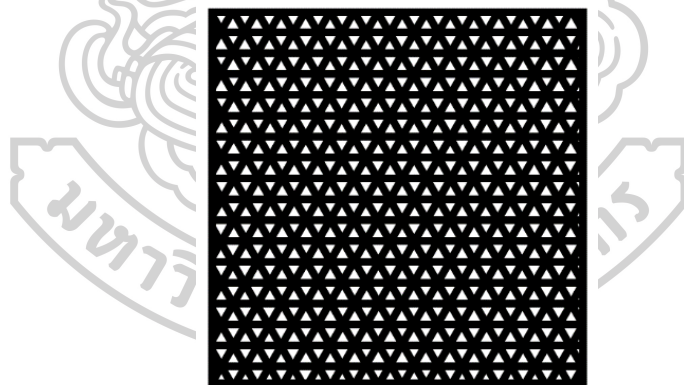
ออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 30x30x2 มิลลิเมตร โดยโครงสร้างจะเป็นเส้นใยถักกันไปมาสองรูปแบบ หรือเรียกว่ามี Lay-down patterns สองรูปแบบ คือ แบบตาราง (Grid) ที่ในแต่ละชั้น (Layer) จะประกอบไปด้วยเส้นใยในแนวแกน x และแกน y ลากตัดกันสองทิศทางทำมุม 90 องศา ดังรูปที่ 3-4



รูปที่ 3-4 รูปแบบ Lay-down patterns แบบตาราง

ในทางทฤษฎี เมื่อกำหนดความหนาแน่นของเส้นใย (Fill density) ที่ 80% จะใช้เส้นใยขาเข้าต่อหนึ่งชั้นงาน 760.3 มิลลิเมตร ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่ของช่องว่างแบบตารางช่องละ 0.00826 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนช่องว่างทั้งหมด 784 ช่อง รวมมีพื้นที่ช่องว่างทั้งหมดต่อ 1 ชั้นเท่ากับ 6.476 ตารางเซนติเมตร

และแบบสามเหลี่ยม (Triangle) ที่ในแต่ละชั้นจะประกอบไปด้วยเส้นใยในแนวแกน  $x$  และแกน  $y$  ลากตัดกันสามทิศทางทำมุม 60 องศา ดังรูปที่ 3-5



รูปที่ 3-5 รูปแบบ Lay-down patterns แบบสามเหลี่ยม

ในทางทฤษฎี เมื่อกำหนดความหนาแน่นของเส้นใย (Fill density) ที่ 80% จะใช้เส้นใยขาเข้าต่อหนึ่งชั้นงาน 769.1 มิลลิเมตร ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่ของช่องว่างแบบตารางช่องละ 0.012 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนช่องว่างทั้งหมด 608 ช่อง รวมมีพื้นที่ช่องว่างทั้งหมดต่อ 1 ชั้นเท่ากับ 7.296 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นในทางทฤษฎีแล้ว รูปแบบ Lay-down patterns แบบสามเหลี่ยมใช้เส้นใยในการขึ้นรูปมากกว่า และมีขนาดของช่องว่างใหญ่กว่ารูปแบบ Lay-down patterns แบบตาราง ทั้งขนาดช่องว่างต่อหนึ่งช่อง และขนาดช่องว่างรวมกันทั้งหมดต่อหนึ่งชั้น

- โครงเลี้ยงเซลล์สำหรับทดสอบสมบัติเชิงกลด้วยการทดสอบแรงดัดงอ (Flexural testing) ออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 12.7x127x2 มิลลิเมตร โดยมีโครงสร้างภายในเป็นเส้นใยถักกันไปมาสองรูปแบบเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้น สำหรับรูปแบบ Lay-down pattern แบบตาราง ในทางทฤษฎีเมื่อกำหนดความหนาแน่นของเส้นใย (Fill density) ที่ 80% จะใช้เส้นใยขาเข้าต่อหนึ่งชิ้นงาน 1264.2 มิลลิเมตร ได้ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่ของช่องว่างแบบตารางช่องละ 0.00826 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนช่องว่างทั้งหมด 1512 ช่อง รวมมีพื้นที่ช่องว่างทั้งหมดต่อ 1 ชิ้นเท่ากับ 12.489 ตารางเซนติเมตร

ในส่วนของรูปแบบ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม ในทางทฤษฎีเมื่อกำหนดความหนาแน่นของเส้นใย (Fill density) ที่ 80% จะใช้เส้นใยขาเข้าต่อหนึ่งชิ้นงาน 1308.9 มิลลิเมตร ได้ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่ของช่องว่างแบบตารางช่องละ 0.012 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนช่องว่างทั้งหมด 1168 ช่อง รวมมีพื้นที่ช่องว่างทั้งหมดต่อ 1 ชิ้นเท่ากับ 14.016 ตารางเซนติเมตร

เตรียมอนุภาคของ NaCl ด้วยการนำผง NaCl 99% มาทำการบดด้วย Ball mills ขนาดความจุ 0.5 กิโลกรัม ใช้ลูกบอลจำนวน 17 ลูกในการบดเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงต่อ NaCl 400 กรัม จากนั้นนำผง NaCl ที่ผ่านการบดแล้วมาคัดแยกขนาดด้วยเครื่อง Sieve shaker โดยใช้ Sieve เบอร์ 200 และ 400 เพื่อคัดแยกขนาดอนุภาคในช่วง 38-75 ไมโครเมตร

เตรียมของผสม PBS/NaCl โดยการนำเม็ดพลาสติก PBS มาทำละลายในไดคลอโรมีเทน พร้อมทั้งทำการปั่นกวนด้วยเครื่องกวนสารละลาย เมื่อเม็ดพลาสติก PBS ละลายดีแล้ว จึงทำการเติม NaCl ที่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้วให้ได้อัตราส่วนของ PBS/NaCl เท่ากับ 60:40 50:50 และ 40:60 w/w ตามลำดับ ปั่นกวนจนอนุภาคของ NaCl กระจายตัวสม่ำเสมอภายในเมทริกซ์ แล้วจึงทำการเทของผสมนี้ลงในถาดแก้ว ที่งัวจันแห้งสนิท แล้วนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดใกล้เคียงกัน

นำของผสม PBS/NaCl อัตราส่วนต่าง ๆ ที่เตรียมไว้มาทำการขึ้นรูปเป็นเส้นใย (Filament) ผสม PBS/NaCl ด้วยเครื่องอัดรีดแบบสกรูคู่ โดยกำหนดสภาวะอุณหภูมิทั้ง 8 โซนอยู่ที่ 100 110 120 130 140 140 150 และ 150 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ความเร็วรอบสกรู 45 รอบต่อนาที ให้ได้เส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1.45 ถึง 1.80 มิลลิเมตร ทำการขึ้นรูปซ้ำโดยเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นเม็ดพลาสติก PBS เพื่อขึ้นรูปเส้นใย nPBS ที่สภาวะเดียวกันแต่เปลี่ยนอุณหภูมิทั้ง 8 โซนให้อยู่ที่ 90 100 110 115 120 125 130 และ 130 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

นำเส้นใย PBS/NaCl อัตราส่วนต่าง ๆ และเส้นใย nPBS มาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่องพิมพ์แบบสามมิติตามแบบ CAD ที่ออกแบบไว้ โดยใช้อุณหภูมิที่หัว Nozzle อยู่ที่ 190 องศา



เซลเซียส สำหรับเส้นใย PBS/NaCl ทุกอัตราส่วน และ 150 องศาเซลเซียส สำหรับเส้นใย nPBS จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณเกลือในเนื้อวัสดุและลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างกัน

นำโครงเลี้ยงเซลล์ทุกกลุ่มมาชะล้าง NaCl ออก ด้วยการแช่ในน้ำไร้ประจุที่มีการหมุนเวียนของน้ำตลอดเวลา โดยจะตรวจสอบปริมาณ NaCl คงเหลือได้จากการทดสอบด้วยสารละลาย Silver nitrate และทำการเปลี่ยนน้ำไร้ประจุใหม่ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาหนึ่งวัน และทุก ๆ วัน จนกระทั่งไม่สามารถทำการตรวจวัดหาเกลือในสารละลายได้อีกต่อไป จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน นำโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนนี้มาทำให้แห้งโดยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรใช้รหัสชื่อดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 รหัสชื่อของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร

Codename	PBS:NaCl ratio (%wt.)	Lay-down pattern
nPBS-g	100:0	Grid
nPBS-t	100:0	Triangle
6:4PBS-g	60:40	Grid
6:4PBS-t	60:40	Triangle
5:5PBS-g	50:50	Grid
5:5PBS-t	50:50	Triangle
4:6PBS-g	40:60	Grid
4:6PBS-t	40:60	Triangle

นำโครงเลี้ยงเซลล์มาทำการศึกษาดังต่อไปนี้

- ศึกษาสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

เพื่อวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิว และลักษณะโครงสร้างภายในของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยการวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิว จะนำโครงเลี้ยงเซลล์มาแปะติดกับสตัป (Stub) ด้วยคาร์บอนเทปในลักษณะหันด้านบน (Top-view) ขึ้น นำมาเคลือบกับแพลทตินัมด้วยเทคนิคเคลือบตัวอย่างด้วยผงโลหะ (Sputter coater) ที่กระแสไฟฟ้า 20 mA ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วทำการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์ สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างภายใน นำโครงเลี้ยงเซลล์มาแช่ลงในไนโตรเจนเหลวก่อน แล้วทำการหักชิ้นงานภายใต้สภาวะเย็นยิ่งยวด (Cryogenic fracture) แล้วจึงนำชิ้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่แตกหักมาแปะติดกับสตัปด้วยคาร์บอนเทปในลักษณะหันด้าน

รอยแตกขึ้น นำมาเคลือบกับแพลททินัมด้วยเทคนิคเคลือบตัวอย่างด้วยผงโลหะ (Sputter coater) ที่กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมป์ ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วทำการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์

- ศึกษาความเป็นรูพรุนด้วยเทคนิคการหาค่าความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity determination technique)

ศึกษาความเป็นรูพรุนด้วยชุดเครื่องมือหาค่าความหนาแน่น (Density determination kit) ที่ประกอบด้วยเครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic balance) ทำการทดสอบโดยการวางโครงเลี้ยงเซลล์ลงในแพนชั่งที่แช่ในน้ำกลั่นเพื่อวัดน้ำหนักที่เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับการชั่งโครงเลี้ยงเซลล์ในอากาศ

โดยค่าความถ่วงจำเพาะ ( $\rho$ ) คำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\rho = \frac{W_{in\ air} * (\rho_{water} - \rho_a)}{(W_{in\ air} - W_{in\ water})} + \rho_a \quad (1)$$

เมื่อ  $W_{in\ air}$  = น้ำหนักที่ชั่งได้ของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อชั่งในอากาศ

$W_{in\ water}$  = น้ำหนักที่ชั่งได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ชั่งในน้ำ

$\rho_{water}$  = ความหนาแน่นของน้ำ (0.999707 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)

และ  $\rho_a$  = ความหนาแน่นของอากาศภายใต้บรรยากาศมาตรฐาน (0.00118 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)

ร้อยละปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์คำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\%porosity = \frac{\rho - \rho_{bulk}}{\rho} \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ  $\rho_{bulk}$  = ความหนาแน่นรวมของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยสามารถคำนวณได้จากน้ำหนักชั่งได้ของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อชั่งในอากาศและปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ที่แสดงในโปรแกรม Matter Control

- ศึกษาความชอบน้ำด้วยการวัดมุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle measurement)

ความชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรหาได้จากการใช้เครื่อง USB digital microscope ที่ประกอบด้วย Axis Feed Auger Stage และใช้น้ำกลั่นเป็นของเหลวที่ใช้ในการทดสอบ โดยการวางโครงเลี้ยงเซลล์ลงบนฐานของ Axis Feed Auger Stage ทำการปรับ

ความสูงและระยะให้เหมาะสมกับระยะของกล้องจากเครื่อง USB digital microscope แล้ว ถ่ายรูปขณะที่หยดน้ำกลั่นครั้งละ 10 ไมโครลิตรลงบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ นำรูปถ่ายของหยดน้ำกลั่นที่ถูกหยดลงบนโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรมาวัดมุมสัมผัสน้ำด้วยโปรแกรม ImageJ ที่ทำการติดตั้งส่วนเสริมสำหรับวัดมุมสัมผัสน้ำไว้แล้ว

- ศึกษาสมบัติเชิงกลด้วยการทดสอบแรงดัดงอ (Flexural testing)

นำโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มสำหรับทดสอบแรงดัดงอที่ผ่านการชะล้างเกลือด้วยน้ำไว้เรียบร้อยแล้ว มาทดสอบสมบัติเชิงกลด้วยวิธี Flexural testing โดยทำการวัดความหนาและความกว้างของชิ้นงานทดสอบแต่ละชิ้นโดยละเอียดด้วยเวอร์เนียร์ คาลิปเปอร์ (Vernier caliper) แล้วคำนวณอัตราการกดของ Crosshead (Rate of crosshead motion) ด้วยสมการดังนี้

$$R = ZL^2/6d \quad (3)$$

เมื่อ  $R$  = อัตราการกดของ Crosshead (มิลลิเมตรต่อนาที)

$L$  = ระยะ span (มิลลิเมตร)

$d$  = ความหนาของชิ้นงาน (มิลลิเมตร)

และ  $Z$  = อัตราของความเครียดที่กระทำต่อเส้นใยภายนอก (มิลลิเมตรต่อมิลลิเมตรต่อนาที) โดยทั่วไปจะใช้  $Z = 0.01$  mm/mm/min

นำค่าที่ได้มาใช้ประกอบการติดตั้งชิ้นงานกับเครื่องทดสอบแรงเอนกประสงค์ (UTM) โดยใช้ระยะ span เป็น 16 เท่าของความหนาของชิ้นงานใช้ Load cell ขนาด 500 นิวตัน และตั้งค่าระยะการกดสูงสุดที่ 5% ของความเครียดที่เกิดขึ้น (5% Strain) แล้วทำการทดสอบแรงดัดงอด้วยวิธีการทดสอบดัดงอแบบสามจุด (Three point bending test) นำผลการทดสอบที่ได้จากเครื่องมือมาคำนวณหาความแข็งแรงต่อการดัดงอ (Flexural strength) ด้วยสมการดังนี้

$$\sigma_f = \frac{3PL}{2bd^2} \quad (4)$$

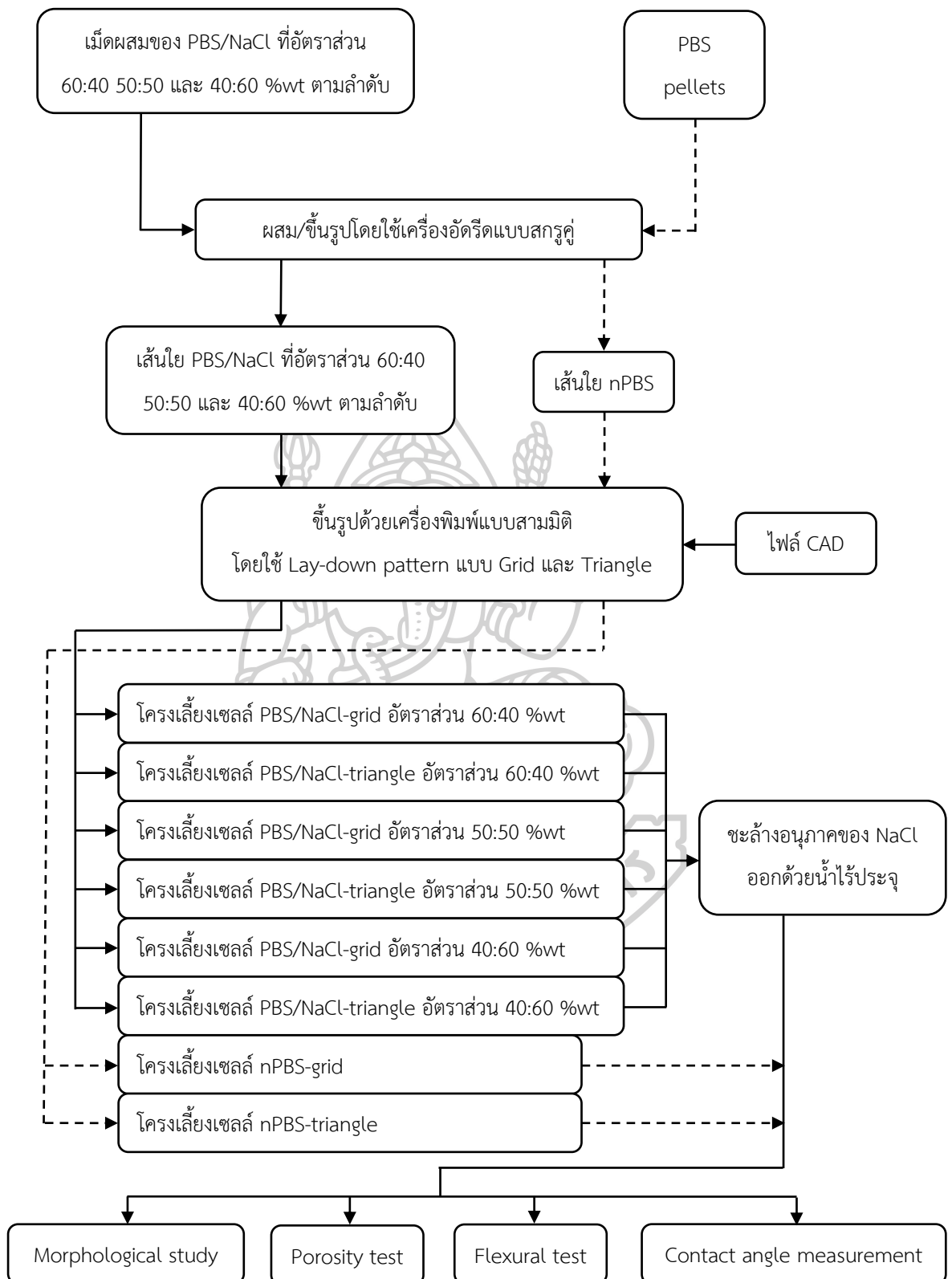
เมื่อ  $\sigma_f$  = ความแข็งแรงต่อการดัดงอ (เมกะปาสคัล)

$P$  = แรง ณ จุดที่สนใจบนกราฟ Load-deflection curve (นิวตัน)

$L$  = ระยะ Span (มิลลิเมตร)

$b$  = ความกว้างของชิ้นงาน (มิลลิเมตร)

และ  $d$  = ความหนาของชิ้นงาน (มิลลิเมตร)



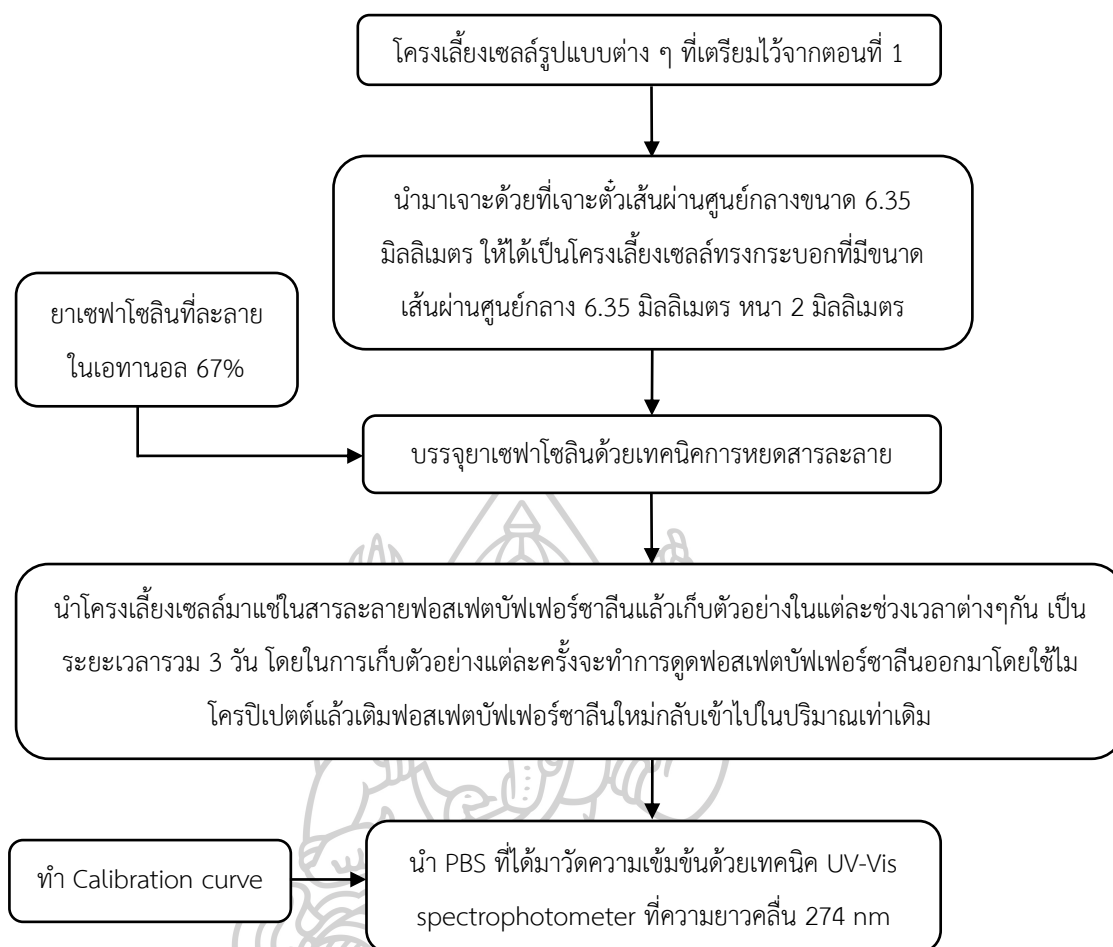
รูปที่ 3-6 แผนภาพการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน PBS ที่มีปริมาณรูพรุน 3 อัตราส่วน และการทดสอบสมบัติทางกายภาพและเชิงกล

## **ตอนที่ 2: การนำโครมเลียงเซลล์มาบรรจุยา แล้วทดสอบการปลดปล่อยยา**

นำโครมเลียงเซลล์มาเจาะด้วยที่เจาะตัวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6.35 มิลลิเมตร ให้ได้เป็นโครมเลียงเซลล์ทรงกระบอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.35 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร แล้วนำมาบรรจุยาเซฟาโซลินความเข้มข้น 3350 ppm ที่ละลายอยู่ในเอทานอลความเข้มข้น 67% ด้วยเทคนิคการหยดสารละลาย โดยนำสารละลายยาเซฟาโซลินในเอทานอลมาหยดลงบนโครมเลียงเซลล์ครั้งละ 10 ไมโครลิตรด้วยไมโครปิเปตแล้วรอให้แห้ง หยดซ้ำรวมสามครั้งโดยเว้นระยะเวลาครั้งละ 30 นาที จะได้โครมเลียงเซลล์ที่บรรจุยา

ทำการเตรียมกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Calibration curve) ด้วยการนำสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการละลายยาเซฟาโซลินความเข้มข้น 0.1 1 5 10 50 และ 100 ppm ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffer saline) มาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร แล้วนำความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ทราบค่าแน่นอนกับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้นมาพลอตกราฟ จะได้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานที่เป็นกราฟเส้นตรง มีค่า  $R^2$  ไม่น้อยกว่า 0.995 (แสดงในภาคผนวก ก.)

นำโครมเลียงเซลล์ที่บรรจุยาแล้วมาทดสอบการปลดปล่อยยา โดยนำโครมเลียงเซลล์มาแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่เวลา 1 นาทีแรก จากนั้นเก็บทุกๆ 5 นาที ในนาที่ที่ 5, 10, 15 นาทีตามลำดับ จากนั้นเก็บในนาที่ที่ 30 และ 60 ตามลำดับ เก็บต่อไปในทุก ๆ 1 ชั่วโมงในชั่วโมงที่ 2, 3, 6, 12 แล้วเก็บอีกครั้งเมื่อครบ 24 ชั่วโมงแรกและเก็บทุกวันวันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะทำการดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนออกมาโดยใช้ไมโครปิเปตต์แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนใหม่ลงไปปริมาณเท่าเดิม จากนั้นนำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่ได้มาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณจากสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานที่เตรียมไว้ จะได้ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง



รูปที่ 3-7 แผนภาพการนำโครงสร้างเซลล์มาบรรจุยา แล้วทดสอบการปลดปล่อยยา

### ตอนที่ 3: การทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

นำโครงสร้างเซลล์มาตัดเป็นชิ้นขนาด  $10 \times 10 \times 2$  มิลลิเมตร เพื่อเตรียมสำหรับทดสอบสมบัติทางชีวภาพคือ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย Cytotoxicity testing และทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย ด้วย Dynamic shake flask method

- การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกาย ด้วย Cytotoxicity testing

ทำการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหนู L929 ความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรในสารตัวกลาง MEM completed medium ที่บรรจุลงในไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well plate) นำไปบ่มที่สภาวะอุณหภูมิ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์  $5 \pm 1$  % และความชื้นสัมพัทธ์  $95 \pm 5$  % เป็นระยะเวลา  $24 \pm 2$  ชั่วโมง เพื่อให้ได้ชั้นของเซลล์เป็นชั้นเดียว (Monolayer) สำหรับการทดสอบ

จากนั้นทำการเปลี่ยนถ่ายสารตัวกลางจาก MEM completed medium เป็นสารที่ได้จากตัวอย่างต่อไปนี้

- The blank: สารตัวกลางที่ไม่มีโครมเล็งเซลล์
- The negative control: เลือกใช้ 'Thermanox' (Nunc) coverslip เป็นวัสดุตัวควบคุมลบ โดยมีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของสารตัวกลางอยู่ที่ 6 ตารางเซนติเมตรต่อมิลลิลิตร
- The positive control: เลือกใช้ฟิล์มพอลิยูรีเทน (Polyurethane film) ที่ผสมสาร Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 0.1% เป็นวัสดุตัวควบคุมบวก โดยมีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของสารตัวกลางอยู่ที่ 3 ตารางเซนติเมตรต่อมิลลิลิตร
- The test specimens: สารตัวกลางที่มีโครมเล็งเซลล์สูตร nPBS-t และสูตร 4:6PBS-t สำหรับสูตร 4:6PBS-t จะบรรจุยาด้วยเทคนิคการหยดสารละลาย ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อชิ้น ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.4, 1.5, 6.25, 25, 100 และ 3350 ppm ตามลำดับ โดยมีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของสารตัวกลางอยู่ที่ 3 ตารางเซนติเมตรต่อมิลลิลิตร

สารตัวกลางทุกชนิดจะถูกเก็บหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา  $24 \pm 2$  ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้กระบวนการ MTT assay ในการนับเซลล์ โดยการเติมสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) แล้วบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสาร MTT ออกแล้วเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ลงไป ทำการวัด Absorbance โดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วคำนวณร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ (% viability) จากสมการดังนี้

$$\% \text{ viability} = 100 * OD_{570e} / OD_{570b} \quad (4)$$

เมื่อ  $OD_{570e}$  = ค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นปรากฏที่วัดได้ของสารสกัดจากตัวอย่างทดสอบ

และ  $OD_{570b}$  = ค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นปรากฏที่วัดได้ของสารสกัดจาก blank

- การทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus Aureus* (*S. aureus*) และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ด้วย Dynamic shake flask method ที่ ดัดแปลงมาจากมาตรฐาน ASTM E2149-10

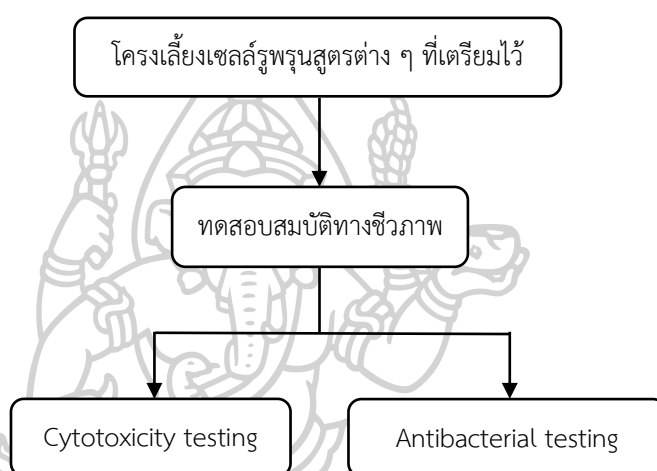
ในการทดสอบนี้จะใช้โครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS เป็นตัวอย่างควบคุม จึงจะไม่มี การบรรจุลงในโครงเลี้ยงเซลล์สูตรนี้ เพื่อใช้เปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อ แบคทีเรียกับชิ้นงานที่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลือและมีการบรรจุยา นำโครงเลี้ยงเซลล์รู พรุนอันเนื่องมาจากเกลือแต่ละสูตรที่เตรียมไว้มาบรรจุยาด้วยเทคนิคการหยดสารละลายที่ ความเข้มข้น 3350 ppm ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อชิ้น เตรียมจำนวน 10 ชิ้นต่อโครงเลี้ยง เซลล์หนึ่งสูตร แล้วนำโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรไปผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ด้วยรังสี UV เป็นระยะเวลา 30 นาทีต่อหนึ่งด้าน ทำการฆ่าเชื้อทั้งสองด้านแล้วพักไว้ จากนั้นเตรียมอาหาร เลี้ยงเชื้อสองชนิด คืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient agar) นำมาเทลงบนจานเพาะเชื้อ พักทิ้งไว้สำหรับเป็นอาหารของแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient broths) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย นำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดเหลวที่บรรจุในหลอดทดลอง นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็น ระยะเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง จนของเหลวในหลอดทดลองมีลักษณะขุ่น ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อเขี่ย เชื้อจากของเหลวในหลอดทดลองมาขีดบนจานเพาะเชื้อ (streak plate method) นำไปบ่ม จนเชื้อโตมีขนาดมองเห็นด้วยตาเปล่าแล้วใช้ห้วงเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อบนจานเพาะเชื้อมาใส่ใน หลอดทดลองบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว นำไปบ่มอีกครั้งเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง แล้วจึงใช้ ไมโครปิเปตต์ดูดของเหลวในหลอดทดลองครั้งละ 100 ไมโครลิตรมาบรรจุในขวด รูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเตรียมไว้ขวดละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำชิ้นโครงเลี้ยง เซลล์บรรจุยาแต่ละสูตรมาบรรจุลงในขวดรูปชมพู่สูตรละ 10 ชิ้น ทำการปิดฝาให้แน่นด้วย สำลีและอะลูมิเนียมฟอยล์ นำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุแบคทีเรียและโครงเลี้ยงเซลล์แล้วทุกสูตร ไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา  $24 \pm 2$  ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือ จางแบคทีเรียในแต่ละขวดรูปชมพู่ด้วยวิธีการเจือจางเป็นลำดับ (10-Fold serial dilutions) ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ โดยการนับจำนวน โคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะทำด้วยเทคนิคروبเพลต คือทำการหยดสารละลายที่ผ่าน การเจือจางแล้วลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้หยดละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 10 หยดต่อ หนึ่งซ้า แล้วนำจานเพาะเชื้อเหล่านี้ไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา  $24 \pm 2$  ชั่วโมง แล้วจึงนับโคโลนีที่ปรากฏขึ้นบนจานเพาะเชื้อแต่ละสูตร ทำการเปรียบเทียบ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS ในแต่ละ Lay-down pattern เทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตรอื่น ๆ ที่มีการบรรจุยาลงไป โดยเทียบที่ Lay-down pattern เดียวกัน และคำนวณหาประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรีย (%) ของฟิล์มแต่ละ ชนิดโดยใช้สมการดังนี้



$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ A = จำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตรของแบคทีเรียที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS ในแต่ละ Lay-down patterns

และ B = จำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตรของแบคทีเรียที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์สูตรอื่น ๆ ที่มีการบรรจุยาลงไป โดยเทียบที่ Lay-down pattern เดียวกัน



รูปที่ 3-8 แผนภาพการทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

## 8. วิเคราะห์และสรุปผลงานวิจัย

### 8.1. ใช้สถิติเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของผลการทดสอบ

ค่าจากการทดสอบจะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ ANOVA ด้วยโปรแกรม Minitab 17 โดยใช้โมเดลของ Fisher's ในการวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของผลการทดลอง โดยมีค่าความเชื่อมั่น 95%

## 9. นำเสนอผลงานวิจัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงเลี้ยงเซลล์ถูกคิดค้นขึ้นมาเพื่อตอบสนองการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้อย่างน้อยหนึ่งอย่างคือ (1) มีส่วนช่วยในการเกิดปฏิกริยาระหว่างเซลล์กับวัสดุชีวภาพ (Cell-biomaterial interactions) เป็นที่ในการยึดเกาะของเซลล์ และเป็นที่สะสมของเซลล์กับของเหลวภายนอกเซลล์ (Cells and extracellular matrix; ECM) เช่น โพรตีนและโปรตีโอไกลแคน (Proteoglycans) (2) ช่วยให้กระบวนการขนถ่ายแก๊ส สารอาหาร และปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งเสริมให้เซลล์อยู่รอด เจริญเติบโต และแบ่งตัวได้เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ และ (3) ช่วยลดการอักเสบและการติดเชื้อภายในร่างกาย [96] เพื่อตอบสนองต่อหลักเกณฑ์ดังกล่าว วัสดุที่นำมาใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์นั้นจะต้องไม่ต่อต้านการเกิดปฏิกริยาระหว่างเซลล์กับตัววัสดุเพื่อให้เซลล์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ พอลิบีวทิลีนซัคซิเนตเป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ร่างกายได้ดี ถูกเลือกเป็นวัสดุสำหรับขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์มาแล้วหลายครั้ง [10-13] อีกทั้งไม่เกิดสารประกอบที่เป็นพิษจากกระบวนการย่อยสลายภายในร่างกาย [9] จึงมีความเหมาะสมที่จะเลือกเป็นวัสดุชีวภาพในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ของงานวิจัยนี้ ในด้านการตอบสนองต่อความต้องการกระบวนการขนถ่ายสารอาหารและของเหลวต่าง ๆ ปัจจัยหลักที่ส่งเสริมกระบวนการนี้คือความเชื่อมต่อกันของรูพรุน (Pore interconnectivity) ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ หากโครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนเชื่อมต่อกันมากเพียงพอ กระบวนการขนถ่ายสารเข้าออกจากโครงเลี้ยงเซลล์จะเกิดขึ้นได้อย่างสะดวก ส่งผลให้การฟื้นฟูเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากขึ้น [97] เทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด (FDM) ที่สามารถออกแบบรูปร่างของโครงสร้างและขนาดของช่องว่างระหว่างเส้นใยได้อย่างอิสระ และสามารถออกแบบโครงสร้างให้มีการเชื่อมต่อกันของรูพรุนได้ 100% [98] จึงถูกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้เพื่อสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโครงสร้างและรูปแบบตามที่ต้องการ สำหรับสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ช่วยลดการอักเสบและการติดเชื้อ งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เซฟาโซลินซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในการทำหน้าที่ยับยั้งและลดจำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* อันมีฤทธิ์ก่อให้เกิดอาการอักเสบของบาดแผลได้ เพื่อทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ทำหน้าที่เป็นตัวนำส่งยา (Drug delivery carrier) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้มีการสร้างรูพรุนขนาดเล็กให้เกิดขึ้นภายในเส้นใยของโครงเลี้ยงเซลล์โดยการใช้เทคนิคการชะล้างเกลือ ทั้งนี้เพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์สามารถกักเก็บตัวยาไว้ภายในได้มากยิ่งขึ้น สำหรับกระบวนการบรรจุตัวยาลงในโครงเลี้ยงเซลล์จะใช้เทคนิคการหยดสารละลาย เทคนิคนี้จะช่วยให้สามารถบรรจุยาลงในโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีโครงสร้างตามที่ต้องการแล้ว ซึ่งช่วยให้

สามารถหลีกเลี่ยงความร้อนในระหว่างกระบวนการบรรจุยาที่อาจจะก่อให้เกิดการสลายตัวหรือเสียสภาพของตัวยาที่จะนำมาใช้ได้ รวมทั้งสามารถควบคุมปริมาณยาที่บรรจุได้ตามต้องการ

จุดหมายของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงแปดเหลี่ยมที่สามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาได้สำหรับนำเอาไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการป้องกันการติดเชื้อของแผลหลังผ่าตัด โดยงานวิจัยนี้ได้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตโดยใช้เทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด ร่วมกับการชะล้างเกลือสำหรับนำมาใช้ในการนำส่งยาปฏิชีวนะเซฟาโซลิน โดยศึกษาผลของปริมาณเกลือและการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีต่อความเป็นรูปทรงแปดเหลี่ยม สัณฐานวิทยา ความชอบน้ำ สมบัติเชิงกล และอัตราการปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์ รวมทั้งศึกษาสมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยงานวิจัยนี้มีการดำเนินการแบ่งออกเป็น 3 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงแปดเหลี่ยม PBS ที่มีปริมาณรูปทรงแปดเหลี่ยม 3 อัตราส่วน และการทดสอบสมบัติทางกายภาพและเชิงกล

ตอนที่ 2 การทดสอบการปลดปล่อยยา

ตอนที่ 3 การทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

#### **ตอนที่ 1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงแปดเหลี่ยม PBS และการทดสอบสมบัติทางกายภาพและเชิงกล**

ในขั้นตอนนี้ จะเป็นการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรที่ใช้สำหรับการทดสอบทั้งหมด จากนั้นทำโครงเลี้ยงเซลล์มาทดสอบสมบัติทางกายภาพเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการวิเคราะห์พฤติกรรมการปลดปล่อยยา รวมไปถึงใช้วิเคราะห์ความเหมาะสมในการนำมาใช้งานทั้งในส่วนของสมบัติเชิงกลและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยทำการทดสอบทางกายภาพคือ ศึกษาสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ทดสอบความเป็นรูปทรงแปดเหลี่ยมด้วยเทคนิคการหาค่าความถ่วงจำเพาะ ทดสอบความชอบน้ำด้วยการวัดมุมสัมผัสน้ำ และทดสอบแรงดึงดัด

#### **4.1 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ nPBS และโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงแปดเหลี่ยม PBS**

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีที่จะได้รับการนำไปใช้กับร่างกายนั้นจะต้องมีความเข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกายได้ดี เซลล์จะต้องยึดเกาะกับโครงเลี้ยงเซลล์ได้ เซลล์สามารถเจริญเติบโตและทำหน้าที่ได้ตามปกติ รวมไปถึงจะต้องสามารถแผ่ขยายหรือเคลื่อนย้ายเข้าไปในโพรงหรือรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ [1] พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสมบัติด้านความเข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกายที่ดี เช่นสามารถเป็นที่อยู่ให้กับเซลล์สร้างกระดูกอสติโอเบลาสต์ ในการเจริญเติบโต

และแบ่งตัวได้ [10-12] เป็นต้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ PBS มาเป็นวัสดุในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน โดยเลือกสร้างรูพรุนด้วยวิธีการชะล้างเกลือ (Salt leaching technique) ซึ่งเป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำ มีวิธีการทำที่ไม่ซับซ้อน และสามารถสร้างรูพรุนที่มีลักษณะเป็นโพรงเชื่อมต่อกัน (Interconnected pores) ได้ดีเมื่อมีปริมาณของอนุภาคเกลือที่เหมาะสม [35, 99] จึงกำหนดปริมาณเกลือที่เติมลงไป ใน PBS matrix ออกเป็น 3 อัตราส่วน คืออัตราส่วนของเกลือ ที่ 40%, 50% และ 60% w/w เพื่อทดลองและวิเคราะห์ว่าปริมาณรูพรุนที่แตกต่างกันจะส่งผลกระทบต่อสมบัติทางกายภาพ เชิงกล ชีวภาพ รวมไปถึงอัตราการปลดปล่อยยาอย่างไร

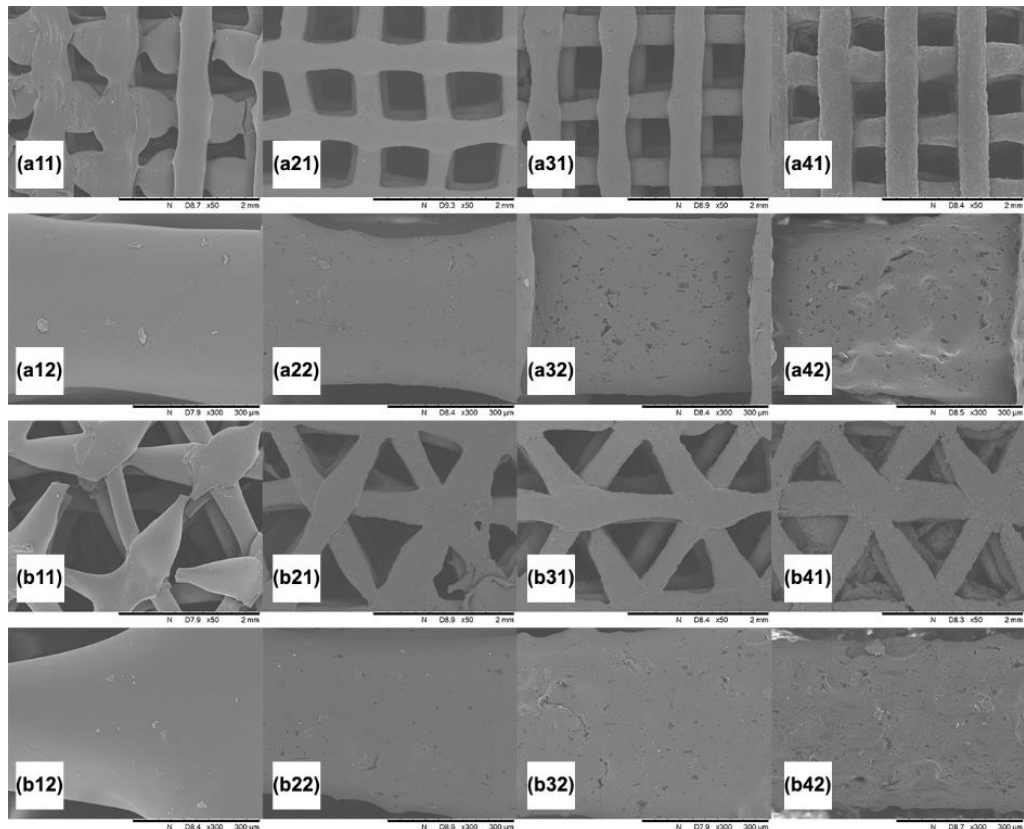
นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาอิทธิพลของรูปแบบการจัดเรียงตัวของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีต่อสมบัติทางกายภาพ เชิงกล ชีวภาพ รวมไปถึงอัตราการปลดปล่อยยา โดยทำการออกแบบทิศทางการขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติของโครงเลี้ยงเซลล์ออกเป็นสองรูปแบบ เพื่อกำหนดลักษณะทางสถาปัตยกรรมของโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีลักษณะเป็นเส้นใยถักกันไปมาในรูปแบบที่แตกต่างกัน ในที่นี้จะเรียกว่า Lay-down pattern สองรูปแบบ คือแบบตาราง (Grid) ที่ในแต่ละชั้น (Layer) จะประกอบไปด้วยเส้นใยในแนวแกน x และแกน y ตัดกันทำมุม 90 องศา และแบบสามเหลี่ยม (Triangle) ที่ในแต่ละชั้นจะประกอบไปด้วยเส้นใยในแนวแกน x และแกน y ลากตัดกันทำมุม 60 องศา การกำหนด Lay-down pattern ที่แตกต่างกันนี้คาดว่าจะส่งผลให้รูพรุนรวมของโครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาณที่ต่างกัน แม้จะเติมเกลือในอัตราส่วนที่เท่ากัน [92] ดังนั้นคาดว่า รูปแบบของ Lay-down pattern จะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการปลดปล่อยยา

ในการขึ้นรูปเส้นใย nPBS สำหรับนำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่องพิมพ์แบบสามมิติ จะใช้เครื่องอัดรีดแบบสกรูคู่ ได้กำหนดสภาวะอุณหภูมิทั้ง 8 โซนอยู่ที่ 90 100 110 115 120 125 130 และ 130 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ความเร็วรอบของสกรูที่ 45 รอบต่อนาที ส่วนสภาวะที่ใช้ในการขึ้นรูปเส้นใยผสม PBS/NaCl จะใช้อุณหภูมิทั้ง 8 โซนให้อยู่ที่ 100 110 120 130 140 140 150 และ 150 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยอุณหภูมิในการขึ้นรูปเส้นใย nPBS ที่ต่ำกว่าการขึ้นรูปเส้นใยผสม PBS/NaCl เนื่องจากเส้นเอ็กทูดเตทของ nPBS ที่ออกมาจากหัวตายมีความอ่อนตัวสูง รวมถึงมีความเหนียวและมี Melt strength ที่ต่ำกว่าเส้นใยผสม PBS/NaCl สาเหตุเพราะเส้นใย nPBS ไม่มีอนุภาคของเกลือปะปนอยู่ภายในเส้นใย ส่วนเส้นใย PBS/NaCl ขณะออกจากหัวตายส่วนพอลิ บิวทิลีนซัดซิเนตเมทริกซ์จะยังหลอมเหลวอยู่แต่อนุภาคเกลือยังเป็นของแข็ง อนุภาคของเกลือที่มีปริมาณมาก (40% - 60%) นี้จะเพิ่มความเหนียวให้กับเส้นใยขณะออกจากหัวตายรวมถึงทำให้ได้เส้นใยที่มีความเสถียรของขนาดพื้นที่หน้าตัดและคงรูปที่ดี และเส้นใยมีความสม่ำเสมอ หลักการนี้ยังส่งผลกระทบต่อการนำเส้นใยมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่องพิมพ์แบบสามมิติเช่นกัน ส่งผลให้ต้องใช้ อุณหภูมิที่หัว Nozzle แตกต่างกันคือ 190 องศาเซลเซียส สำหรับสูตรที่ขึ้นรูปจากเส้นใย PBS/NaCl และ 150 องศาเซลเซียส สำหรับสูตรที่ขึ้นรูปจากเส้นใย nPBS

เมื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติเรียบร้อยแล้ว จึงนำโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่ขึ้นรูปจากเส้นใย PBS/NaCl ไปแช่ในน้ำไว้ประจุที่มีการไหลเวียนตลอดเวลาเพื่อชะล้างอนุภาคเกลือออกทั้งหมด โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 2-4 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับขนาดและอัตราส่วนเกลือของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ตัน (nPBS) และโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงสูตรต่าง ๆ ระบุเป็นรหัสชื่อตามอัตราส่วนของ PBS:NaCl และรูปแบบของ Lay-down pattern (ตาราง (Grid) และสามเหลี่ยม (Triangle)) ดังนี้ nPBS-g, nPBS-t, 6:4PBS-g, 6:4PBS-t, 5:5PBS-g, 5:5PBS-t, 4:6PBS-g และ 4:6PBS-t ตามลำดับ

#### 4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy)

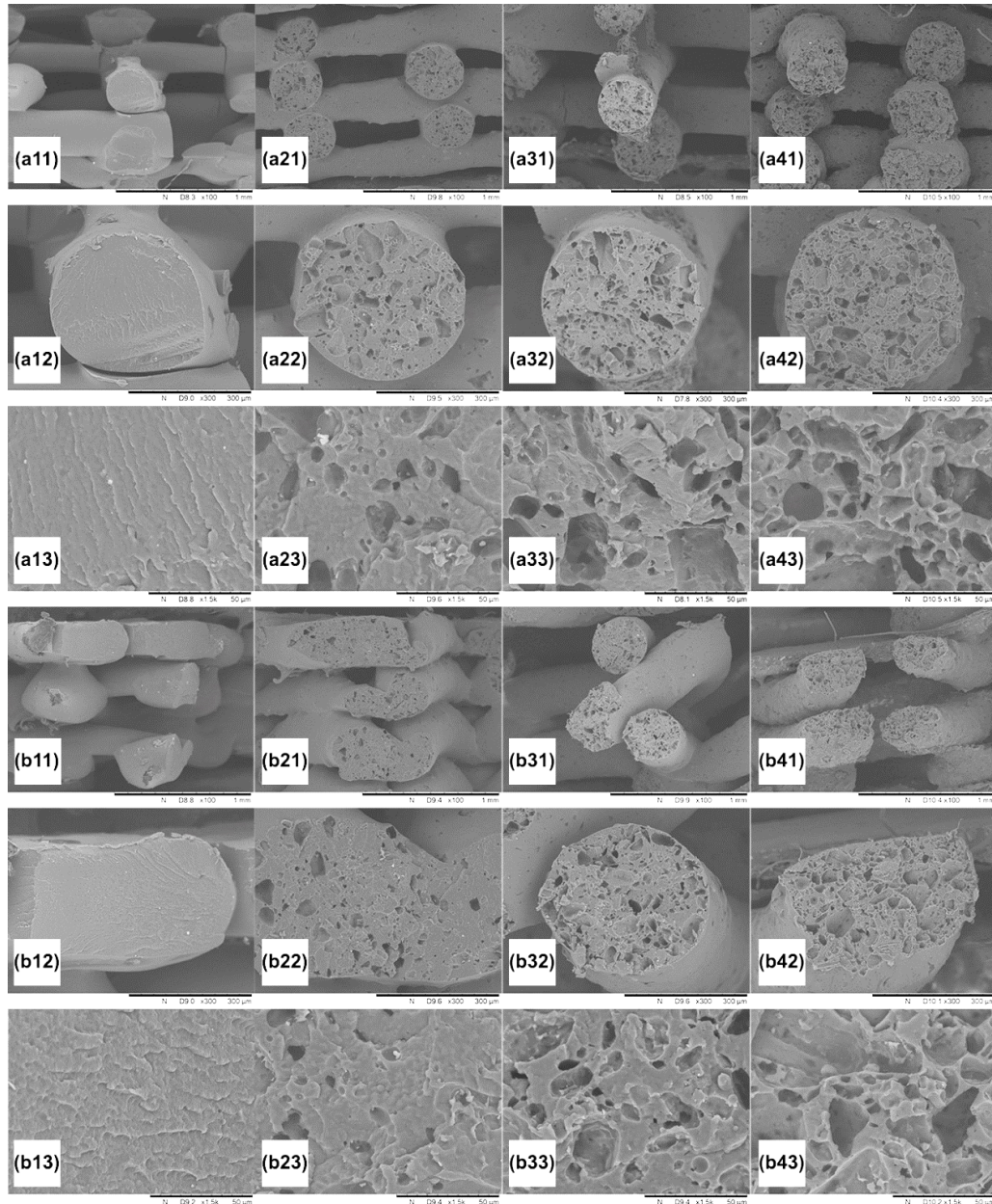
ในการศึกษาสัณฐานวิทยา จะใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 30x30x2 มิลลิเมตรและมีโครงสร้าง Lay-down patterns สองรูปแบบ คือแบบตารางและแบบสามเหลี่ยม โดยแบ่งชิ้นงานออกเป็นสองชุด เพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาสองลักษณะ คือชุดสำหรับศึกษาลักษณะพื้นผิวของเส้นใยของโครงเลี้ยงเซลล์ และชุดสำหรับศึกษาลักษณะภาคตัดขวางเส้นใยของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยจะทำการหักชิ้นงานภายใต้สภาวะเย็นยิ่งยวดก่อนนำไปทดสอบ รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะพื้นผิวของเส้นใยของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค SEM จะแสดงให้เห็นลักษณะพื้นผิวของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งแบบไม่มีรูปทรงอันเนื่องมาจากเกลือและมีรูปทรงที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน โดยแถวที่ 1 แสดงรูปทรงของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบตาราง และแถวที่ 3 แสดงโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม



รูปที่ 4-1 รูปถ่าย SEM ที่พื้นผิวของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ (a) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบตาราง: nPBS-g (a11-a12), 6:4PBS-g (a21-a22), 5:5PBS-g (a31-a32) และ 4:6PBS-g (a41-a42) และ (b) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบสามเหลี่ยม: nPBS-t (b11-b12), 6:4PBS-t (b21-b22), 5:5PBS-t (b31-b32) และ 4:6PBS-t (b41-b42) โดยมีกำลังขยายของรูปในแถวที่หนึ่งกับแถวที่สามอยู่ที่ 50x และแถวที่สองกับแถวที่สี่อยู่ที่ 300x

จากรูปที่ 4-1 หากพิจารณารูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลื่อ (รูป a11 และ b11) เปรียบเทียบกับรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน (รูป a21 a31 a41 b21 b31 และ b41) จะสังเกตได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลื่อมีขนาดและความเสถียรต่อการคงรูปเป็นเส้นใยต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน ที่เป็นเช่นนี้เพราะโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลื่อจะมีความหนืดของพอลิเมอร์หลอมเหลวที่ต่ำกว่า เมื่อถูกฉีดออกมาจากหัวฉีด (Nozzle) ของเครื่อง 3D printing เส้นใยจึงเกิดการแบนออกตามอิทธิพลของแรงโน้มถ่วง เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลื่อ (คอลัมน์ที่ 1) พบว่าเส้นใยแสดงลักษณะของพื้นผิวที่เรียบ และเมื่อมีการเพิ่มปริมาณเกลื่อ (คอลัมน์ที่ 2-4) พื้นผิวของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์รู

พอร์นจะมีความขรุขระมากขึ้นและมีจำนวนรูพอร์นที่พื้นผิวเพิ่มขึ้น รวมไปถึงรูพอร์นมีขนาดที่ใหญ่ขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามรูปแบบ Lay-down patterns ไม่ส่งผลต่อลักษณะสัญญาณวิทยาบริเวณพื้นผิวของเส้นใยในโครมเล็งเซลล์



รูปที่ 4-2 รูปถ่าย SEM แบบภาคตัดขวางของเส้นใยในโครมเล็งเซลล์ (a) โครมเล็งเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบตาราง: nPBS-g (a11-a13), 6:4PBS-g (a21-a23), 5:5PBS-g (a31-a33) และ 4:6PBS-g (a41-a43) และ (b) โครมเล็งเซลล์ที่มีรูปแบบ Lay-down patterns แบบสามเหลี่ยม: nPBS-t (b11-b13), 6:4PBS-t (b21-b23), 5:5PBS-t (b31-b33) และ 4:6PBS-t (b41-

b43) โดยมีกำลังขยายของรูปในแถวที่หนึ่งกับแถวที่สองอยู่ที่ 100x แถวที่สามกับแถวที่ห้าอยู่ที่ 300x และแถวที่สามกับแถวที่หกอยู่ที่ 1500x

การศึกษาลักษณะภาคตัดขวางของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค SEM ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลือ และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกันไป ปรากฏดังรูปที่ 4-2 จะเห็นได้ว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลือ (คอลัมน์ที่ 1) และโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน (คอลัมน์ที่ 2-4) มีลักษณะคล้ายกับที่ปรากฏบนบริเวณพื้นผิวของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4-1) เมื่อพิจารณาภายในเส้นใยของโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน (แถวที่ 3 และแถวที่ 6 คอลัมน์ที่ 2-4) จำนวนและขนาดของรูพรุนในภาคตัดขวางของเส้นใยมีจำนวนมากและขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับจำนวนและขนาดของรูพรุนที่ปรากฏบริเวณพื้นผิวของเส้นใย โดยมีขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วง 7-70 ไมโครเมตร สะท้อนให้เห็นว่าอนุภาคของเกลือมีแนวโน้มที่จะกระจายตัวอยู่ภายในมากกว่าที่พื้นผิวของเส้นใย อีกทั้งเมื่อมีการเพิ่มปริมาณเกลือ ปริมาตรรูพรุนภายในเส้นใยก็มากขึ้น การที่มีรูพรุนมากขึ้นทั้งที่พื้นผิวและภายในเส้นใยส่งผลให้มีพื้นที่ที่สามารถดูดซับตัวยวาระหว่างกระบวนการบรรจุยาได้มากขึ้นตามไปด้วย [100] โดยโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนสูตร 4:6PBS (คอลัมน์ที่ 4) มีปริมาณรูพรุนภายในเส้นใยมากที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอื่น นอกจากนี้เมื่อพิจารณาที่ขนาดของรูพรุนภายในเส้นใยพบว่ารูพรุนที่มีขนาดใหญ่มีจำนวนมากขึ้นเมื่อปริมาณเกลือมากขึ้น และภายในรูพรุนขนาดใหญ่จะสามารถสังเกตเห็นรูพรุนขนาดเล็กได้ จึงพอสรุปได้ว่าเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น แนวโน้มที่จะมีรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน (Interconnected pores) ภายในก็มากขึ้น และด้วยโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบสามมิติ จะเกิดช่องว่างระหว่างเส้นใย (แถวที่ 1 และ แถวที่ 3) ซึ่งช่องว่างเหล่านี้จะเปรียบเสมือนเป็นรูที่เชื่อมต่อกันภายในของโครงเลี้ยงเซลล์ อย่างไรก็ตามรูปแบบ Lay-down patterns ไม่ส่งผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาบริเวณภาคตัดขวางของเส้นใยเช่นเดียวกับบริเวณพื้นผิวของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์

#### 4.3 การศึกษาความเป็นรูพรุนด้วยเทคนิคการหาค่าความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity determination technique)

การศึกษาความเป็นรูพรุนด้วยเทคนิคการหาค่าความถ่วงจำเพาะจะทำการทดสอบโดยการนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 30x30x2 มิลลิเมตรและมีโครงสร้าง Lay-down patterns สองรูปแบบ คือแบบตารางและแบบสามเหลี่ยมมาวางลงในแพนซิ่งที่แช่ในน้ำกลั่นเพื่อวัดน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับการชั่งโครงเลี้ยงเซลล์ในอากาศ โครงเลี้ยงเซลล์ที่จมอยู่ในของเหลวจะถูกกระทำด้วยแรงลอยตัว (Buoyancy force) เมื่อนำหลักการของอาร์คิมิดีสมาประกอบ แรงลอยตัวนี้จะเท่ากับน้ำหนักของของเหลวที่ถูกแทนที่ด้วยปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ เรียกแทนแรงนี้ว่า

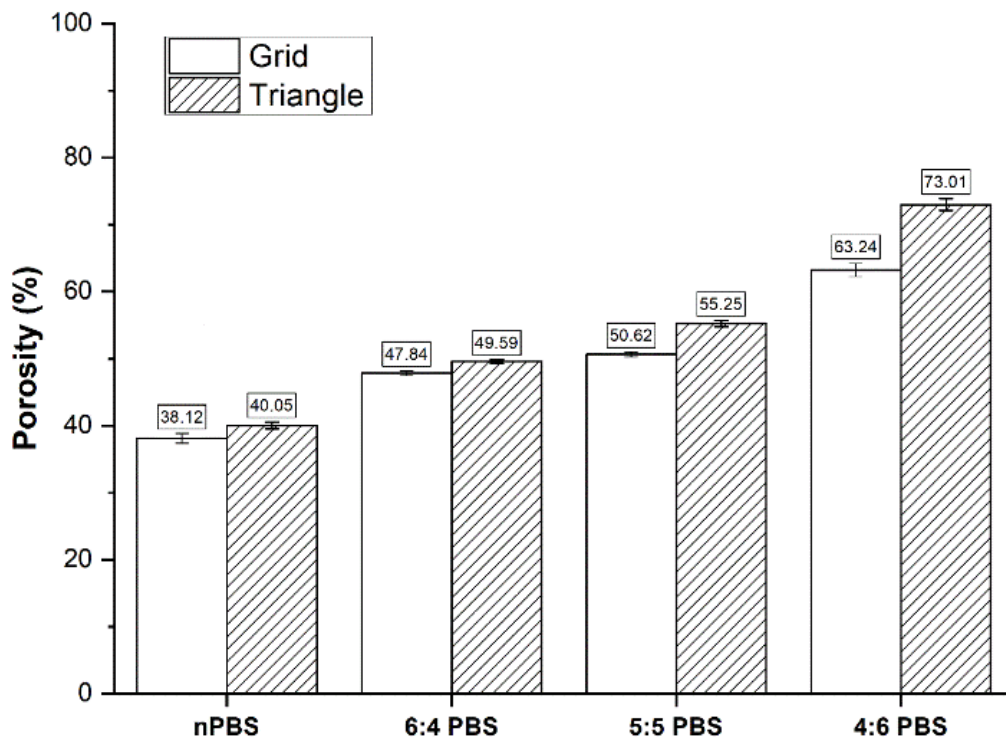


Weight in water ( $W_{in\ water}$ ) แล้วทำการคำนวณค่าความถ่วงจำเพาะ ( $\rho$ ) และร้อยละปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร จะได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-1 และรูปที่ 4-3

ตารางที่ 4-1 ร้อยละความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน

Sample	Porosity (%)
nPBS-g	38.12±0.73 <sup>a</sup>
6:4PBS-g	47.84±0.35 <sup>c</sup>
5:5PBS-g	50.62±0.37 <sup>d</sup>
4:6PBS-g	63.24±0.97 <sup>f</sup>
nPBS-t	40.05±0.50 <sup>b</sup>
6:4PBS-t	49.59±0.29 <sup>d</sup>
5:5PBS-t	55.25±0.44 <sup>e</sup>
4:6PBS-t	73.01±0.89 <sup>g</sup>

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 4-3 ร้อยละความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน

จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลือ (nPBS) อยู่ที่ 38.12% สำหรับ Pattern แบบตาราง และ 40.05% สำหรับ Pattern แบบสามเหลี่ยม รูพรุนนี้เกิดจากช่องว่างระหว่างเส้นใย (Void space) ของโครงเลี้ยงเซลล์ ในทางกลับกันโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนทุกสูตรแสดงปริมาณรูพรุนรวมที่มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากผลของเกลือ อีกทั้งปริมาณรูพรุนจะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนเกลือเพิ่มขึ้น สาเหตุเพราะปริมาณเกลือที่มากขึ้น ก็ จะครอบครองพื้นที่ภายในเส้นใยมากขึ้น และเมื่อเกลือถูกชะออกไปด้วยน้ำไร้ประจุก็ทำให้เกิดรูพรุน เพิ่มขึ้น ที่น่าสนใจคือเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ Lay-down pattern โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลือพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีปริมาณรูพรุนมากกว่าของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบตารางอย่างมีนัยสำคัญ บ่งบอกว่า ปริมาตรช่องว่างระหว่างเส้นใยของ Lay-down pattern ทั้งสองแบบนี้แตกต่างกันอันเนื่องมาจากการจัดเรียงโครงสร้างของเส้นใยที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับข้อมูลทางทฤษฎีที่พื้นที่ช่องว่างระหว่างเส้นใยของ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม (7.296 ตารางเซนติเมตรต่อ 1 ชั้น) จะมีค่ามากกว่า Lay-down pattern แบบตาราง (6.476 ตารางเซนติเมตรต่อ 1 ชั้น) สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนพบว่าสูตรที่มีปริมาณเกลือมากขึ้นก็จะมีค่าความแตกต่างของปริมาณรูพรุนระหว่างสอง Lay-down pattern เพิ่มมากขึ้นด้วย ที่เป็นเช่นนี้เพราะ (1) ในการออกแบบการขึ้นรูปด้วยเครื่อง 3D printing เมื่อกำหนดให้ใช้ค่า Infill เท่ากันที่ 80% ในทางทฤษฎี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะใช้ปริมาณวัสดุในการขึ้นรูปมากกว่า Lay-down pattern แบบตารางเนื่องจากรูปแบบการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีปริมาณเกลือภายในเส้นใยมากกว่า Lay-down pattern แบบตาราง ดังนั้นเมื่อสัดส่วนเกลือที่เติมลงไปในแต่ละสูตรเพิ่มขึ้น ความแตกต่างของปริมาณเกลือระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสอง Lay-down pattern ก็ ยิ่งเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณรูพรุนยังมีความแตกต่างมากขึ้น และ (2) ในขั้นตอนการชะล้างเกลือ ออก โครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มีรูพรุนปริมาณมากอันเนื่องมาจากปริมาณเกลือที่มากนั้น จะทำให้น้ำไร้ประจุสามารถแพร่เข้าไปได้ง่ายกว่าสูตรที่มีปริมาณรูพรุนน้อยกว่าหรือไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกลือ จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถชะล้างเกลือออกมาได้มากกว่า จากสองปัจจัยดังกล่าวจึงน่าจะส่งผลให้ความแตกต่างของปริมาณรูพรุนระหว่างสอง Lay-down pattern เพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น

#### 4.4 การศึกษาความชอบน้ำด้วยการวัดมุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle measurement)

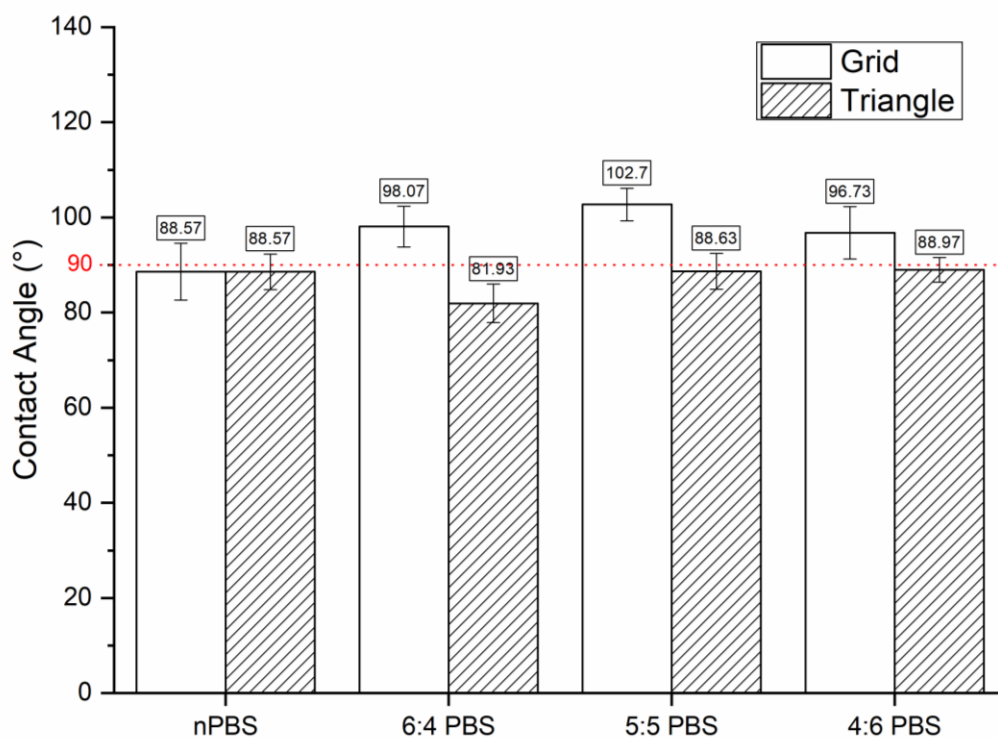
การศึกษาความชอบน้ำด้วยการวัดมุมสัมผัสน้ำจะทำการทดสอบโดยการนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 30x30x2 มิลลิเมตรและมีโครงสร้าง Lay-down patterns สองรูปแบบ คือแบบตารางและแบบสามเหลี่ยม มาวางลงบนฐานของ Axis Feed Auger Stage แล้วถ่ายรูป

ขณะที่หยดน้ำกลั่นลงบริเวณกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ แล้ววัดค่ามุมสัมผัสน้ำจากรูปถ่ายที่ได้ โดยค่ามุมสัมผัสน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่างๆ แสดงในตารางที่ 4-2 และรูปที่ 4-4 สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS พบว่าไม่มีความแตกต่างของค่ามุมสัมผัสน้ำเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Lay-down pattern ที่แตกต่างกัน โดยมีค่ามุมสัมผัสน้ำอยู่ที่ 88.57 องศา แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์สูตรพบว่าโดยภาพรวมมีค่ามุมสัมผัสน้ำสูงขึ้นและมีความแตกต่างของค่ามุมสัมผัสน้ำอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Lay-down pattern ทั้งสองรูปแบบ เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสูตรที่เกิดการชะล้างเกลือส่งผลให้ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยโครงเลี้ยงเซลล์มีความขรุขระมากขึ้น เมื่อหยดน้ำลงบนพื้นผิวขรุขระนี้จะส่งผลให้เกิดสถานะที่เป็นไปได้สองรูปแบบคือ (1) สถานะที่หยดน้ำสัมผัสกับส่วนที่สูงกว่าของพื้นผิวขรุขระนั้นและกักอากาศไว้ภายในบริเวณส่วนที่ต่ำกว่า เรียกสถานะนี้ว่า Cassie state หรือ (2) สถานะที่หยดน้ำมีการซึม (Impregnate) ลงไปในช่องว่างอันเกิดจากความขรุขระของพื้นผิวนั้น เรียกสถานะนี้ว่า Wenzel state ซึ่งทั้งสองสถานะนี้ส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสน้ำปรากฏ (Apparent contact angle) มีค่าสูงขึ้น [101] และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Lay-down pattern ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรทุกสูตรที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมมีค่ามุมสัมผัสน้ำน้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรทุกสูตรที่มี Lay-down pattern แบบตารางอย่างมีนัยสำคัญ สาเหตุเพราะช่องว่างระหว่างเส้นใยที่มีมากกว่าของ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมส่งผลให้แรงโน้มถ่วงมีอิทธิพลต่อหยดน้ำมากขึ้น (เกิด Capillary effect มากขึ้น) กลายเป็นอีกแรงหนึ่งที่มาช่วยเสริมแรงยึดติดระหว่างผิวหยดน้ำกับผิวเส้นใย (Adhesive force) ที่แข่งขันกันกับแรงเชื่อมแน่นระหว่างโมเลกุลของหยดน้ำ (Cohesive force) ด้วยกันที่จะคงสภาพหยดน้ำไว้เป็นทรงกลม [102] ทำให้การแข่งขันกันของแรงต่าง ๆ เหล่านี้โน้มเอียงไปทางแรงยึดติดของผิวหยดน้ำกับผิวเส้นใยมากขึ้น ค่ามุมสัมผัสน้ำจึงลดลง

**ตารางที่ 4-2** ค่ามุมสัมผัสน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลือและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน

Sample	Contact angle (°)
nPBS-g	88.57±5.96 <sup>ab</sup>
6:4PBS-g	98.07±4.26 <sup>c</sup>
5:5PBS-g	102.70±3.42 <sup>c</sup>
4:6PBS-g	96.73±5.51 <sup>ac</sup>
nPBS-t	88.57±3.73 <sup>ab</sup>
6:4PBS-t	81.93±4.05 <sup>b</sup>
5:5PBS-t	88.63±3.77 <sup>ab</sup>
4:6PBS-t	88.97±2.58 <sup>ab</sup>

\*หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 4-4 ค่ามุมสัมผัสน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกลียวและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน

#### 4.5 การศึกษาสมบัติเชิงกลด้วยการทดสอบแรงดัดงอ (Flexural testing)

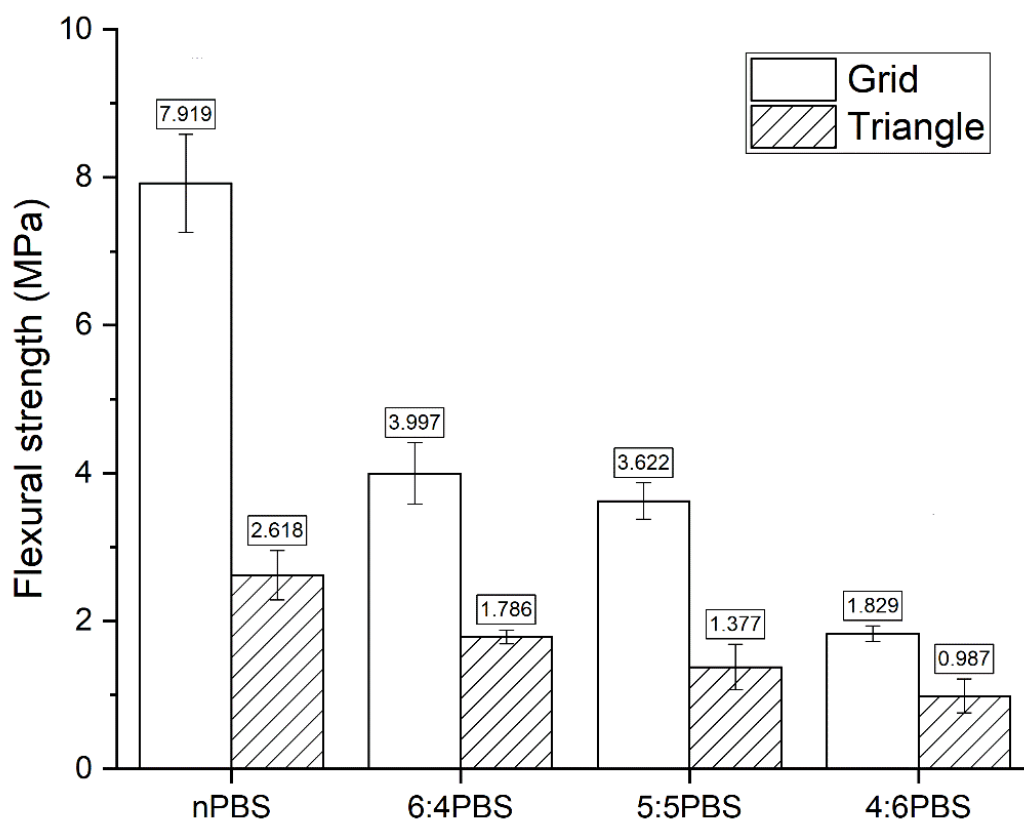
การศึกษาสมบัติเชิงกลด้วยการทดสอบแรงดัดงอจะทำการทดสอบโดยการนำโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มสำหรับทดสอบสมบัติเชิงกลที่ออกแบบรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 12.7x127x2 มิลลิเมตร และมีโครงสร้าง Lay-down patterns สองรูปแบบคือแบบตารางและแบบสามเหลี่ยม มาทดสอบแรงดัดงอด้วยวิธีการทดสอบดัดงอแบบสามจุด ในงานวิจัยนี้จะพิจารณาจากสองสมบัติคือ (1) ความแข็งแรงต่อการดัดงอ (Flexural strength) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความสามารถในการรับแรงดัดงอสูงสุด หรือระดับความเค้นดัดงอสูงสุด (Maximum flexural stress) โดยแรงที่เกิดขึ้นในการทดสอบนี้ ประกอบไปด้วยทั้งแรงดึง (Tensile force) และแรงกดอัด (Compression force) หากวัสดุมีค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอมาก หมายถึงวัสดุนั้นจะสามารถรับแรงดัดงอก่อนเกิดการแตกหักมากกว่า ชิ้นงานที่มีค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอน้อยกว่า และ (2) ค่ามอดูลัสการดัดงอ (Flexural modulus) เป็นค่าที่ใช้บอกความแกร่ง (Stiffness) ของวัสดุซึ่งได้จากการศึกษาพฤติกรรมช่วงยืดหยุ่นระหว่าง

ความเค้นและความเครียดที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับแรงดัดงอ จากผลการทดสอบจะได้ค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอ (Flexural strength) และค่ามอดูลัสการดัดงอ (Flexural modulus) ของโครงเหล็กเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกล็ดและรูปแบบ Lay-down pattern แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 4-3 รูปที่ 4-5 และ รูปที่ 4-6 ตามลำดับ พบว่าโครงเหล็กเซลล์สูตร nPBS ที่ไม่มีรูพรุนอันเนื่องมาจากเกล็ดเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเหล็กเซลล์รูพรุนจะมีทั้งความแข็งแรงต่อการดัดงอและมอดูลัสการดัดงอมากกว่า ในทั้งสอง Lay-down pattern และโครงเหล็กเซลล์สูตร nPBS ที่มี Lay-down pattern แบบตารางจะมีค่าสมบัติเชิงกลทั้งสองชนิดนี้มากกว่าโครงเหล็กเซลล์สูตร nPBS ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมอย่างมาก เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะลักษณะของ Lay-down pattern ที่แตกต่างกันอันทำให้มีพื้นที่ช่องว่างระหว่างเส้นใยแตกต่างกัน (12.489 ตารางเซนติเมตรต่อ 1 ชั้น สำหรับ Lay-down pattern แบบตาราง และ 14.016 ตารางเซนติเมตรต่อ 1 ชั้น สำหรับ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม) ส่งผลให้ความสามารถในการรับแรงและทิศทางการกระจายแรงแตกต่างกัน ลักษณะ Lay-down pattern แบบตารางที่ทำมุม 90 องศาจะสามารถกระจายแรงที่เกิดขึ้นขณะทดสอบทั้งแรงกดอัด (Compression) และแรงดึงยึด (Tension) ได้ดีกว่า Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมที่ทำมุม 60 องศา อีกทั้ง Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมมีช่องว่างระหว่างเส้นใย (Void space) ที่ใหญ่กว่าทำให้โครงสร้างมีความยืดหยุ่นมากกว่าด้วย เมื่อพิจารณาโครงเหล็กเซลล์รูพรุนพบว่าสมบัติเชิงกลทั้งสองชนิดนี้จะมีค่าลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออัตราส่วนเกล็ดเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่าน้อยที่สุดในโครงเหล็กเซลล์สูตร 4:6PBS ที่มีอัตราส่วนเกล็ดมากที่สุด ผลการทดสอบนี้เป็นไปตามแนวโน้มที่พบได้ในหลายงานวิจัย [103, 104] คือเมื่อปริมาณรูพรุนเพิ่มขึ้นนั้นหมายถึงปริมาณเนื้อพลาสติกภายในโครงเหล็กเซลล์จะลดลงตามไปด้วย ทำให้โครงเหล็กเซลล์ที่มีรูพรุนมากกว่ารับแรงดัดงอได้น้อยกว่า และส่งผลให้เกิดการแตกหักของชิ้นงานได้ง่ายกว่า [105] ดังนั้นทั้งความแข็งแรงและความแกร่งของโครงเหล็กเซลล์สูตร 4:6PBS จึงน้อยที่สุดจากการที่มีรูพรุนมากที่สุดในทางกลับกันก็สามารถดัดงอให้โค้งไปตามพื้นผิวได้ง่ายที่สุดหากนำไปใช้งานที่ต้องการความยืดหยุ่น นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปัจจัยความแตกต่างของ Lay-down pattern ของโครงเหล็กเซลล์รูพรุนที่อัตราส่วนเกล็ดเดียวกันพบว่าทั้งค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอและค่ามอดูลัสการดัดงอของ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความแตกต่างนี้ก็มีช่วงความแตกต่างที่ลดลงเมื่อปริมาณเกล็ดเพิ่มขึ้น บ่งชี้ว่ายังมีปริมาณรูพรุนภายในเนื้อเส้นใยโครงเหล็กเซลล์มากขึ้น อิทธิพลของลักษณะทางสถาปัตยกรรมของโครงเหล็กเซลล์ที่มีต่อสมบัติเชิงกลยิ่งลดลง ที่น่าสนใจคือที่ระยะการดัดงอ 5% strain ซึ่งเป็นระยะความเครียดสูงสุดที่กำหนดในการทดสอบโครงเหล็กเซลล์สูตร 4:6PBS ยังสามารถคงสภาพของโครงเหล็กเซลล์ไว้ในช่วงยืดหยุ่น (Elastic deformation) ได้ โดยไม่เกิดการเสียรูปอย่างถาวรหรือเกิดการแตกหัก แสดงดังภาคผนวก ข.

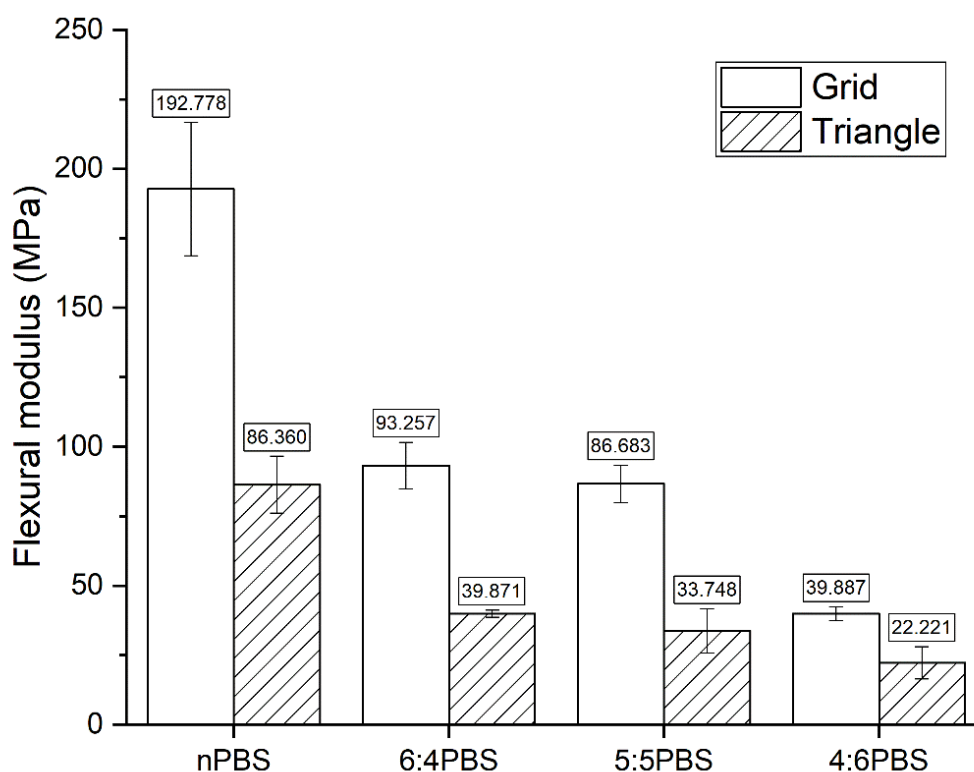
ตารางที่ 4-3 ค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอและมอดูลัสต่อการดัดงอของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกล็ดและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน

Sample	Flexural strength (MPa)	Flexural modulus (MPa)
nPBS-g	7.92±0.66 <sup>a</sup>	192.78±24.02 <sup>a</sup>
6:4PBS-g	4.00±0.41 <sup>c</sup>	93.26±8.35 <sup>b</sup>
5:5PBS-g	3.62±0.25 <sup>c</sup>	86.68±6.75 <sup>b</sup>
4:6PBS-g	1.83±0.10 <sup>d</sup>	39.89±2.53 <sup>c</sup>
nPBS-t	2.62±0.33 <sup>b</sup>	86.36±10.23 <sup>b</sup>
6:4PBS-t	1.79±0.09 <sup>d</sup>	39.87±1.24 <sup>c</sup>
5:5PBS-t	1.38±0.31 <sup>de</sup>	33.75±7.93 <sup>c</sup>
4:6PBS-t	0.99±0.23 <sup>e</sup>	22.22±5.82 <sup>c</sup>

\*หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



รูปที่ 4-5 ค่าความแข็งแรงต่อการดัดงอของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกล็ดและรูปแบบ Lay-down patterns แตกต่างกัน



รูปที่ 4-6 ค่าโมดูลัสการดัดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนเกล็ดและรูปแบบ lay-down patterns แตกต่างกัน

## ตอนที่ 2 การทดสอบการปลดปล่อยยา

### 4.6 การทดสอบการปลดปล่อยยา

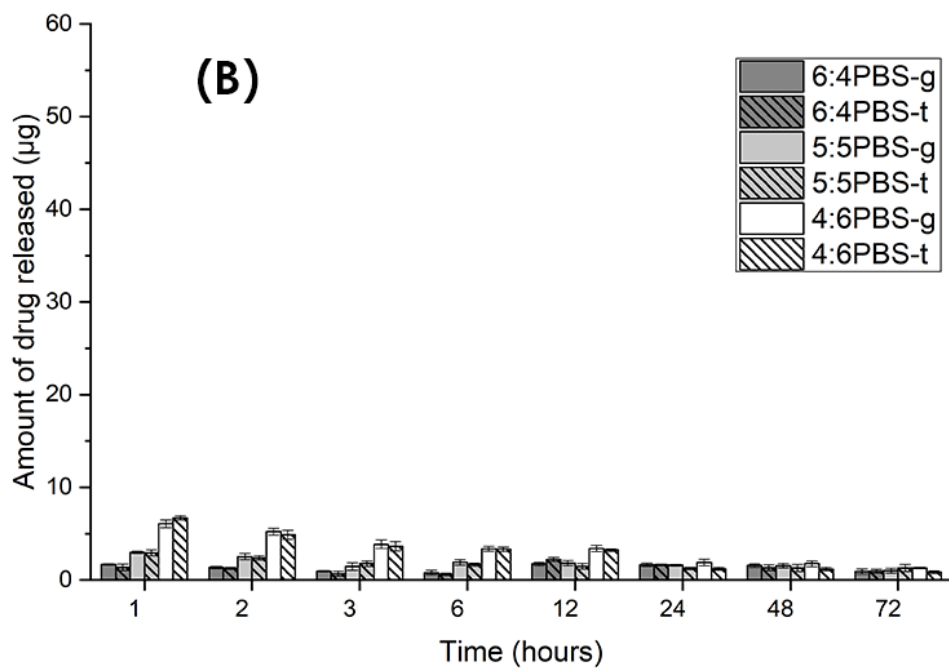
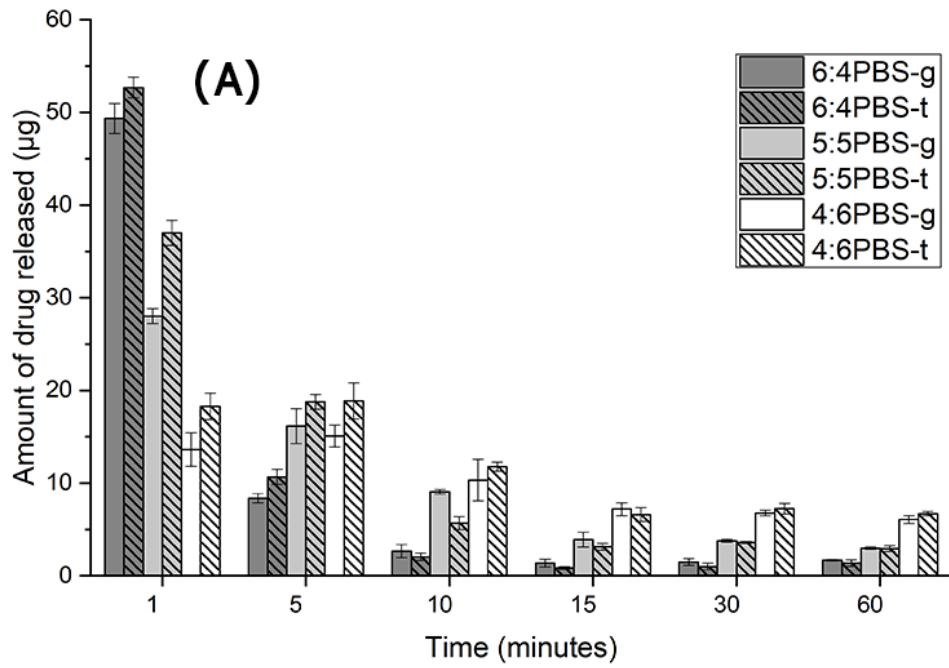
นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่บรรจุยาแล้วด้วยเทคนิคการหดยาสารละลายที่ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ที่มีปริมาณยาเท่ากับ 3350 ppm มาทดสอบการปลดปล่อยยาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน โดยจะทำการศึกษาจนกระทั่งอัตราการปลดปล่อยยาเข้าสู่สมดุล บันทึกผลการทดสอบเป็นสองรูปแบบ คือแบบแสดงปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยในแต่ละช่วงเวลาแสดงดังรูปที่ 4-7 และแบบแสดงร้อยละปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสมในแต่ละช่วงเวลา แสดงดังรูปที่ 4-8 จากผลการทดสอบการปลดปล่อยยา แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการปลดปล่อยยาเซฟาโซลินของโครงเลี้ยงเซลล์รูปทรงแปดเหลี่ยมต่าง ๆ เมื่อพิจารณาปัจจัยของอัตราส่วนเกล็ดที่ส่งผลต่ออัตราการปลดปล่อยยาเซฟาโซลิน จากปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยในช่วง 1 นาทีแรก แสดงดังรูปที่ 4-7(A) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 6:4PBS มีการปลดปล่อยยามากที่สุด รองลงมาคือสูตร 5:5PBS และสูตร 4:6PBS ตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป การปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือสูตร 5:5PBS

และสูตร 6:4PBS ตามลำดับ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบตารางที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสูตร 4:6PBS-g มีการปลดปล่อยยา 6.0671  $\mu\text{g}$  ลดลง 55.41% เมื่อเทียบกับการปลดปล่อยยาที่ 1 นาทีแรก ในขณะที่สูตร 5:5PBS-g และ 6:4PBS-g มีการปลดปล่อยยา 2.9689  $\mu\text{g}$  และ 1.6704  $\mu\text{g}$  ลดลง 89.40% และ 96.61% ตามลำดับเมื่อเทียบกับการปลดปล่อยยาที่ 1 นาทีแรก ซึ่งแนวโน้มนี้เกิดขึ้นกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าสูตร 6:4PBS มีการปลดปล่อยยาในช่วงต้นมากที่สุด เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้น (Initial burst release) ในขณะที่สูตร 4:6PBS มีการลดลงของอัตราการปลดปล่อยยาเมื่อเวลาผ่านไปน้อยที่สุด หรือกล่าวได้ว่ามีอัตราการปลดปล่อยยาที่ค่อนข้างมีความสม่ำเสมอมากที่สุด สอดคล้องกับกราฟร้อยละปริมาณยาปลดปล่อยสะสมในช่วงระยะเวลา 1 ชั่วโมงแรก (รูปที่ 4-8(A)) ที่สูตร 6:4PBS ทั้งสอง Lay-down pattern จะมีความชันของกราฟมากที่สุด ในขณะที่สูตร 4:6PBS ทั้งสอง Lay-down pattern จะมีความชันของกราฟน้อยที่สุด และเมื่อระยะเวลาในการปลดปล่อยยาผ่านไป 1 วัน แสดงดังรูปที่ 4-7(B) และรูปที่ 4-8(B) พบว่าการปลดปล่อยยาของทุกสูตรมีอัตราที่ใกล้เคียงกันและเริ่มเข้าสู่สมดุล (ความชันของกราฟลดลงจนขนานกับแกน x)

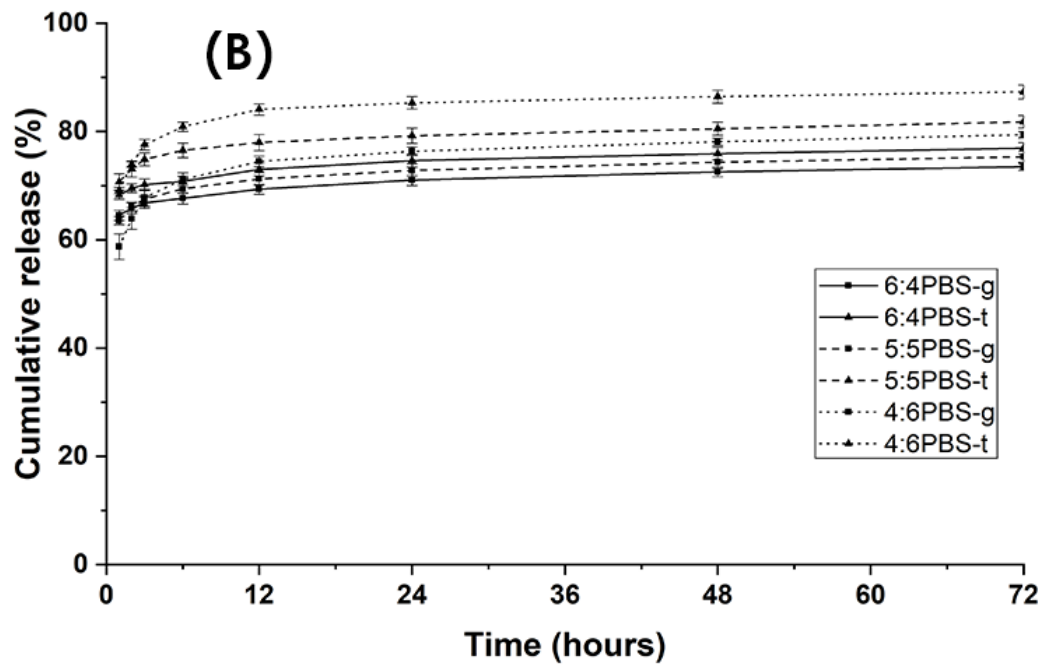
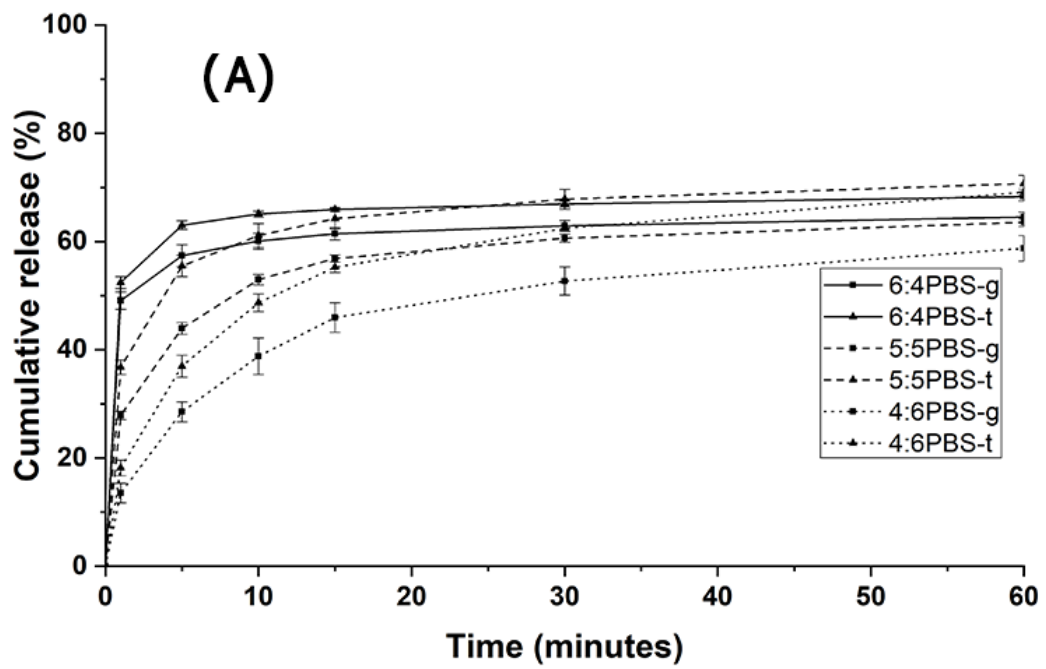
หากพิจารณาปัจจัยของ Lay-down pattern ที่มีต่อการปลดปล่อยยาเซฟาโซลิน โดยเปรียบเทียบระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มี Lay-down pattern แบบตารางกับแบบสามเหลี่ยม จากรูปที่ 4-8 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีร้อยละการปลดปล่อยยาสะสมมากกว่าแบบตารางในทุกอัตราส่วนเกลือ โดยเมื่อระยะเวลาการปลดปล่อยยานานขึ้น จะสังเกตเห็นว่าการปลดปล่อยยาของสอง Lay-down pattern ในแต่ละอัตราส่วนเกลือจะมีความแตกต่างของปริมาณการปลดปล่อยลดลงจนกระทั่งเข้าสู่สมดุลตั้งแต่เวลาการปลดปล่อยที่ 24 ชั่วโมง และโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t มีปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสมทั้งหมดเมื่อเข้าสู่สมดุลแล้วมากที่สุด มีอัตราการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นน้อยที่สุด และมีความสม่ำเสมอของอัตราการปลดปล่อยยาตลอดการทดสอบมากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตรอื่น ที่เป็นเช่นนี้เพราะโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t เป็นสูตรที่มีปริมาณรูพรุนมากที่สุด และมีลักษณะ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม จากผลการทดสอบสมบัติทางกายภาพบ่งชี้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณรูพรุนมากกว่า จะมีพื้นที่สำหรับรองรับการดูดซับตัวยามากกว่า อีกทั้ง Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมมีความชอบน้ำที่มากกว่า จะมีแนวโน้มที่ตัวยาคือจะซึมผ่านและถูกกักเก็บไว้ในโครงเลี้ยงเซลล์บริเวณรูพรุนภายในได้มากขึ้น ปริมาณตัวยานี้ที่ถูกดูดซับอยู่บนผิวเส้นใยมีแนวโน้มที่จะน้อยลง ดังนั้นเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกนำไปแช่ในสารตัวกลางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินแล้วเริ่มต้นการปลดปล่อยยา ตัวยานี้ที่ยึดเกาะอยู่บริเวณผิวที่จะแพร่ออกมาก่อนก็มีปริมาณลดลงตามไปด้วย ซึ่งการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นนั้นจะเกิดจากการที่ตัวยานี้ที่ถูกดูดซับอยู่บริเวณผิวของเส้นใย



เกิดการแพร่ออกมาอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการปลดปล่อยยานั่นเอง ดังนั้นเมื่อปริมาณตัวยานผิวเส้นใยลดลง การปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นก็ลดลง [106] อีกทั้งตัวยาที่ถูกดูดซับอยู่บริเวณพื้นผิวของรูพรุนภายในของโครงเลี้ยงเซลล์นั้นจะใช้เวลาในการถูกชะและเคลื่อนที่ออกมาภายนอกโครงเลี้ยงเซลล์นานกว่าตัวยาที่ถูกดูดซับอยู่บริเวณพื้นผิวภายนอกของเส้นใยในโครงเลี้ยงเซลล์ [107] ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t จึงช่วยลดการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นและสามารถรักษาระดับความเข้มข้นของยาที่ถูกปลดปล่อยเมื่อเวลาผ่านไปให้ลดลงอย่างช้า ๆ ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตรอื่น ๆ โดยทั่วไปแล้วการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้น ถือเป็นพฤติกรรมที่ไม่พึงประสงค์สำหรับวัสดุที่จะใช้เป็น Controlled-release system เพราะการนำส่งยาด้วยวิธีการนี้ออกแบบมาสำหรับการรักษาที่ต้องการให้ตัวยากถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงเลี้ยงเซลล์อย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง ดังนั้นการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นจะเพิ่มความเสี่ยงที่ตัวยาจะถูกปลดปล่อยมากเกินไป (Overdose) ได้ อย่างไรก็ตาม หากสามารถควบคุมปริมาณยาสูงสุดที่จะถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้น ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการรักษา (Therapeutic window) ได้ การปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นก็มีประโยชน์ในการรักษาสำหรับกรณีของการใช้ยาเซฟาโซลินเช่นกัน จากงานวิจัยระบุว่าหลังจากที่ให้ตัวยาเซฟาโซลินจำนวน 1 โดสเข้าสู่บริเวณแผลผ่าตัดโดยตรงเพื่อป้องกันการติดเชื้อหลังการผ่าตัดนั้น พบว่าในช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแรกที่มีความเข้มข้นตัวยา 24 ppm จะให้ผลการรักษาที่ดีที่สุด กล่าวคือความเข้มข้นนี้มากเพียงพอที่ทำให้แบคทีเรีย *S. aureus* ตาย 90% (ความเข้มข้นของยาที่มากกว่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ 90% หรือเรียกว่า above MIC90) [108] ซึ่งนับเป็นอีกหนึ่งข้อดีของการใช้โครงเลี้ยงเซลล์บรรจุยาในการรักษา จากเหตุผลดังกล่าวมาทั้งหมด ล้วนบ่งชี้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t เป็นสูตรที่น่าจะมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้เป็นตัวนำส่งยาของงานวิจัยนี้



รูปที่ 4-7 ปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยในแต่ละช่วงเวลา; (A) ตั้งแต่ 1 นาที จนถึง 60 นาที และ (B) ตั้งแต่ 1 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4-8 ร้อยละปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสมในแต่ละช่วงเวลา; (A) ตั้งแต่ 1 นาที จนถึง 60 นาที และ (B) ตั้งแต่ 1 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมง

### ตอนที่ 3 การทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

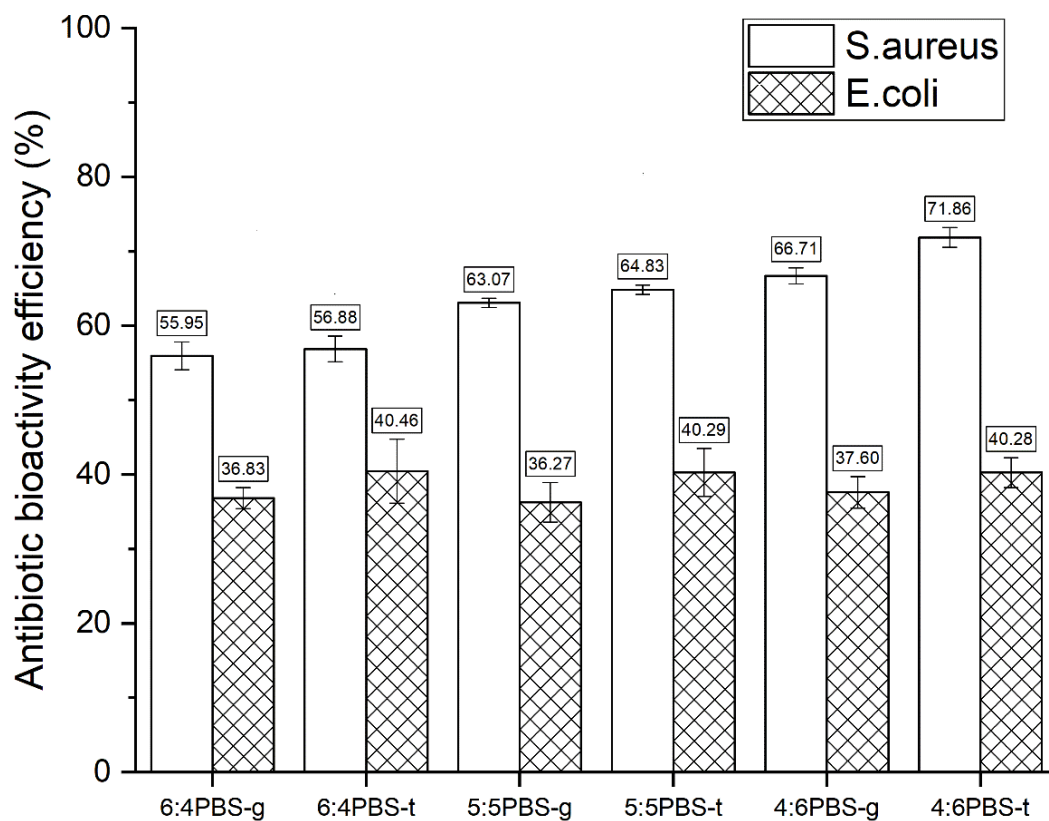
#### 4.7 การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย Dynamic shake flask method

การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ด้วย Dynamic shake flask method แบบดรอปเพลต เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียในเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ที่ช่วยให้สามารถวิเคราะห์และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการทางสถิติได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 4-4 และรูปที่ 4-9

**ตารางที่ 4-4** ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ที่พบบนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ แห่อยู่

<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
Sample	Antibiotic bioactivity efficiency (%)	Sample	Antibiotic bioactivity efficiency (%)
nPBS-g	0.00 ± 0.00	nPBS-g	0.00 ± 0.00
6:4PBS-g	55.95 ± 1.89 <sup>a</sup>	6:4PBS-g	36.83 ± 1.43 <sup>a</sup>
5:5PBS-g	63.07 ± 0.61 <sup>b</sup>	5:5PBS-g	36.27 ± 2.68 <sup>a</sup>
4:6PBS-g	66.71 ± 1.07 <sup>b</sup>	4:6PBS-g	37.60 ± 2.12 <sup>a</sup>
nPBS-t	0.00 ± 0.00	nPBS-t	0.00 ± 0.00
6:4PBS-t	56.88 ± 1.73 <sup>a</sup>	6:4PBS-t	40.46 ± 4.30 <sup>a</sup>
5:5PBS-t	64.83 ± 0.64 <sup>b</sup>	5:5PBS-t	40.29 ± 3.20 <sup>a</sup>
4:6PBS-t	71.86 ± 1.33 <sup>c</sup>	4:6PBS-t	40.28 ± 2.00 <sup>a</sup>

\*หมายเหตุ : 1) โครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS จะไม่มีการบรรจุยา ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม  
2) ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่ต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

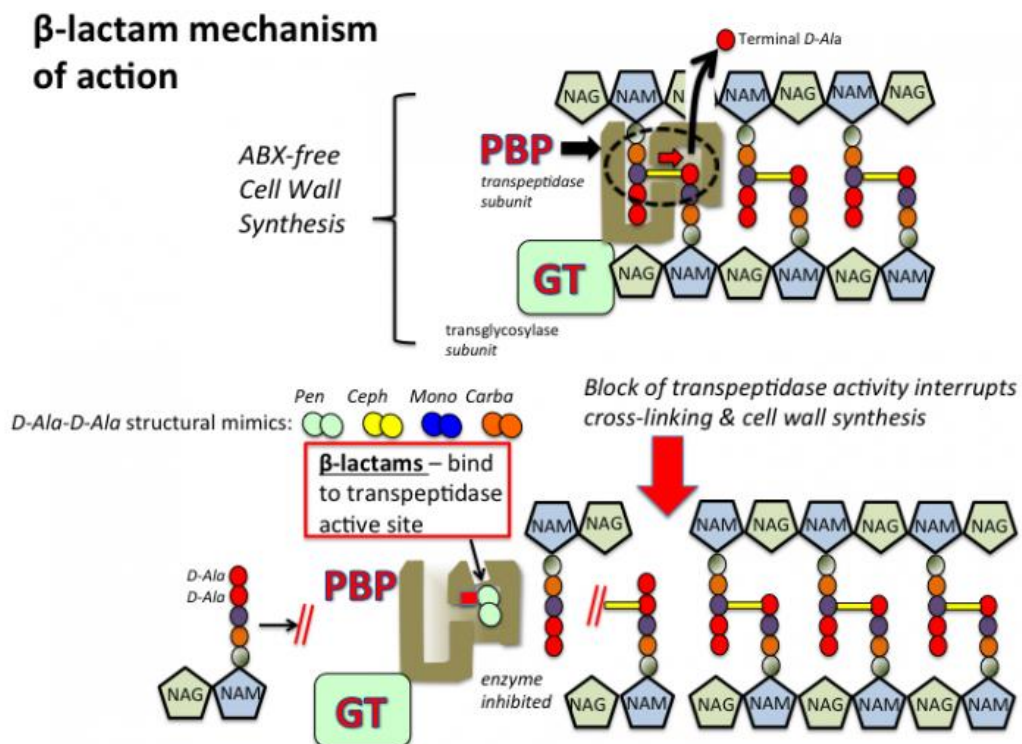


รูปที่ 4-9 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ที่พบบนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ แห่อยู่

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 6:4PBS 5:5PBS และ 4:6PBS ที่มี Lay-down pattern แบบตารางคือ 55.95% 63.07% และ 66.71% ตามลำดับ ส่วน Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียอยู่ที่ 56.88% 64.83% และ 71.86% ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่บรรจุยา 4:6PBS-t เป็นสูตรที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มากที่สุด สอดคล้องกับผลการทดสอบอัตราการปลดปล่อยยาที่สูตร 4:6PBS-t จะมีปริมาณยาที่ปลดปล่อยสะสมเมื่อเริ่มเข้าสู่สมดุล (24 ชั่วโมง) มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ Lay-down pattern ต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรที่มี Lay-down pattern แบบตาราง เช่นเดียวกับอิทธิพลของปริมาณรพุนต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เมื่อปริมาณรพุนเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียก็เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการทดสอบการปลดปล่อยยาที่

Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมและปริมาณรูพรุนที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณยาถูกปลดปล่อยออกมามากขึ้น

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบของแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* พบว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 6:4PBS 5:5PBS และ 4:6PBS ที่ Lay-down pattern แบบตารางคือ 36.83% 36.27% และ 37.60% ตามลำดับ ส่วน Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมอยู่ที่ 40.46% 40.29% และ 40.28% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ของโครงเลี้ยงเซลล์บรรจุยานี้มีค่าที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละรูปแบบของ Lay-down pattern รวมถึงปริมาณรูพรุนก็ไม่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ด้วย และมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่น้อยกว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะแบคทีเรีย *S. aureus* จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก กล่าวคือเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีชั้นของเพปติโดไกลแคน (Peptidoglycan layer) หรือผนังเซลล์หนา ในขณะที่ *E. coli* จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่มีผนังเซลล์บางกว่า [109] โดยกลไกการทำงานของตัวยาเซฟาโซลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนั้นเกิดจากการที่วงแหวน  $\beta$ -lactam ในโครงสร้างของเซฟาโซลินไปจับกับ Penicillin binding proteins หรือ PBPs ขัดขวางการเชื่อมขวางของพันธะเปปไทด์ *D-Alanine* ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียถูกรบกวนจนกระทั่งเซลล์ไม่สามารถคงรูปอยู่ได้ [110, 111] แสดงดังรูปที่ 4-10



รูปที่ 4-10 กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของวงแหวน  $\beta$ -lactam [111]

ซึ่งจากผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่พบว่ากลไกดังกล่าวของยาเซฟาโซลินนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* ได้น้อยกว่าแบคทีเรีย *S. aureus* สอดคล้องกับผลการวิจัยความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ในนมวัวสดของ D.E.C.Y.D. Dari และคณะ [112] และผลการวิจัยฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ของอนุภาคทองแดงระดับนาโนที่สังเคราะห์โดยกระบวนการทางกลศาสตร์เคมีของ S.M. Javadhesari และคณะ [113]

#### 4.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้มาจากตัวอ่อน (embryo) ของหนูด้วยเทคนิค MTT Assay นั้นเป็นการทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ทดสอบ (% Viability) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโครงสร้างเซลล์บรรจุยาเซฟาโซลินความเข้มข้นแตกต่างกัน ในการทดสอบนี้จะใช้โครงสร้างเซลล์สูตร 4:6PBS-t เป็นตัวแทนในการทดสอบ เนื่องจากเป็นโครงสร้างเซลล์สูตรที่มีปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสม ณ เวลาทดสอบ MTT assay (24 ชั่วโมง หลังบ่ม) มากที่สุดจากผลการทดสอบการปลดปล่อยยา ดังนั้นโครงสร้างเซลล์สูตร 4:6PBS-t จึงเป็นโครงสร้างเซลล์สูตรที่มีโอกาสจะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดหากตัวยาเซฟาโซลินที่ความเข้มข้นทดสอบนั้นเป็นพิษต่อเซลล์ โดยบรรจุยาเซฟาโซลินความเข้มข้น 0.4 1.5 6.25 25 100 และ 3350 ppm ตามลำดับ ลงในโครงสร้างเซลล์สูตร 4:6PBS-t ก่อนทำการทดสอบ ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 ถึง 100 ppm นั้นเป็นช่วงความเข้มข้นที่คาดว่าจะในการนำโครงสร้างเซลล์บรรจุยานี้ไปใช้ในการรักษา ความเข้มข้นของยาเซฟาโซลินที่ใช้จะอยู่ในช่วงความเข้มข้นนี้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพต่อการรักษาสูงสุด [108] ส่วนความเข้มข้น 3350 ppm เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบการปลดปล่อยยาของงานวิจัยนี้

**ตารางที่ 4-5** ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่ผ่านกระบวนการ MTT cytotoxicity assay

Sample	The average of	
	OD 570nm	Viability (%)
Blank	0.777	100.0
Negative control	0.780	100.0
Positive control	0.000	0.0
nPBS-t 0 ppm	0.716	92.2 <sup>a</sup>
4:6PBS-t 0.4 ppm	0.768	98.8 <sup>b</sup>

Sample	The average of	
	OD 570nm	Viability (%)
4:6PBS-t 1.5 ppm	0.754	97.2 <sup>ab</sup>
4:6PBS-t 6.25 ppm	0.763	98.3 <sup>b</sup>
4:6PBS-t 25 ppm	0.779	100.1 <sup>b</sup>
4:6PBS-t 100 ppm	0.779	100.2 <sup>b</sup>
4:6PBS-t 3350 ppm	0.000	0.0

\*หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast จากตารางที่ 4-5 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS (ไม่มียา) และของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t ที่บรรจุยาเซฟาโซลินความเข้มข้น 0.4 1.5 6.25 25 100 และ 3350 ppm ตามลำดับพบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าอยู่ที่ 92.2 98.8 97.2 98.3 100.1 100.2 และ 0 ตามลำดับเหตุที่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS-t และโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมเป็นตัวแทนในการทดสอบเพราะจากผลการทดสอบการปลดปล่อยยาโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t เป็นสูตรที่มีการปลดปล่อยยาสะสมสูงสุดในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นผลการทดสอบของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t นี้จะเป็นผลการทดสอบของเซลล์ที่ได้รับยาในปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์สูตรอื่น ๆ ในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ผลการทดสอบของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t 25 ppm และ 4:6PBS-t 100 ppm พบว่าร้อยละความอยู่รอดของเซลล์มีค่าเกิน 100 เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจจะเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาเคมีบางชนิดที่มีการปลดปล่อยพลังงานทำให้สาร MTT เปลี่ยนเป็น Formazan มากขึ้น [114] จากผลการทดสอบของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปจากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตไม่ได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากเซลล์มีความอยู่รอดถึง 92% สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t และพบว่าที่ปริมาณยาเซฟาโซลิน 0.4 ถึง 100 ppm ที่ระยะเวลาปลดปล่อยยาผ่านไป 24 ชั่วโมงจะมีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผลการทดสอบของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS ที่ไม่มีการบรรจุยา ส่วนผลการทดสอบที่ปริมาณยามาก ๆ คือ 3350 ppm อันเป็นปริมาณยาสูตรที่ใช้ทดสอบการปลดปล่อยยา พบว่าไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตรอดเหลืออยู่เลย อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลทางเภสัชวิทยาคลินิกของเซฟาโซลินจากการศึกษาการให้ยาเซฟาโซลินผ่านการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (Intravenous administration) แก่คนไข้ปริมาณ 2 กรัมต่อโดส โดสละ 10 มิลลิลิตร โดยฉีดหลังจากการผ่าตัดเสร็จ



สิ้นไปแล้ว 30 นาที (ปริมาณยาเซฟาโซลินมาตรฐานที่ฉีดให้แก่คนไข้เพื่อป้องกันการติดเชื้อหลังการผ่าตัดคือ 2 กรัมต่อโดส [115]) พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเซฟาโซลินสูงสุดที่วัดได้ในน้ำเลือด (Serum) คือ 24 ppm เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงและความเข้มข้นยานี้มากเพียงพอที่ทำให้แบคทีเรีย *S. aureus* ตาย 90% [108] ดังนั้นหากนำโครมเลียงเซลล์นี้ไปใช้กับคนไข้จริง ความเข้มข้นขั้นต่ำของยาเซฟาโซลินที่บรรจุลงในโครมเลียงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของการปลดปล่อยยาขั้นต่ำที่เหมาะสม (ใกล้เคียงกับปริมาณยาในน้ำเลือด) จะประมาณ 32.44 ppm โดยตัวเลขนี้ได้จากการนำผลการทดสอบการปลดปล่อยยาสะสมของโครมเลียงเซลล์สูตร 4:6PBS-t มาคำนวณกลับหาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา 24 ppm (แสดงตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวก จ.) ซึ่งจากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่นำมาทดสอบ ที่ความเข้มข้น 32.44 ppm ถือว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพราะอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่มีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80 จึงสรุปได้ว่า โครมเลียงเซลล์นี้เมื่อบรรจุยาในความเข้มข้นที่ให้ค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80 ซึ่งอยู่ในช่วงไม่เกิน 100 ppm แล้ว สามารถนำไปใช้กับร่างกายได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตโดยใช้เทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีดร่วมกับการชะล้างเกลือสำหรับนำมาใช้ในการนำส่งยาปฏิชีวนะเซฟาโซลิน โดยศึกษาผลของปริมาณเกลือและการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีต่อความเป็นรูพรุน สัณฐานวิทยา ความชอบน้ำ สมบัติเชิงกล และอัตราการปลดปล่อยยาของโครงเลี้ยงเซลล์ รวมทั้งศึกษาสมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของโครงเลี้ยงเซลล์ จากผลการทดสอบทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1 จากการศึกษาผลของปริมาณเกลือและการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีต่อความเป็นรูพรุน สัณฐานวิทยา ความชอบน้ำ และสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า

5.1.1.1 เมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น ก็จะสามารถพบรูพรุนทั้งภายในเส้นใยและบริเวณผิวของเส้นใยมากขึ้น รวมไปถึงมีโอกาสจะพบเห็นรูพรุนขนาดใหญ่ที่มีการเชื่อมต่อกันภายในมากขึ้นด้วย โดยรูพรุนส่วนใหญ่จะกระจายตัวอยู่ภายในเส้นใยมากกว่าที่บริเวณพื้นผิวของเส้นใย และมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 7-70 ไมโครเมตร สำหรับความเป็นรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอื่นเนื่องมาจากเกลือที่มี Lay-down pattern แบบตารางมีค่าความเป็นรูพรุนเท่ากับ 38.12% และ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมมีค่าความเป็นรูพรุนเท่ากับ 40.05% ซึ่งเกิดจากการออกแบบช่องว่างระหว่างเส้นใยขณะขึ้นรูปด้วยกระบวนการพิมพ์แบบสามมิติ และเมื่อมีการเติมเกลือลงไปพบว่า การเติมเกลือส่งผลให้ปริมาณรูพรุนเพิ่มขึ้น และปริมาณเกลือที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยยิ่งอัตราส่วนเกลือเพิ่มขึ้นปริมาณรูพรุนก็จะเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีปริมาณรูพรุนรวมมากกว่าในทุก ๆ สูตรทั้งชนิดที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ อีกทั้งยังอัตราส่วนเกลือเพิ่มขึ้น ความแตกต่างของปริมาณรูพรุนอื่นเนื่องมาจากปัจจัยของการจัดเรียงโครงสร้างก็ยิ่งเพิ่มขึ้นด้วย

5.1.1.2 เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เหล่านี้มาทดสอบความชอบน้ำ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีรูพรุนอื่นเนื่องมาจากเกลือไม่มีความแตกต่างของค่ามุมสัมผัสน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่าง Lay-down pattern ที่แตกต่างกัน แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุน Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีค่ามุมสัมผัสน้ำต่ำกว่า Lay-down pattern แบบตาราง

5.1.1.3 สำหรับสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นทั้งความแข็งแรงต่อการดัดงอ (Flexural strength) และมอดูลัสการดัดงอ (Flexural

modulus) มีค่าลดลงเนื่องมาจากความมีรูพรุนมากขึ้นภายในเนื้อพอลิเมอร์ และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบตารางก็มีสมบัติเชิงกลทั้งสองชนิดดังกล่าวสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมอีกด้วย นอกจากนี้ที่การทดสอบระยะการตัดงอที่ 5% strain โครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรล้วนยังสามารถคงสภาพไว้ในช่วงยืดหยุ่น (Elastic deformation) ไม่เกิดการเสียรูปอย่างถาวรหรือการแตกหักขณะทำการทดสอบ

5.1.2 จากการศึกษาผลของปริมาณเกลือและการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีต่ออัตราการปลดปล่อยยา พบว่าเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มที่จะสามารถปลดปล่อยยาจนกระทั่งเข้าสู่สมดุลได้มากขึ้น อัตราการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นจะลดลง และมีความสม่ำเสมอของอัตราการปลดปล่อยยามากขึ้น สำหรับผลของการจัดเรียงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมจะมีอัตราการปลดปล่อยยามากกว่า Lay-down pattern แบบตาราง แต่ความแตกต่างของอัตราการปลดปล่อยยานี้จะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งเข้าสู่จุดสมดุล โดยโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t มีปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยสะสมทั้งหมดเมื่อเข้าสู่สมดุลแล้วมากที่สุด มีอัตราการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็วในช่วงต้นน้อยที่สุด และมีความสม่ำเสมอของอัตราการปลดปล่อยยาตลอดการทดสอบมากที่สุด

5.1.3 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ พบว่า

5.1.3.1 จากการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* ของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค Dynamic shake flask method แบบครอบเพลต เมื่อทดสอบกับแบคทีเรีย *S.aureus* พบว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรูพรุนเพิ่มขึ้น และ Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยมมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูงกว่า Lay-down pattern แบบตารางเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับที่ปริมาณเกลือเท่ากัน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการบรรจุยาสูตร 4:6PBS-t มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มากที่สุด อันเนื่องมาจากที่เวลาทดสอบคือตัวยาลูกปลดปล่อยออกมา 24 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t มีปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมามากที่สุด อย่างไรก็ตามผลของปริมาณเกลือและการจัดเรียงโครงสร้างที่ส่งผลต่ออัตราการปลดปล่อยยานั้นกลับไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มากกว่า *E. coli* ด้วย

5.1.3.2 สมบัติด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพด้วยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ L929 mouse fibroblast ด้วยโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t บรรจุตัวยาเซฟาโซลินที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าที่ความเข้มข้นของยาเซฟาโซลินในช่วงตั้งแต่ 0.4 ถึง 100 ppm ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Viability) มีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 98 ถึง 100 ซึ่ง

ถือว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ L929 mouse fibroblast โดยหากควบคุมปริมาณยาที่บรรจุลงในโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นของการปลดปล่อยยาในแต่ละช่วงเวลาอยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 ถึง 100 ppm ก็จะสามารถนำโครงเลี้ยงเซลล์บรรจุยาเซฟาโซลินนี้ไปใช้กับร่างกายได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แวดล้อม



## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การใช้เกลือเป็นสารช่วยทำให้เกิดรูพรุน (Porogent) มีข้อดีในเรื่องของต้นทุนที่ต่ำ แต่ในขั้นตอนการขึ้นรูปเป็นเส้นใยด้วยเครื่องอัตโนมัติ จะมีอนุภาคเกลือตกค้างอยู่ภายในกระบอกลอมจำนวนหนึ่ง ซึ่งหากไม่ทำความสะอาดให้ดีพอและวัสดุภายในกระบอกลอมและสกรูมีส่วนประกอบที่เป็นเหล็ก อนุภาคเกลือที่ตกค้างจะส่งผลให้เกิดสนิมได้ง่ายขึ้น หากเครื่องมือที่ใช้ในการขึ้นรูปมีโอกาสจะเกิดเหตุการณ์ดังกล่าวแนะนำให้เลือกใช้สารช่วยทำให้เกิดรูพรุนชนิดอื่นแทน เช่น เส้นใยตัดสั้นหรือเม็ดบีดจากพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ

5.2.2 กระบวนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบใช้หัวฉีด หากเป็นไปได้ควรเลือกใช้เครื่องมือที่สามารถควบคุมอุณหภูมิของฐานรับ (Base) ได้ เพื่อควบคุมไม่ให้เส้นใยพอลิเมอร์ที่ฉีดออกมาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชั้นเย็นตัวเร็วเกินไป จะช่วยแก้ปัญหาชิ้นงานหดตัวและม้วนตัวจากขอบเข้าสู่ศูนย์กลางขณะขึ้นรูปได้

5.2.3 การทดสอบสมบัติเชิงกลของการดัดงอ หากเพิ่มการทดสอบ Flexural Recovery ด้วยการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลแบบไดนามิก (DMA) จะช่วยให้สามารถอธิบายพฤติกรรมเชิงกลเมื่อได้รับแรงดัดงอที่มีแรงกระทำแบบเป็นคาบ หรือได้รับแรงกระทำซ้ำ ๆ ติดต่อกันได้



## รายการอ้างอิง

1. O'Brien, F.J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14: 88-95.
2. Zong, X., Li, S., Chen, E., Garlick, B., Kim, K.-s., Fang, D., Chiu, J., Zimmerman, T., Brathwaite, C., and Hsiao, B.S. 2004. Prevention of postsurgery-induced abdominal adhesions by electrospun bioabsorbable nanofibrous poly (lactide-co-glycolide)-based membranes. *Annals of surgery* 240: 910.
3. Llorens, E., del Valle, L.J., Díaz, A., Casas, M.T., and Puiggali, J. 2013. Polylactide nanofibers loaded with vitamin B6 and polyphenols as bioactive platform for tissue engineering. *Macromolecular Research* 21: 775-787.
4. Toshkova, R., Manolova, N., Gardeva, E., Ignatova, M., Yossifova, L., Rashkov, I., and Alexandrov, M. 2010. Antitumor activity of quaternized chitosan-based electrospun implants against Graffi myeloid tumor. *International journal of pharmaceutics* 400: 221-233.
5. 2015. 2 - Modification of drug release. in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Bruschi, M.L., Editor. pp. 15-28: Woodhead Publishing.
6. Perez, R.A. and Kim, H.-W. 2015. Core-shell designed scaffolds for drug delivery and tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 21: 2-19.
7. Huang, A., Peng, X., Geng, L., Zhang, L., Huang, K., Chen, B., Gu, Z., and Kuang, T. 2018. Electrospun poly (butylene succinate)/cellulose nanocrystals bio-nanocomposite scaffolds for tissue engineering: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *Polymer Testing* 71: 101-109.
8. Gigli, M., Fabbri, M., Lotti, N., Gamberini, R., Rimini, B., and Munari, A. 2016. Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review. *European Polymer Journal* 75: 431-460.
9. Wang, H., Ji, J., Zhang, W., Zhang, Y., Jiang, J., Wu, Z., Pu, S., and Chu, P.K. 2009. Biocompatibility and bioactivity of plasma-treated biodegradable poly(butylene succinate). *Acta Biomaterialia* 5: 279-287.

10. Hariraksapitak, P., Suwantong, O., Pavasant, P., and Supaphol, P. 2008. Effectual drug-releasing porous scaffolds from 1, 6-diisocyanatohexane-extended poly (1, 4-butylene succinate) for bone tissue regeneration. *Polymer* 49: 2678-2685.
11. Wu, Z., Zheng, K., Zhang, J., Tang, T., Guo, H., Boccaccini, A.R., and Wei, J. 2016. Effects of magnesium silicate on the mechanical properties, biocompatibility, bioactivity, degradability, and osteogenesis of poly (butylene succinate)-based composite scaffolds for bone repair. *Journal of Materials Chemistry B* 4: 7974-7988.
12. Li, H., Chang, J., Cao, A., and Wang, J. 2005. In vitro evaluation of biodegradable poly (butylene succinate) as a novel biomaterial. *Macromolecular bioscience* 5: 433-440.
13. Ojansivu, M., Johansson, L., Vanhatupa, S., Tamminen, I., Hannula, M., Hyttinen, J., Kellomäki, M., and Miettinen, S. 2018. Knitted 3D scaffolds of polybutylene succinate support human mesenchymal stem cell growth and osteogenesis. *Stem cells international* 2018.
14. Water, J.J., Bohr, A., Boetker, J., Aho, J., Sandler, N., Nielsen, H.M., and Rantanen, J. 2015. Three-Dimensional Printing of Drug-Eluting Implants: Preparation of an Antimicrobial Polylactide Feedstock Material. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104: 1099-1107.
15. Karageorgiou, V. and Kaplan, D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26: 5474-5491.
16. Zeller, V., Durand, F., Kitzis, M.D., Lhotellier, L., Ziza, J.M., Mamoudy, P., and Desplaces, N. 2008. Continuous Cefazolin Infusion To Treat Bone and Joint Infections: Clinical Efficacy, Feasibility, Safety, and Serum and Bone Concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 883-887.
17. 2017. Cefazolin-AFT (Online). Available: [www.medsafe.govt.nz/Profs/Datasheet/c/cefazolinAFTinj.pdf](http://www.medsafe.govt.nz/Profs/Datasheet/c/cefazolinAFTinj.pdf) [2018, July 23]
18. . General Information About MRSA in the Community (Online). Available: <https://www.cdc.gov/mrsa/community/index.html> [2018, July 19]

19. Bandopadhyay, S., Manchanda, S., Chandra, A., Ali, J., and Deb, P.K. 2020. Chapter 5 - Overview of different carrier systems for advanced drug delivery. in Drug Delivery Systems, Tekade, R.K., Editor. pp. 179-233: Academic Press.
20. Tran, P.A., Zhang, L., and Webster, T.J. 2009. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews* 61: 1097-1114.
21. Edlund, U. and Albertsson, A.-C. 2002. Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. in *Degradable aliphatic polyesters*. pp. 67-112: Springer.
22. Zempsky, W.T. 1998. Alternative routes of drug administration—advantages and disadvantages (subject review). *Pediatrics* 101: 730-731.
23. Zhang, J., Wang, D., Wu, Y., Li, W., Hu, Y., Zhao, G., Fu, C., Fu, S., and Zou, L. 2018. Lipid-polymer hybrid nanoparticles for oral delivery of tartary buckwheat flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry* 66: 4923-4932.
24. Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., and Bannerjee, S.K. 2012. Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation* 2: 2.
25. Robinson, D.H. and Mauger, J.W. 1991. Drug delivery systems. *American journal of hospital pharmacy* 48: S14-S23.
26. Atala, A. 2004. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Concepts for Clinical Application. *Rejuvenation res.* 7: 15-31.
27. Langer, R. 2000. Biomaterials in Drug Delivery and Tissue Engineering: One Laboratory's Experience. *Accounts of Chemical Research* 33: 94-101.
28. Babensee, J.E., Anderson, J.M., McIntire, L.V., and Mikos, A.G. 1998. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 33: 111-139.
29. Hutmacher, D.W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21: 2529-2543.
30. Ko, H.C.H., Milthorpe, B.K., and McFarland, C.D. 2007. Engineering thick tissues - the vascularisation problem. *European Cells and Materials* 14: 1-19.



31. Phelps, E.A. and Garcia, A.J. 2009. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regenerative medicine* 4: 65-80.
32. O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., and Gibson, L.J. 2005. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 26: 433-441.
33. Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Skrabut, E.M., and Murphy, G.F. 1989. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 933.
34. Scott, J.H. 2009. Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication* 1: 012001.
35. Hou, Q., Grijpma, D.W., and Feijen, J. 2003. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials* 24: 1937-1947.
36. Barry, J.J.A., Gidda, H.S., Scotchford, C.A., and Howdle, S.M. 2004. Porous methacrylate scaffolds: supercritical fluid fabrication and in vitro chondrocyte responses. *Biomaterials* 25: 3559-3568.
37. Elsner, J.J., Portnoy, S., Zur, G., Guilak, F., Shterling, A., and Linder-Ganz, E. 2010. Design of a free-floating polycarbonate-urethane meniscal implant using finite element modeling and experimental validation. *Journal of biomechanical engineering* 132.
38. Bang, S.-H., Kim, T.-H., Lee, H.-Y., Shin, U.S., and Kim, H.-W. 2011. Nanofibrous-structured biopolymer scaffolds obtained by a phase separation with camphene and initial cellular events. *Journal of Materials Chemistry* 21: 4523-4530.
39. Schantz, J.-T., Brandwood, A., Hutmacher, D.W., Khor, H.L., and Bittner, K. 2005. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *Journal of materials science: Materials in medicine* 16: 807-819.
40. Shor, L., Güçeri, S., Chang, R., Gordon, J., Kang, Q., Hartsock, L., An, Y., and Sun, W. 2009. Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering. *Biofabrication* 1: 015003.

41. Deb, P., Deoghare, A.B., Borah, A., Barua, E., and Das Lala, S. 2018. Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. *Materials Today: Proceedings* 5: 12909-12919.
42. Uklejewski, R., Rogala, P., Winięcki, M., Tokłowicz, R., Ruszkowski, P., and Wołuń-Cholewa, M. 2016. Biomimetic Multispiked Connecting Ti-Alloy Scaffold Prototype for Entirely-Cementless Resurfacing Arthroplasty Endoprostheses—Exemplary Results of Implantation of the Ca-P Surface-Modified Scaffold Prototypes in Animal Model and Osteoblast Culture Evaluation. *Materials* 9: 532.
43. Weidling, M., Besdo, S., Schilling, T., Bauer, M., Hassel, T., Bach, F.-W., Maier, H.J., Lamou, J., Haverich, A., and Wriggers, P. 2015. Development of Magnesium Alloy Scaffolds to Support Biological Myocardial Grafts: A Finite Element Investigation. in *Biomedical Technology*, Lenarz, T. and Wriggers, P., Editors. pp. 81-100. Cham: Springer International Publishing.
44. Alavi, S.H. and Kheradvar, A. 2012. Metal Mesh Scaffold for Tissue Engineering of Membranes. *Tissue Engineering. Part C, Methods* 18: 293-301.
45. Elias, C.N., Lima, J.H.C., Valiev, R., and Meyers, M.A. 2008. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM* 60: 46-49.
46. Wahl, D.A. and Czernuszka, J.T. 2006. Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair. *European Cells and Materials* 11: 43-56.
47. Kumar, V., Batra, U., Kadam, A., and Mulik, P. Development of Hydroxyapatite Bio-Scaffold. *J. Mech. Civ. Eng.(nd)*: 33-37.
48. Cao, W. and Hench, L.L. 1996. Bioactive materials. *Ceramics international* 22: 493-507.
49. Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., and Berthod, F. 2010. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials* 3: 1863-1887.
50. Yamamoto, M., Kato, K., and Ikada, Y. 1997. Ultrastructure of the interface between cultured osteoblasts and surface-modified polymer substrates. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* 37: 29-36.

51. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., and Kumar, D.S. 2011. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International journal of polymer science* 2011.
52. Hutmacher, D.W. 2001. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 12: 107-124.
53. Kikuchi, M., Koyama, Y., Yamada, T., Imamura, Y., Okada, T., Shirahama, N., Akita, K., Takakuda, K., and Tanaka, J. 2004. Development of guided bone regeneration membrane composed of  $\beta$ -tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co- $\epsilon$ -caprolactone) composites. *Biomaterials* 25: 5979-5986.
54. Yamauchi, K., Goda, T., Takeuchi, N., Einaga, H., and Tanabe, T. 2004. Preparation of collagen/calcium phosphate multilayer sheet using enzymatic mineralization. *Biomaterials* 25: 5481-5489.
55. Takiyama, E. and Fujimaki, T. 1994. "bionolle" biodegradable plastic through chemical synthesis. in *Studies in Polymer Science*, Doi, Y. and Fukuda, K., Editors. pp. 150-174: Elsevier.
56. Ishioka, R., Kitakuni, E., and Ichikawa, Y. 2005. Aliphatic polyesters: "Bionolle". *Biopolymers Online: Biology • Chemistry • Biotechnology • Applications* 4.
57. Kong, Y., Ma, Y., Lei, L., Wang, X., and Wang, H. 2017. Crystallization of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) in Poly (vinylidene fluoride)/Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Blend. *Polymers* 9: 42.
58. Chen, R.-y., Zou, W., Zhang, H.-c., Zhang, G.-z., Yang, Z.-t., Jin, G., and Qu, J.-p. 2015. Thermal behavior, dynamic mechanical properties and rheological properties of poly (butylene succinate) composites filled with nanometer calcium carbonate. *Polymer Testing* 42: 160-167.
59. Niaounakis, M. 2015. *Biopolymers: applications and trends*. William Andrew.
60. Adamopoulou, E., S. Vougiouka, and K. Papaspyrides. 2012. Poly (butylene succinate): a promising biopolymer. *Department of Industrial Management and Technology. School of Chemical Engineering*: 215-36.

61. Xu, J. and Guo, B.H. 2010. Poly (butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization. *Biotechnology journal* 5: 1149-1163.
62. Bandyopadhyay, A., Bose, S., and Das, S. 2015. 3D printing of biomaterials. *MRS bulletin* 40: 108-115.
63. Author. 1992. Apparatus and method for creating three-dimensional objects. Publisher.
64. Author. 1986. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. Publisher.
65. Author. 1989. Method and apparatus for producing parts by selective sintering. Publisher.
66. Author. Three-dimensional printing techniques. Publisher.
67. Author. 1998. 3-D model making. Publisher.
68. Ronca, A., Ambrosio, L., and Grijpma, D.W. 2013. Preparation of designed poly (D, L-lactide)/nanosized hydroxyapatite composite structures by stereolithography. *Acta biomaterialia* 9: 5989-5996.
69. 2003. Standard test methods for conductivity type of extrinsic semiconducting materials (Online). Available: <http://www.astm.org/Standards/F42.html>
70. Roopavath, U.K. and Kalaskar, D.M. 2017. 1 - Introduction to 3D printing in medicine. in *3D Printing in Medicine*, Kalaskar, D.M., Editor. pp. 1-20: Woodhead Publishing.
71. Gepreel, M.A.-H. and Niinomi, M. 2013. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 20: 407-415.
72. Wang, X., Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., Qian, M., Brandt, M., and Xie, Y.M. 2016. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: a review. *Biomaterials* 83: 127-141.
73. Koeck, F.X., Beckmann, J., Luring, C., Rath, B., Grifka, J., and Basad, E. 2011. Evaluation of implant position and knee alignment after patient-specific unicompartmental knee arthroplasty. *The Knee* 18: 294-299.

74. Klein, G.T., Lu, Y., and Wang, M.Y. 2013. 3D printing and neurosurgery—ready for prime time? *World neurosurgery* 80: 233-235.
75. Kang, H.-W., Lee, S.J., Ko, I.K., Kengla, C., Yoo, J.J., and Atala, A. 2016. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature biotechnology* 34: 312.
76. Williams, D.F. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29: 2941-2953.
77. Schaub, D.A., Chu, K.-R., and Montgomery, D.C. 1997. Optimizing stereolithography throughput. *Journal of Manufacturing Systems* 16: 290.
78. Lu, Z., Cao, J., Bai, S., Wang, M., and Li, D. 2015. Microstructure and mechanical properties of TiAl-based composites prepared by stereolithography and gelcasting technologies. *Journal of Alloys and Compounds* 633: 280-287.
79. Elomaa, L., Teixeira, S., Hakala, R., Korhonen, H., Grijpma, D.W., and Seppälä, J.V. 2011. Preparation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Acta biomaterialia* 7: 3850-3856.
80. Lu, Y., Mapili, G., Suhali, G., Chen, S., and Roy, K. 2006. A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 77: 396-405.
81. Zhu, W., Ma, X., Gou, M., Mei, D., Zhang, K., and Chen, S. 2016. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current opinion in biotechnology* 40: 103-112.
82. Duan, B., Wang, M., Zhou, W.Y., Cheung, W.L., Li, Z.Y., and Lu, W.W. 2010. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia* 6: 4495-4505.
83. 2018. Powder Bed Fusion (Online). Available: <http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/powderbedfusion/> [2018, July 25]

84. 2018. Material Jetting (Online). Available:  
<http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/materialjetting/> [2018, July 25]
85. Wong, K.V. and Hernandez, A. 2012. A review of additive manufacturing. ISRN Mechanical Engineering 2012.
86. Leong, K., Cheah, C., and Chua, C. 2003. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. Biomaterials 24: 2363-2378.
87. Mohamed, O.A., Masood, S.H., and Bhowmik, J.L. 2016. Optimization of fused deposition modeling process parameters for dimensional accuracy using I-optimality criterion. Measurement 81: 174-196.
88. 2018. Material Extrusion (Online). Available:  
<http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/materialextrusion/> [2018, July 25]
89. 2018. Direct Energy Deposition (Online). Available:  
<http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/directedenergydeposition/> [2018, July 25]
90. 2018. Binder Jetting (Online). Available:  
<http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/binderjetting/> [2018, July 25]
91. 2018. Sheet Lamination (Online). Available:  
<http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/sheetlamination/> [2018, July 25]
92. Zein, I., Hutmacher, D.W., Tan, K.C., and Teoh, S.H. 2002. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. Biomaterials 23: 1169-1185.
93. Holländer, J., Genina, N., Jukarainen, H., Khajeheian, M., Rosling, A., Mäkilä, E., and Sandler, N. 2016. Three-Dimensional Printed PCL-Based Implantable Prototypes of Medical Devices for Controlled Drug Delivery. Journal of Pharmaceutical Sciences 105: 2665-2676.

94. Visscher, L.E., Dang, H.P., Knackstedt, M.A., Hutmacher, D.W., and Tran, P.A. 2018. 3D printed Polycaprolactone scaffolds with dual macro-microporosity for applications in local delivery of antibiotics. *Materials Science and Engineering: C* 87: 78-89.
95. Roohani-Esfahani, S.-I., Newman, P., and Zreiqat, H. 2016. Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects. *Scientific reports* 6: 19468-19468.
96. Langer, R. and Tirrell, D.A. 2004. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428: 487-492.
97. Loh, Q.L. and Choong, C. 2013. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 19: 485-502.
98. Hutmacher, D. and Cool, S. 2007. Concepts of scaffold-based tissue engineering—the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *Journal of cellular and molecular medicine* 11: 654-669.
99. Reignier, J. and Huneault, M.A. 2006. Preparation of interconnected poly( $\epsilon$ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching. *Polymer* 47: 4703-4717.
100. Zhang, K., Fan, Y., Dunne, N., and Li, X. 2018. Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering. *Regenerative biomaterials* 5: 115-124.
101. Wang, J., Wu, Y., Cao, Y., Li, G., and Liao, Y. Influence of surface roughness on contact angle hysteresis and spreading work.
102. Šušteršič, T.I. and Filipovic, N. 2020. Chapter 8 - Computational modeling of dry-powder inhalers for pulmonary drug delivery. in *Computational Modeling in Bioengineering and Bioinformatics*, Filipovic, N., Editor. pp. 257-288: Academic Press.
103. Birchall, J., Howard, A., and Kendall, K. 1981. Flexural strength and porosity of cements. *Nature* 289: 388-390.
104. Porter, D., Reed, J., and III, D.L. 1977. Elastic moduli of refractory spinels. *Journal of the American Ceramic Society* 60: 345-349.

105. Liu, D., Šavija, B., Smith, G.E., Flewitt, P.E., Lowe, T., and Schlangen, E. 2017. Towards understanding the influence of porosity on mechanical and fracture behaviour of quasi-brittle materials: Experiments and modelling. *International Journal of Fracture* 205: 57-72.
106. Lu, X.-Y., Wu, D.-C., Li, Z.-J., and Chen, G.-Q. 2011. Chapter 7 - Polymer Nanoparticles. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Villaverde, A., Editor. pp. 299-323: Academic Press.
107. Rambhia, K.J. and Ma, P.X. 2015. Controlled drug release for tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 219: 119-128.
108. Douglas, A., Udy, A.A., Wallis, S.C., Jarrett, P., Stuart, J., Lassig-Smith, M., Deans, R., Roberts, M.S., Taraporewalla, K., and Jenkins, J. 2011. Plasma and tissue pharmacokinetics of cefazolin in patients undergoing elective and semielective abdominal aortic aneurysm open repair surgery. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 5238-5242.
109. Lowy, F. 2009. Bacterial classification, structure and function. New York, USA: Columbia University: 1-6.
110. Katzung, B.G. 2012. Basic and clinical pharmacology. Mc Graw Hill.
111. Beauduy, C. and Winston, L. 2018. Beta-lactam & other cell wall & membrane-active antibiotics. *Basic & Clinical Pharmacology*: 795-814.
112. DARI, D.E.C.Y.D. and SEGAR, S.S. 2015. Antibiotic sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from bovine fresh milk. *Jurnal Veteriner Desember* 16: 520-524.
113. Javadhesari, S.M., Alipour, S., Mohammadnejad, S., and Akbarpour, M. 2019. Antibacterial activity of ultra-small copper oxide (II) nanoparticles synthesized by mechanochemical processing against *S. aureus* and *E. coli*. *Materials Science and Engineering: C* 105: 110011.
114. Kaewprom, K., Lin, C.-N., and Chiou, M.-T. Cell Viability and Cytotoxic Testing of Seventeen Asian Plant Extracts toward MARC-145 Cells by MTT Assay.
115. Bratzler, D.W., Dellinger, E.P., Olsen, K.M., Perl, T.M., Auwaerter, P.G., Bolon, M.K., Fish, D.N., Napolitano, L.M., Sawyer, R.G., and Slain, D. 2013. Clinical practice



guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. Surgical infections 14: 73-156.

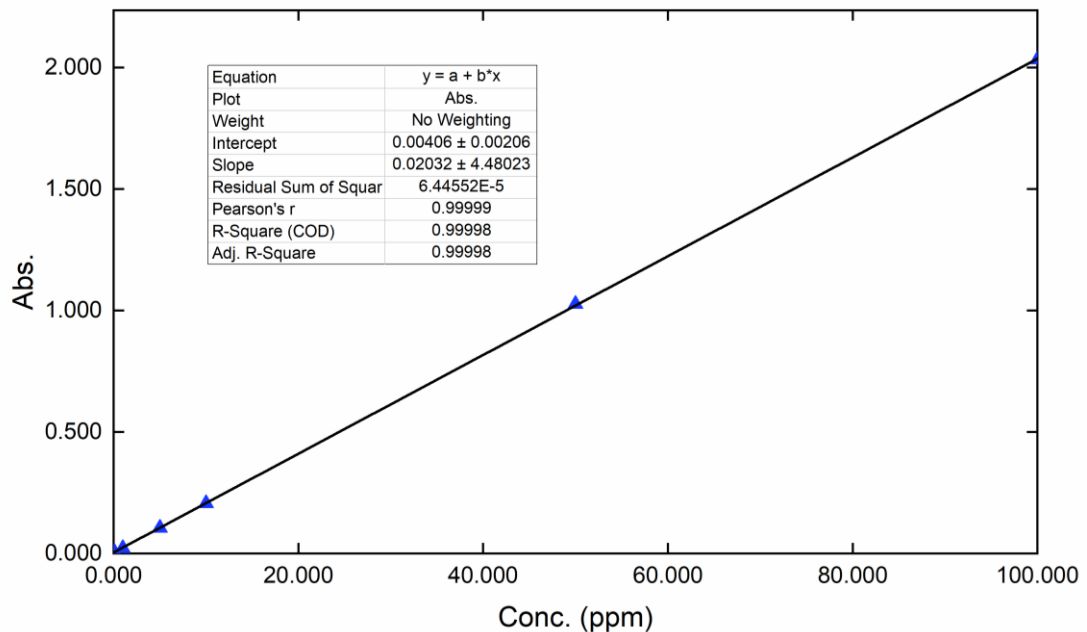


## ภาคผนวก ก.

### กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

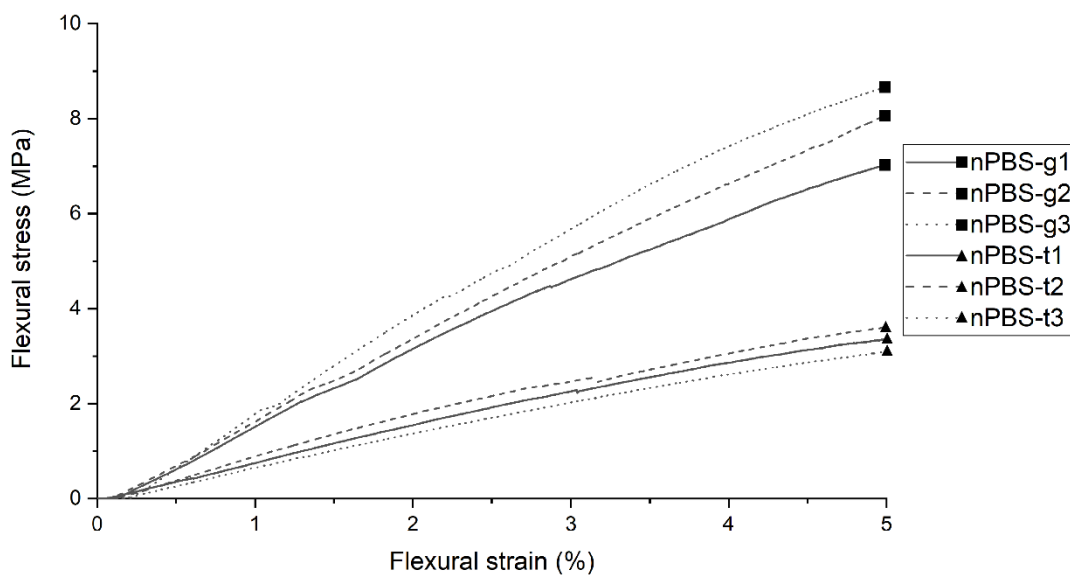
การเตรียมกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Calibration curve) คือ การนำสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนอย่างน้อย 3-4 ความเข้มข้น มาวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นก็นำความสัมพันธ์ที่ได้ไปสร้างกราฟ เพื่อเป็นกราฟเปรียบเทียบสำหรับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่ทราบความเข้มข้นโดยคำนวณจากสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นย้อนกลับได้

การเตรียมกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของงานวิจัยนี้ ทำได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการละลายยาเซฟาโซลินความเข้มข้น 0.1 1 5 10 50 และ 100 ppm มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร แล้วนำความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ทราบค่าแน่นอนกับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้นมาพลอตกราฟ จะได้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานที่เป็นกราฟเส้นตรงแสดงดังรูปที่ ก.1

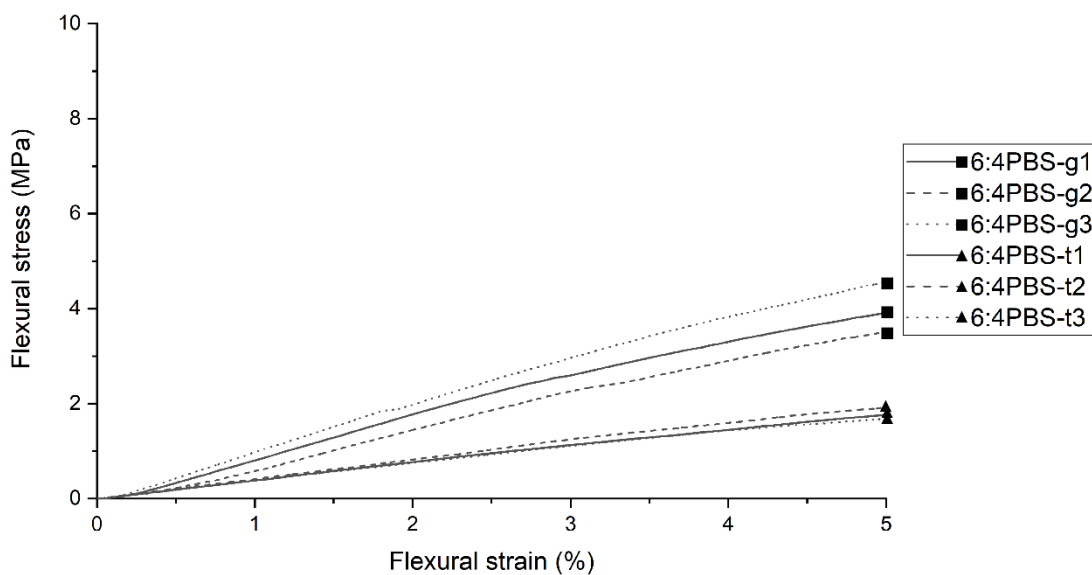


รูปที่ ก.1 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายเซฟาโซลินความเข้มข้น 0.1 1 5 10 50 และ 100 ppm ตามลำดับ โดยมีค่า  $R^2 = 0.99998$

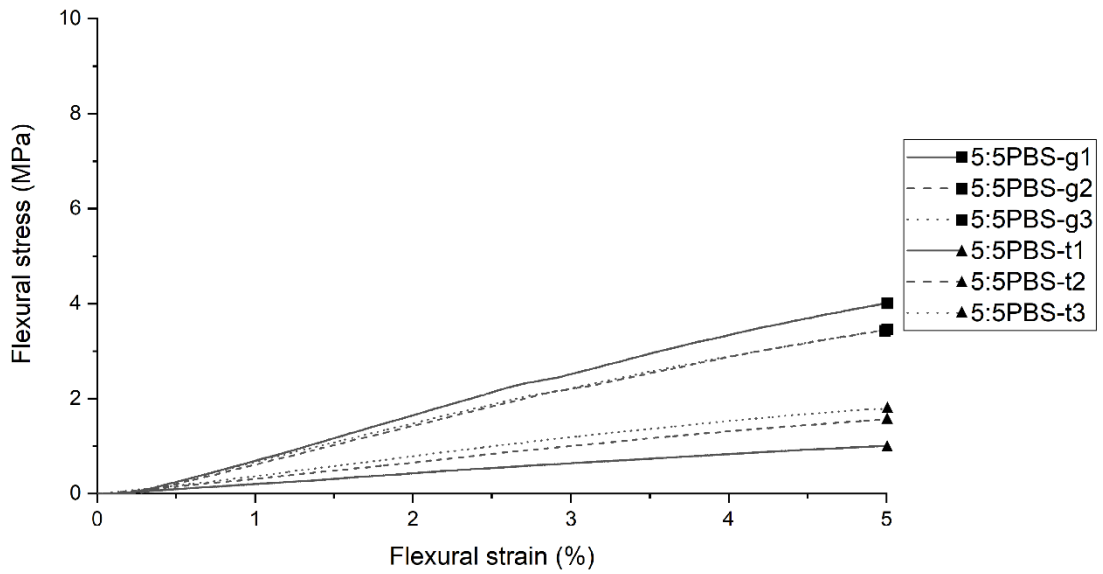
ภาคผนวก ข.  
กราฟความเค้น - ความเครียด



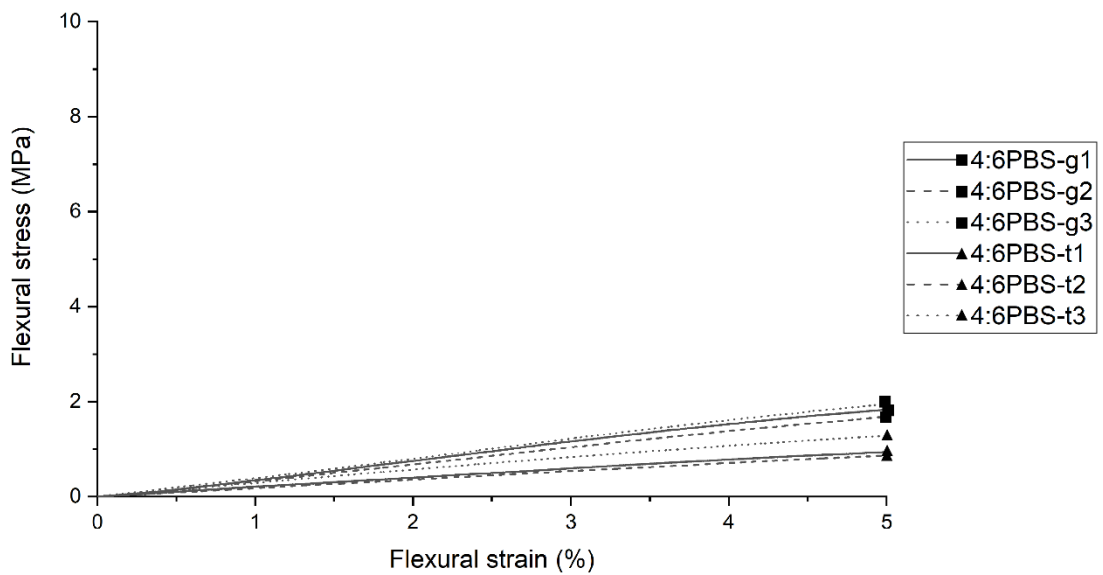
รูปที่ ข.2 กราฟความเค้น - ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร nPBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน



รูปที่ ข.3 กราฟความเค้น - ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 6:4PBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน



รูปที่ ข.4 กราฟความเค้น – ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 5:5PBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน



รูปที่ ข.5 กราฟความเค้น – ความเครียดของโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS ที่มี Lay-down pattern แตกต่างกัน

## ภาคผนวก ค.

## ตารางผลการทดสอบการปลดปล่อยยา

ตารางที่ ค.1 ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Non-cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี lay-down pattern แบบตาราง

เวลา	ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา ( $\mu\text{g}$ )		
	6:4PBS-g	5:5PBS-g	4:6PBS-g
1m	49.3355 $\pm$ 1.6135	28.0209 $\pm$ 0.7949	13.6056 $\pm$ 1.8038
5m	8.9725 $\pm$ 0.5058	16.1501 $\pm$ 1.8829	15.0781 $\pm$ 1.1783
10m	2.6634 $\pm$ 0.7046	9.0595 $\pm$ 0.2330	10.3241 $\pm$ 2.2488
15m	1.3573 $\pm$ 0.4127	3.8985 $\pm$ 0.7934	7.1884 $\pm$ 0.7081
30m	1.4757 $\pm$ 0.3557	3.7797 $\pm$ 0.1547	6.7686 $\pm$ 0.2841
1h	1.6704 $\pm$ 0.0641	2.9689 $\pm$ 0.1139	6.0671 $\pm$ 0.4360
2h	1.3566 $\pm$ 0.1276	2.5302 $\pm$ 0.3205	5.2184 $\pm$ 0.3593
3h	0.9607 $\pm$ 0.0592	1.4528 $\pm$ 0.3763	3.8580 $\pm$ 0.4483
6h	0.7983 $\pm$ 0.2536	1.9120 $\pm$ 0.3084	3.3747 $\pm$ 0.2802
12h	1.7271 $\pm$ 0.1900	1.8217 $\pm$ 0.2781	3.3917 $\pm$ 0.3350
24h	1.6516 $\pm$ 0.1676	1.5907 $\pm$ 0.0723	1.8825 $\pm$ 0.3620
2d	1.5645 $\pm$ 0.1854	1.5363 $\pm$ 0.2446	1.7576 $\pm$ 0.3229
3d	0.9196 $\pm$ 0.2635	1.0129 $\pm$ 0.2651	1.3015 $\pm$ 0.0771

ตารางที่ ค.2 ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Non-cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม

เวลา	ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา ( $\mu\text{g}$ )		
	6:4PBS-t	5:5PBS-t	4:6PBS-t
1m	52.6920 $\pm$ 1.0991	36.9929 $\pm$ 1.3478	18.2825 $\pm$ 1.4251
5m	10.6635 $\pm$ 0.8107	18.7601 $\pm$ 0.8099	18.8660 $\pm$ 1.9403
10m	2.0499 $\pm$ 0.4000	5.6832 $\pm$ 0.7026	11.7763 $\pm$ 0.4896
15m	0.8641 $\pm$ 0.1269	3.1246 $\pm$ 0.3693	6.5968 $\pm$ 0.7450
30m	0.9995 $\pm$ 0.3586	3.6009 $\pm$ 0.1130	7.2373 $\pm$ 0.5742

เวลา	ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา ( $\mu\text{g}$ )		
	6:4PBS-t	5:5PBS-t	4:6PBS-t
1h	1.3774 $\pm$ 0.3382	2.9115 $\pm$ 0.3040	6.7066 $\pm$ 0.2284
2h	1.2485 $\pm$ 0.1014	2.3973 $\pm$ 0.2334	4.8859 $\pm$ 0.4886
3h	0.6726 $\pm$ 0.2706	1.7748 $\pm$ 0.3146	3.6314 $\pm$ 0.5111
6h	0.6151 $\pm$ 0.1390	1.6605 $\pm$ 0.1467	3.3233 $\pm$ 0.2522
12h	2.2106 $\pm$ 0.2317	1.4747 $\pm$ 0.2831	3.2307 $\pm$ 0.1544
24h	1.6211 $\pm$ 0.0911	1.2495 $\pm$ 0.1150	1.2027 $\pm$ 0.1478
2d	1.3175 $\pm$ 0.3046	1.2870 $\pm$ 0.3689	1.1722 $\pm$ 0.1958
3d	0.9645 $\pm$ 0.1973	1.2935 $\pm$ 0.3618	0.8502 $\pm$ 0.1487

**ตารางที่ ค.3** ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบตาราง

เวลา	ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา (%)		
	6:4PBS-g	5:5PBS-g	4:6PBS-g
1m	49.09 $\pm$ 1.61	27.88 $\pm$ 0.79	13.54 $\pm$ 1.79
5m	57.42 $\pm$ 2.02	43.95 $\pm$ 1.08	28.54 $\pm$ 1.85
10m	60.07 $\pm$ 1.49	52.97 $\pm$ 0.93	38.81 $\pm$ 3.38
15m	61.42 $\pm$ 1.12	56.84 $\pm$ 0.65	45.97 $\pm$ 2.74
30m	62.89 $\pm$ 0.99	60.61 $\pm$ 0.77	52.70 $\pm$ 2.60
1h	64.55 $\pm$ 0.96	63.56 $\pm$ 0.76	58.74 $\pm$ 2.36
2h	65.90 $\pm$ 1.02	66.08 $\pm$ 0.76	63.93 $\pm$ 2.00
3h	66.86 $\pm$ 1.03	67.52 $\pm$ 0.66	67.77 $\pm$ 1.56
6h	67.65 $\pm$ 1.06	69.43 $\pm$ 0.86	71.13 $\pm$ 1.28
12h	69.37 $\pm$ 0.96	71.24 $\pm$ 1.13	74.50 $\pm$ 0.99
24h	71.01 $\pm$ 0.99	72.82 $\pm$ 1.18	76.38 $\pm$ 0.77
2d	72.57 $\pm$ 0.91	74.35 $\pm$ 1.21	78.12 $\pm$ 0.67
3d	73.49 $\pm$ 0.65	75.36 $\pm$ 1.04	79.42 $\pm$ 0.59

**ตารางที่ ค.4** ข้อมูลผลการทดสอบการปลดปล่อยยาแบบ Cumulative ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Lay-down pattern แบบสามเหลี่ยม

เวลา	ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา (%)		
	6:4PBS-t	5:5PBS-t	4:6PBS-t
1m	52.43±1.09	36.81±1.34	18.19±1.42
5m	63.04±0.80	55.48±1.96	36.96±2.02
10m	65.08±0.53	61.13±2.24	48.68±1.62
15m	65.94±0.40	64.24±1.87	55.25±0.96
30m	66.93±0.52	67.82±1.81	62.45±0.47
1h	68.30±0.82	70.72±1.51	69.12±0.59
2h	69.55±0.82	73.11±1.48	73.98±0.50
3h	70.22±1.08	74.87±1.20	77.59±0.98
6h	70.83±0.96	76.52±1.34	80.90±0.89
12h	73.03±1.18	77.99±1.48	84.12±1.04
24h	74.64±1.17	79.23±1.41	85.31±1.14
2d	75.95±1.15	80.51±1.23	86.48±1.20
3d	76.91±1.04	81.80±1.18	87.33±1.30



## ภาคผนวก ง.

จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* จากผลการทดสอบ

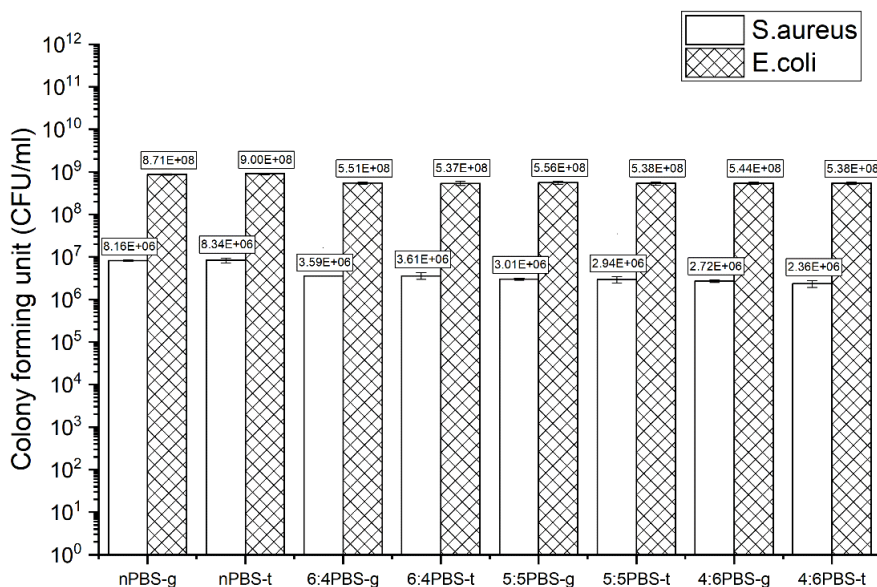
ความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ ง.5 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงสร้างเซลล์สูตรต่าง ๆ ใช้อยู่

<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
Sample	Colony-forming unit (CFU/ml)	Sample	Colony-forming unit (CFU/ml)
nPBS-g	$8.16 \times 10^6 \pm 3.26 \times 10^5$ <sup>a</sup>	nPBS-g	$8.71 \times 10^8 \pm 3.20 \times 10^7$ <sup>a</sup>
6:4PBS-g	$3.59 \times 10^6 \pm 1.04 \times 10^4$ <sup>b</sup>	6:4PBS-g	$5.51 \times 10^8 \pm 3.27 \times 10^7$ <sup>b</sup>
5:5PBS-g	$3.01 \times 10^6 \pm 1.70 \times 10^5$ <sup>b</sup>	5:5PBS-g	$5.56 \times 10^8 \pm 4.38 \times 10^7$ <sup>b</sup>
4:6PBS-g	$2.72 \times 10^6 \pm 1.96 \times 10^5$ <sup>b</sup>	4:6PBS-g	$5.44 \times 10^8 \pm 3.84 \times 10^7$ <sup>b</sup>
nPBS-t	$8.34 \times 10^6 \pm 1.16 \times 10^6$ <sup>a</sup>	nPBS-t	$9.00 \times 10^8 \pm 3.01 \times 10^7$ <sup>a</sup>
6:4PBS-t	$3.61 \times 10^6 \pm 6.44 \times 10^5$ <sup>b</sup>	6:4PBS-t	$5.37 \times 10^8 \pm 5.66 \times 10^7$ <sup>b</sup>
5:5PBS-t	$2.94 \times 10^6 \pm 4.61 \times 10^5$ <sup>b</sup>	5:5PBS-t	$5.38 \times 10^8 \pm 4.68 \times 10^7$ <sup>b</sup>
4:6PBS-t	$2.36 \times 10^6 \pm 4.37 \times 10^5$ <sup>b</sup>	4:6PBS-t	$5.38 \times 10^8 \pm 3.60 \times 10^7$ <sup>b</sup>



\*หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ ง.6 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ แห่อยู่

ภาคผนวก จ.

### ตัวอย่างการคำนวณเกี่ยวกับงานวิจัย

#### การคำนวณความเข้มข้นของการปลดปล่อยยาชั้นต่ำที่เหมาะสมแก่การรักษา

จากงานวิจัยของ A. Douglas และคณะระบุไว้ว่า ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเซฟาโซลินสูงสุดที่วัดได้ในน้ำเลือด (Serum) ในช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแรกหลังจากฉีดยาให้คนไข้ 1 โดส คือ 24 ppm ซึ่งความเข้มข้นยานี้มากเพียงพอที่ทำให้แบคทีเรีย *S. aureus* ตาย 90% และให้ผลการรักษาที่ดีที่สุด [108] ดังนั้นหากคำนวณหาความเข้มข้นเริ่มต้นสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t ที่จะทำให้โครงเลี้ยงเซลล์นี้ปลดปล่อยยาออกมาสะสมรวมที่เวลา 2 ชั่วโมงเท่ากับ 24 ppm จะได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการบรรจุยาลงในโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีที่สุด

โดยจากตารางที่ ข.4 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตร 4:6PBS-t ที่เวลาทดสอบ 2 ชั่วโมงมีปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาสะสมคิดเป็น 73.98% ของตัวยาทั้งหมด ดังนั้นหากต้องการให้ ความเข้มข้นของยาสะสมที่เวลา 2 ชั่วโมงนี้เท่ากับ 24 ppm จะต้องใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ

$$24 \text{ ppm} \times \frac{100}{73.98} = 32.44 \text{ ppm}$$

จะได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการบรรจุลงในโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีที่สุดคือ 32.44 ppm



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	กษิติศ ตีระสุขชัย
วัน เดือน ปี เกิด	8 เมษายน 2537
สถานที่เกิด	นครสวรรค์
วุฒิการศึกษา	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (วิทย์-คณิต) โรงเรียนชัยนาทพิทยาคม ตำบลบ้านกล้วย อำเภอเมืองชัยนาท จังหวัดชัยนาท ปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาปิโตรเคมีและวัสดุพอลิเมอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ตำบลสนามจันทร์ อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	107/3 ซอยเทศบาล 3 ตำบลในเมือง อำเภอเมืองชัยนาท จังหวัดชัยนาท 17000
ผลงานตีพิมพ์	Teerasuchai, K., Ksapabutr, B., Panapoy, M., & Chaiyut, N. (2021, May). Preparation and properties of poly(butylene succinate) porous scaffold by fused deposition modeling and salt leaching techniques. <i>Journal of Current Science and Technology</i> , 11(2), 334-341.