ว ทันต จุฬาฯ 2555;35:1-14
CU Dent J. 2012;35:1-14

บทวิทยาการ
Original Article

การสังเคราะห์และศึกษาลักษณะของโครงค้ำยันคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

สุคันธา เผือกนาโพธิ์ ท.บ.[1]
ฉันทวัฒน์ สุทธิบุณยพันธ์ ท.บ., Cert. in Endodontics, M.S., อ.ท. (วิทยาเอ็นโดดอนต์)[2]
สมพร สวัสดิสรรพ์ ท.บ., Cert. in Pathology, Ph.D.[3]

[1]นิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3]ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อสังเคราะห์และศึกษาลักษณะของโครงค้ำยันคอลลาเจนที่สกัดจากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์สำหรับการนำไปใช้เป็นโครงค้ำยันในการชักนำให้เกิดการซ่อมแซมกระดูก

วัสดุและวิธีการ คอลลาเจนที่ใช้ในการเตรียมโครงค้ำยันในการศึกษานี้ สกัดได้จากการละลายหนังสุกรในกรดร่วมกับเอนไซม์ และตกตะกอนด้วยเกลือ นำคอลลาเจนที่สกัดได้มาทำเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 ร้อยละ 2 และร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักตามลำดับ แล้วผสมเข้ากับผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในอัตราส่วนไฮดรอกซีอะพาไทต์ต่อสารละลายคอลลาเจน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สารผสมของคอลลาเจนและไฮดรอกซีอะพาไทต์ถูกทำให้เป็นโครงค้ำยันที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำด้วยการแช่แข็งและอบแห้งเยือกแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อุณหภูมิในการแช่แข็งแตกต่างกัน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทำให้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ และกลุ่มที่ทำให้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นทำให้โครงค้ำยันคอลลาเจนคงตัวด้วยการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง ศึกษาลักษณะโครงสร้างโดยละเอียดของโครงค้ำยันคอลลาเจนที่สังเคราะห์ภายใต้สภาวะแตกต่างกันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด และศึกษาขนาดของรูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาว วิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดรูพรุนด้วยวิธีการทางสถิติ

ผลการศึกษา โครงค้ำยันคอลลาเจนที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการดังกล่าว มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ กดนิ่ม สีขาว ไม่มีกลิ่นและละลายน้ำได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อผ่านการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางแล้ว โครงค้ำยันมีความคงตัวมากขึ้น จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดพบว่าโครงค้ำยันมีลักษณะเป็นรูพรุนประกอบด้วยแผ่นที่เกิดจากการอัดแน่นของเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมากสานกันไปมา โดยมีผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ติดอยู่ที่ผนังของรูพรุนเหล่านี้ จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของโครงค้ำยันที่เตรียมภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน พบว่าโครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุนไม่

แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในขณะที่โครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นเดียวกัน แต่เตรียมภายใต้สภาวะแช่แข็งต่างกัน มีขนาดของรูพรุนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กล่าวคือ โครงค้ำยันที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ ขนาดเฉลี่ยของรูพรุนใหญ่กว่าโครงค้ำยันที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว

สรุป คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังสุกร เมื่อนำไปผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ สามารถนำไปผลิตเป็นโครงค้ำยันที่คงตัวได้ด้วยวิธีอบแห้งเยือกแข็งร่วมกับการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง โดยลักษณะและขนาดของรูพรุนโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ มีความสัมพันธ์กับความเร็วในการลดต่ำลงของอุณหภูมิในการแช่แข็ง แต่ไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายคอลลาเจนที่ใช้ในการสังเคราะห์

(ว ทันต จุฬาฯ 2555;35:1-14)

คำสำคัญ: *โครงค้ำยัน; คอลลาเจนจากหนังสุกร; วิศวกรรมเนื้อเยื่อ; ไฮดรอกซีอะพาไทต์*

บทนำ

กระบวนการซ่อมแซมบาดแผลที่เกิดขึ้นกับกระดูก อาจเกิดได้ในลักษณะของการซ่อมแซมด้วยเนื้อเยื่อยึดต่อ (repair by connective tissue) หรือซ่อมแซมด้วยเนื้อเยื่อกระดูก ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่เคลื่อนเข้ามาในบริเวณที่เนื้อเยื่อถูกทำลายได้เร็วที่สุด[1] โดยปกติแล้วเซลล์ของเนื้อเยื่อยึดต่อมักเคลื่อนมายังตำแหน่งที่เป็นบาดแผลได้เร็วกว่าเซลล์ชนิดอื่น และทำให้เกิดการซ่อมแซมบาดแผลด้วยเนื้อเยื่อยึดต่อหรือเนื้อเยื่อไฟบรัส (fibrous tissue) ซึ่งการหายของแผลในลักษณะนี้ เมื่อเกิดการติดเชื้อซ้ำจะเกิดการทำลายอย่างรวดเร็ว[2] ด้วยเหตุดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีการรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้นกับกระดูกหลายวิธี เช่น การปลูกกระดูกโดยใช้กระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง หรือกระดูกที่สังเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น การปลูกกระดูกร่วมกับการใช้แผ่นเยื่อขวางกั้น (barrier membrane) เพื่อขัดขวางเซลล์ของเนื้อเยื่อยึดต่อไม่ให้เข้ามาในบริเวณบาดแผลและสนับสนุนการงอกใหม่ของกระดูกจากเซลล์กระดูกบริเวณใกล้เคียงที่เคลื่อนมายังบาดแผล นอกจากนี้ ในปัจจุบันยังมีการนำเอาวัสดุทางชีวภาพต่าง ๆ มาใช้เป็นโครงค้ำยัน (scaffold) ใส่ในบาดแผล เพื่อให้เป็นแนวทางสำหรับการเคลื่อนที่และเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกหรือเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ของเซลล์กระดูกเข้าไปยังบริเวณของบาดแผล และเกิดการซ่อมแซมด้วยกระดูกได้[3]

ลักษณะของโครงค้ำยันที่ดี ควรมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ มีอัตราการย่อยสลายเท่ากับอัตราการสร้างของเนื้อเยื่อใหม่ มีคุณสมบัติเป็นโครง 3 มิติที่มีความพรุนเพื่อให้เซลล์สามารถยึดเกาะ เจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนได้[4] ลักษณะของรูพรุนสังเกตได้จากขนาดของรูพรุน รูปร่าง เส้นเชื่อมระหว่างรูพรุน ระดับของความพรุนและพื้นที่ผิว ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะช่วยทำให้เซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อรวมถึงหลอดเลือดและสารอาหารต่าง ๆ เคลื่อนที่เข้ามาในโครงค้ำยันได้ โดยปัจจัยที่สำคัญที่สุด คือ ขนาดของรูพรุน[5] มีการรายงานถึงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์ ตั้งแต่ขนาดเล็กกว่า 100 ไมโครเมตร[6] จนถึงขนาด 500 ไมโครเมตร[7,8]

วัสดุที่นำมาสังเคราะห์เป็นโครงค้ำยันอาจเป็นวัสดุได้จากธรรมชาติ หรือจากสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม[9] โครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นจากวัสดุธรรมชาติส่วนใหญ่มักทำขึ้นจากเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่เซลล์มีความคุ้นเคย ดังนั้นโครงค้ำยันชนิดนี้จึงมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ สามารถรองรับการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดี[10] แต่มีข้อเสีย คือ ขาดความแข็งแรง ย่อยสลายง่าย ทำให้เกิดความยุ่งยากเมื่อนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการหรือนำไปใช้จริงทางคลินิก[11] โดยทั่วไปโครงค้ำยันที่ผลิตจากธรรมชาตินิยมผลิตจากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักของร่างกาย คอลลาเจนพบได้ประมาณร้อยละ 30 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย รวมทั้งเป็นเมทริกซ์หลักของเนื้อเยื่อกระดูก[12] คอลลาเจนที่นำมาสังเคราะห์โครงค้ำยัน ส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจนชนิดที่ I (type I collagen) ที่ได้จากสัตว์ เช่น วัว[13] และสุกร[14] ข้อดีของโครงค้ำยันที่ได้จากคอลลาเจน คือ คอลลาเจนเป็นส่วนหนึ่งของเมทริกซ์นอกเซลล์ จึงมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่ำ[15] สามารถกระตุ้นให้มีการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี ใช้ได้ดีกับบาดแผลในตำแหน่งต่าง ๆ ทั้งบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อ

อ่อน (soft tissue)[16] และบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue)[17] จัดหาได้ง่ายจากธรรมชาติ และมีการย่อยสลายได้เอง แต่ข้อเสียของโครงค้ำยันคอลลาเจน คือ ขาดความแข็งแรง และย่อยสลายง่าย โครงค้ำยันคอลลาเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าส่วนใหญ่จึงมีการปรับปรุงคุณภาพให้เหมาะสมกับการใช้งานมากขึ้นด้วยการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง (cross linking) โมเลกุลของคอลลาเจน[18] ปฏิกิริยาเชื่อมขวางนี้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้ความร้อน (dehydrothermal) ใช้รังสีอัลตราไวโอเลต[19] หรือใช้สารเคมี เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)[20] และฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde)[21] สารเคมีสองชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูตารัลดีไฮด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์และการหายของบาดแผลช้าลง[22] ปัจจุบันมีการใช้สารประกอบของ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดไอไมด์ (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) และสารเอ็นไฮดรอกซีซักซินิไมด์ (N-hydroxysuccinimide, NHS) มาใช้เป็นสารในปฏิกิริยาเชื่อมขวาง ซึ่งพบว่าสามารถช่วยให้โครงค้ำยันคอลลาเจนมีความคงตัวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์[23]

โครงค้ำยันคอลลาเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า ส่วนใหญ่ผลิตจากเอ็นยึดกล้ามเนื้อและผิวหนังของวัว[24] แต่พบว่าการใช้เนื้อเยื่อจากวัวมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนและอาจทำให้เกิดการติดเชื้อและแพร่กระจายของโรควัวบ้า (Mad cow disease) ได้[25] การผลิตโครงค้ำยันคอลลาเจนในปัจจุบันจึงพยายามใช้คอลลาเจนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมาทดแทนคอลลาเจนจากวัว เช่น คอลลาเจนจากหนังสุกร[14] หนังปลาทะเล[26] และเอ็นยึดกล้ามเนื้อม้า[27] เป็นต้น นอกจากการใช้โครงค้ำยันมาช่วยเป็นหลักยึดให้กับเซลล์แล้ว ยังมีการเติมแต่งโครงค้ำยันด้วยโมเลกุลที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณการทำงานระหว่างเซลล์ เช่น โกรทแฟกเตอร์ชนิดต่าง ๆ (growth factors) หรือสารที่สามารถดึงดูดหรือกระตุ้นเซลล์กระดูกให้เคลื่อนที่มายังบาดแผลได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างของสารดังกล่าวที่นิยมใช้ ได้แก่ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite)

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ เป็นสารอนินทรีย์ที่มีองค์ประกอบหลัก คือ แคลเซียมและฟอสเฟต มีสูตรโครงสร้าง คือ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ พบได้ในส่วนประกอบของกระดูกและฟันในมนุษย์ ด้วยลักษณะสมบัติที่มีความคล้ายคลึงกันกับส่วนประกอบของกระดูก และมีการศึกษาพบว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อและสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี[28] จึงมีการนำไฮดรอกซีอะพาไทต์มาผลิตเป็นโครงค้ำยันสำหรับการซ่อมแซมกระดูก[29] แต่ไฮดรอกซีอะพาไทต์เองมีความเปราะสูงและไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นโครงค้ำยันเดี่ยว จึงนิยมนำมาใช้ร่วมกับคอลลาเจนในการผลิตเป็นโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์[30] มีการศึกษาที่รายงานถึงผลดีของโครงค้ำยันที่เกิดจากการผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์กับคอลลาเจน พบว่าช่วยทำให้โครงค้ำยันคงรูปร่างได้ดีต้านทานต่อการละลายและการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีกว่าโครงค้ำยันที่มีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบเพียงอย่างเดียว[31] อีกทั้งมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้มีแคลเซียมพอกพูน (calcification) ได้ดีอีกด้วย[28]

จากการศึกษาของ Hutmacher[32] พบว่าวิธีการประดิษฐ์โครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์มีหลายวิธี และแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและรูปร่างของโครงค้ำยัน รวมถึงปัจจัยต้นทุนในการผลิต สำหรับการขึ้นรูปของโครงค้ำยันคอลลาเจนนั้นนิยมขึ้นรูปด้วยวิธีการทำให้แห้งโดยแช่แข็ง (Freeze drying) เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สามารถระเหิดตัวทำละลายออกไปได้ดี[33] ซึ่งวิธีการนี้จะทำให้ได้ขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกันขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็ง[34]

จากปัญหาเกี่ยวกับการแพร่กระจายของโรควัวบ้า การใช้วัตถุดิบที่มาจากหนังสุกรจึงเป็นทางเลือกที่ปลอดภัย ประกอบกับสุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่เลี้ยงกันแพร่หลายในประเทศไทย จึงหาได้ง่าย และราคาไม่แพง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร และศึกษาลักษณะของรูพรุนโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์จากคอลลาเจนที่สกัดได้ผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนและอุณหภูมิในการแช่แข็งที่แตกต่างกันในการขึ้นรูปโครงค้ำยัน

วัสดุและวิธีการ

การสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร

คอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษานี้ เตรียมจากผิวหนังสดของสุกร ด้วยวิธีการละลายในกรดที่ผสมเอนไซม์ และตกตะกอนคอลลาเจนด้วยเกลือ (salt precipitation) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Rousseau และ Gagnieu[35] โดยในขั้นแรกนำผิวหนังสุกรมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.015 โมลาร์ ที่ผสมเพปซิน (pepsin) ในปริมาณ 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักของหนังสุกร

1 กรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาตรของกรดผสมเอนไซม์ไม่น้อยกว่า 50 เท่าของปริมาตรหนังสุกร จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (Sigma 6K15, Germany) ด้วยค่าแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 10,000 x g เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งส่วนตะกอนซึ่งประกอบด้วยเศษเนื้อเยื่อไป นำเฉพาะส่วนเหลวมาตกตะกอนให้ได้คอลลาเจนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือเป็น 0.6 โมลาร์ นำไปเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้ง เก็บเฉพาะส่วนตะกอนซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยคอลลาเจน ทำการละลายตะกอนคอลลาเจนในกรดและตกตะกอนด้วยเกลือซ้ำ 2 ครั้งเพื่อให้ได้คอลลาเจนที่สะอาด จากนั้นทำการกำจัดเกลือที่ใช้ตกตะกอนคอลลาเจนด้วยการทำ ไดอะไลซิส (dialysis) ของสารละลายคอลลาเจนในกรดแอซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้เยื่อไดอะไลซิสที่มีความสามารถจำกัดการซึมผ่านของโมเลกุลที่มีน้ำหนัก 12,000-14,000 ดาลตัน (Spectra/Por® dialysis membrane, MW cut off 12,000-14,000, Spectrum Medical, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สารละลายคอลลาเจนที่ปราศจากเกลือปนเปื้อนถูกนำไปอบแห้งเยือกแข็ง (lyophilization Flexi-Dry MP, Sigma, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การเตรียมโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

นำคอลลาเจนที่ผ่านการอบแห้งเยือกแข็งไปละลายในกรดแอซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นของคอลลาเจน 1.5, 2 และ 2.5 กรัมต่อปริมาตรกรด 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายคอลลาเจนทั้ง 3 ความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายคอลลาเจนเป็นวุ้นข้น จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Sigma-Aldrich, USA) ในอัตราส่วนไฮดรอกซีอะพาไทต์ : สารละลายคอลลาเจน เป็น 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) คนให้เข้ากัน นำสารละลายคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ เทใส่แบบพิมพ์พลาสติกขนาดกว้าง 30 มิลลิเมตร ยาว 30 มิลลิเมตร และสูง 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำแบบพิมพ์ที่ได้ไปแช่แข็ง โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกทำให้สารละลายผสมแข็งตัวโดยลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ด้วยการนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสอีก 30 นาที กลุ่มที่ 2 นำไปแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ด้วยการแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทันที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำแบบพิมพ์ทั้งสองไปอบแห้งเยือกแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ

การทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

สารที่ใช้ในปฏิกิริยาเชื่อมขวางคอลลาเจนในการศึกษานี้เป็นสารผสมของ 33 มิลลิโมลาร์ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิล-อะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดไอไมด์ กับ 6 มิลลิโมลาร์ เอ็นไฮดรอกซีซักซินิไมด์ (Sigma-Aldrich, USA) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ของ 2-มอโฟไลโนอีเทนซัลโฟนิกแอซิด (2-morpholinoethane sulphonic acid) และเอทานอล ร้อยละ 40[23] ปฏิกิริยาเชื่อมขวางทำโดยแช่โครงค้ำยันคอลลาเจนที่สังเคราะห์ขึ้นในสารเชื่อมขวางภายใต้สภาวะสูญญากาศที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวนมาก นำไปอบแห้งเยือกแข็งอีกครั้ง

การศึกษาองค์ประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ในโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

นำโครงค้ำยันที่ผลิตขึ้นในแต่ละกลุ่มบดละเอียดและวิเคราะห์หาไฮดรอกซีอะพาไทต์ในโครงค้ำยัน โดยวิธีวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ด้วยเครื่องเอ็กซเรย์ดิฟแฟร็กโตมิเตอร์ (X-ray diffractometer Bruker AXS Model D8 Discover, Germany)

การศึกษาลักษณะรูพรุนของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์

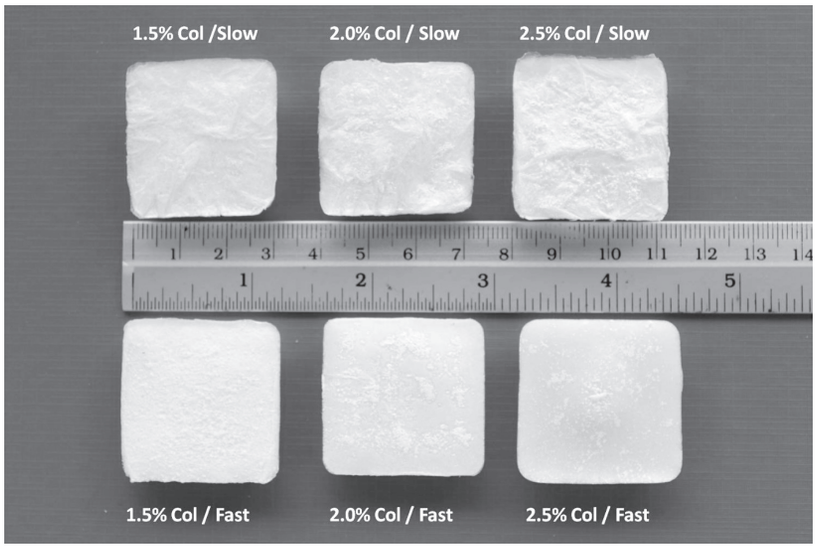
ทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างโดยละเอียดของโครงค้ำยันคอลลาเจนที่สังเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope JEOL, Japan) โดยสุ่มเลือกโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์ขึ้นในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 1 ชิ้น ตัดตำแหน่งกึ่งกลางของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หนา 3 มิลลิเมตร จากนั้นเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying) ก่อนที่จะนำไปยึดติดบนแผ่นทองเหลือง (specimen stub) และเคลือบผิวตัวอย่างด้วยอนุภาคทอง (gold particles) ศึกษา

ลักษณะพื้นผิวและความพรุนของโครงค้ำยันคอลลาเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่ 15 กิโลโวลต์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพด้วยระบบดิจิตัล (Semafor® 5.0 digital imaging system JEOL, Japan)

สำหรับการวิเคราะห์ขนาดของรูพรุน (pore size) ของโครงค้ำยันคอลลาเจนมีขั้นตอน คือ นำโครงค้ำยันที่ได้จากแผ่นพิมพ์พลาสติกของแต่ละกลุ่ม ตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น ที่ตำแหน่งกึ่งกลางและมุมทั้ง 4 ของโครงค้ำยันทำการเตรียมชิ้นตัวอย่าง สำหรับการตัดให้เป็นแผ่นบางด้วยพาราฟิน (paraffin section) ตัดเป็นแผ่นบางขนาด 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกไซลีน (haematoxylin) สุ่มสไลด์จำนวน 5 ภาพ วัดพื้นที่ของรูพรุนของโครงค้ำยันด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบใช้แสงขาว (BH-2, Olympus optical, Japan) ที่กำลังขยาย 10 เท่า บันทึกภาพด้วยชุดโปรแกรมถ่ายภาพ Motic Advance Image 3.2 (Motic China Group, China) วัดขนาดของรูพรุนด้วยเครื่องมือวัดพื้นที่อิสระ (irregular) โดยวัดขนาดของพื้นที่ของรูพรุนทุกวงที่มีเส้นล้อมรอบชัดเจน วัดทุกวงที่ปรากฏในภาพ ผู้วัดขนาดของรูพรุนเพียงคนเดียวและผ่านการปรับความแม่นยำในการวัดรูพรุน ด้วยการวัดภาพของขนาดพื้นที่รูพรุน 2 ครั้ง นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้สถิติทดสอบแพร์ทีเทสท์ (paired t-test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ค่าที่ได้เป็นค่าขนาดของพื้นที่รูพรุน มีหน่วยเป็นตารางไมโครเมตร นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุน วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากโครงค้ำยันแต่ละกลุ่มศึกษาด้วยสถิตินอนพาราเมตริก (non-parametric) ชนิดครูสคัลวัลลิส (Kruskal-Wallis) การเปรียบเทียบพหุคูณ โคโนเวอ อินแมน (multiple comparisons, all pairwise comparison : Conover Inman) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม สแตทส์ไดเรคท์ ฟอร์ วินโดวส์ เวอร์ชัน 2.7.2 (StatsDirect for Windows version 2.7.2)

ผลการศึกษา

การสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกรด้วยวิธีการละลายในกรดและตกตะกอนด้วยเกลือในการศึกษานี้ พบว่าหนังสุกรสดจำนวน 100 กรัม สามารถสกัดได้คอลลาเจนที่อบแห้งเยือกแข็งได้ประมาณ 0.9 กรัม และเมื่อนำคอลลาเจนดังกล่าวมาผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์และสังเคราะห์เป็นโครงค้ำยันโดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนในกรด ร้อยละ 1.5, 2 และ 2.5 กรัม และผ่านการอบเยือกแข็งที่สภาวะต่างกัน 2 สภาวะ พบว่าโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นทุกกลุ่มมีลักษณะเป็นรูพรุน

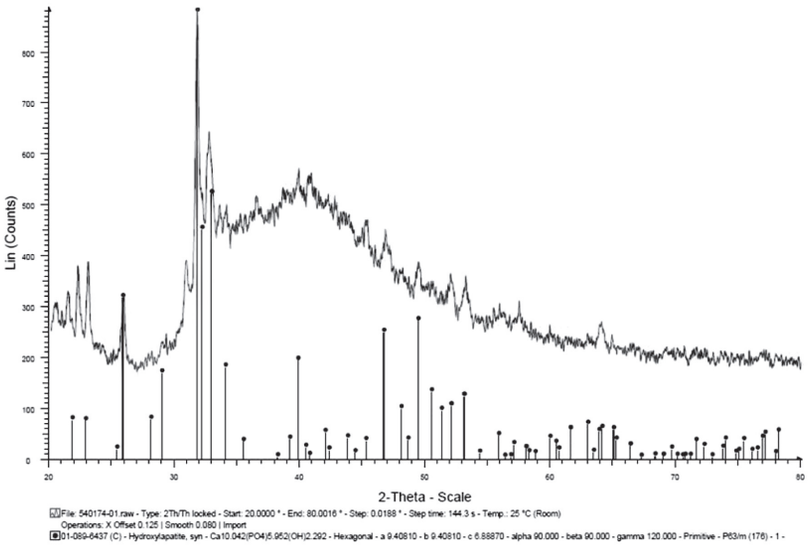


รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ (slow) และอุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว (fast)

Fig. 1 Physical characteristic of collagen mixed with hydroxyapatite scaffold fabricated from 1.5%, 2.0% and 2.5% collagen under slow and fast freezing conditions.

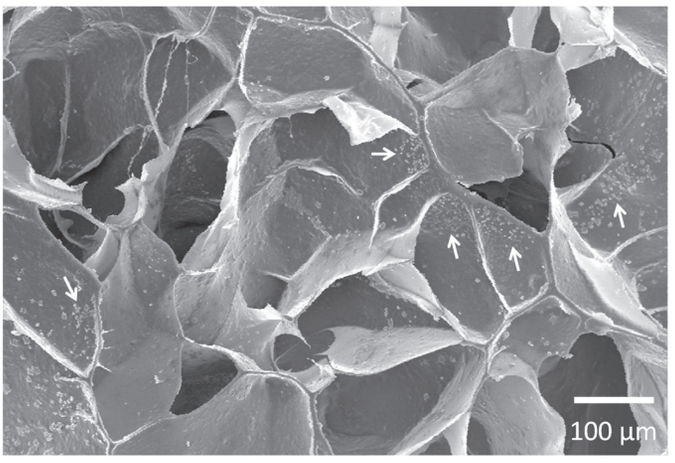
คล้ายฟองน้ำ มีสีขาว (รูปที่ 1) กดนิ่ม ไม่มีกลิ่น และเมื่อนำโครงค้ำยันเหล่านี้ไปแช่ในน้ำกลั่นก่อนทำปฏิกิริยาเชื่อมขวาง พบว่าโครงค้ำยันทุกกลุ่มมีลักษณะนิ่มเหลว ไม่คงตัว ซึ่งภายหลังจากการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางพันธะแล้ว โครงค้ำยันเหล่านี้อุ้มน้ำได้ดี กดแข็งขึ้น มีความคงตัวมากขึ้น โดยสีไม่เปลี่ยนแปลง

จากการศึกษาองค์ประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ในโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์เพื่อวิเคราะห์หาไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยวิธีวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ด้วยเครื่องเอ็กซเรย์ดิฟแฟร็กโตมิเตอร์ พบว่ามีผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นส่วนประกอบในโครงค้ำยัน (รูปที่ 2)



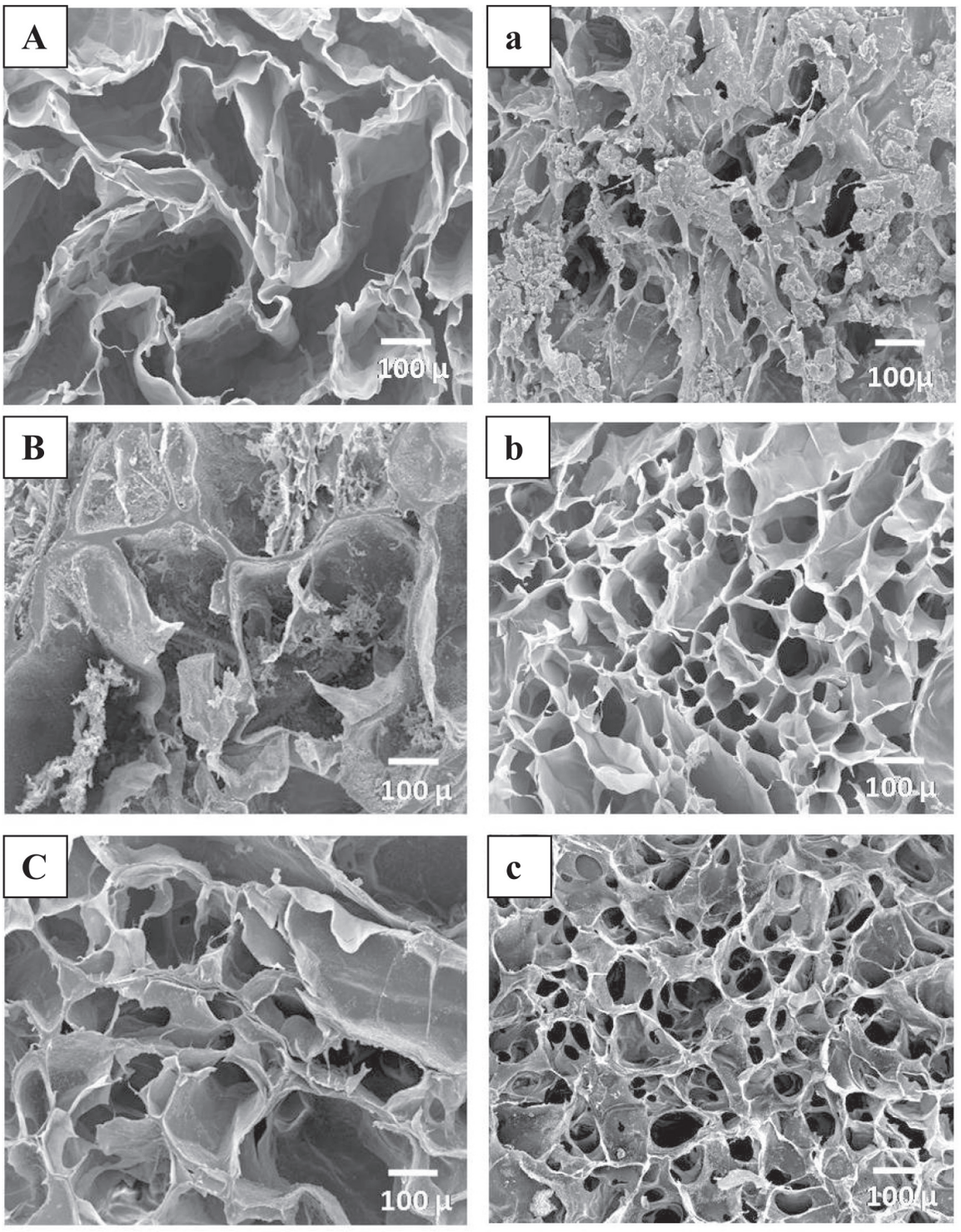
รูปที่ 2 องค์ประกอบของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ในโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ศึกษาด้วยวิธีเอ็กซเรย์ดิฟแฟร็กโตมิเตอร์

Fig. 2 Hydroxyapatite crystal in collagen mixed with hydroxyapaptite scaffold studied by X-ray diffractometer



รูปที่ 3 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ แสดงลักษณะผนังของรูพรุนมีผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์เกาะ (ลูกศรชี้)

Fig. 3 Scanning electron micrograph of collagen mixed with hydroxyapaptite demonstrates the hydroxyapatite crystals attaching at the wall of the pores. (arrows)



รูปที่ 4 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์แสดงลักษณะของรูพรุนของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

(A) โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนร้อยละ 1.5 และภายใต้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ

(a) โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนร้อยละ 1.5 และภายใต้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว

(B) โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนร้อยละ 2.0 และภายใต้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ

(b) โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนร้อยละ 2.0 และภายใต้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว

(C) โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนร้อยละ 2.5 และภายใต้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ

(c) โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนร้อยละ 2.5 และภายใต้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว

Fig. 4 Scanning electron micrographs of collagen mixed with hydroxyapaptite scaffold demonstrate the pores of the scaffold fabricated under different collagen concentrations and different freeze drying conditions.

(A) Scaffold fabricated from 1.5% collagen under slow freezing condition.

(a) Scaffold fabricated from 1.5% collagen under fast freezing condition.

(B) Scaffold fabricated from 2.0% collagen under slow freezing condition.

(b) Scaffold fabricated from 2.0% collagen under fast freezing condition.

(C) Scaffold fabricated from 2.5% collagen under slow freezing condition.

(c) Scaffold fabricated from 2.5% collagen under fast freezing condition.

ตารางที่ 1 ค่ามัธยฐานของพื้นที่รูพรุนของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

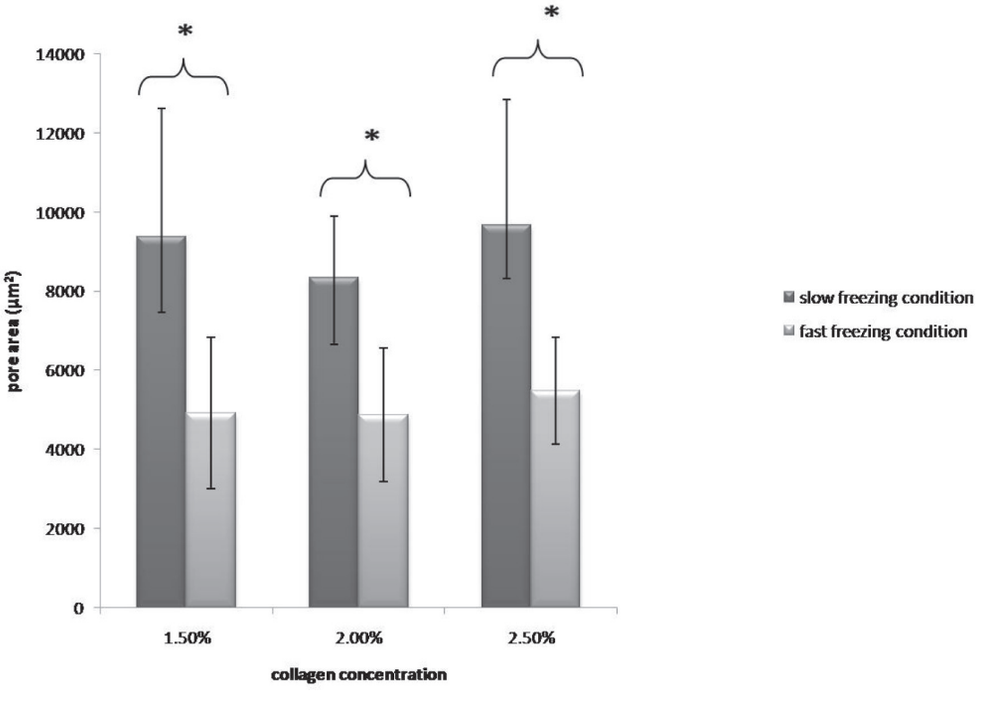
Table 1 Median of pore area of the scaffold fabricated under different collagen concentrations and different freezing conditions.

Collagen concentration	Pore area (μm^2) under slow freezing condition		Pore area (μm^2) under fast freezing condition	
	Median (I.Q)	Mean (Max-Min)	Median (I.Q)	Mean Max-Min
1.5% collagen	8,404 (10,895-7,152)	9,384 (17,467-5,642)	5,136 (6,173-3,181)	4,919 (11,421-2,045)
2.0% collagen	8,088 (9,837-6,943)	8,347 (11,078-6,126)	4,298 (6,135-3,343)	4,878 (7,604-2,430)
2.5% collagen	8,553 (10,588-7,376)	9,666 (22,118-6,901)	5,156 (6,759-4,465)	5,487 (7,906-3,673)

จากการศึกษาลักษณะของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการเชื่อมขวางแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าโครงค้ำยันเหล่านี้ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่อัดกันแน่นเป็นแผ่นและสานกันไปมาเกิดเป็นรูพรุนที่มีผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์เกาะกระจายอยู่ทั่วไปบนแผ่นคอลลาเจน (รูปที่ 3) เมื่อพิจารณาโครงค้ำยันคอลลาเจนไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เตรียมจากคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าขนาดของรูพรุนของกลุ่มที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างรวดเร็ว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนประมาณ 100 ไมโครเมตร ขณะที่กลุ่มที่ลดอุณหภูมิแช่แข็งต่ำลงอย่างช้า ๆ จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนโดยประมาณมากกว่า 100 ไมโครเมตร (รูปที่ 4)

จากการศึกษาการวัดขนาดของพื้นที่รูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบแสงขาว ก่อนการวัด ผู้วิจัยได้ทดสอบความแม่นยำในการวัด โดยวัดค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุน 2 ครั้ง แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่าค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.436$) ทำการวัดขนาดของพื้นที่รูพรุนในโครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งก่อนการอบเยือกแข็งที่สภาวะต่างกันด้วยการวัดขนาดของรูพรุนเหล่านี้ ผลการวัดแสดงไว้ในตารางที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุนของโครงค้ำยันในแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติทดสอบครูสคัลวัลลิสและการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบโคโนเวอ อินแมน พบว่าค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุนของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ ในแต่ละความเข้มข้นของคอลลาเจนมีค่าเฉลี่ยของรูพรุนมากกว่าค่าเฉลี่ยของขนาดพื้นที่รูพรุนของโครงค้ำยันที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของรูพรุนที่ผลิตขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคอลลาเจนแตกต่างกัน พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดรูพรุนไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุนของโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกันและผ่านการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน

Fig. 5 Mean of pore area of collagen mixed with hydroxyapaptite scaffold fabricated under different collagen concentrations and different freezing conditions.

วิจารณ์

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่า การใช้คอลลาเจนจากวัวทำให้มีโอกาสเสี่ยงกับการติดเชื้อโรคที่มาจากวัว จึงได้มีการสกัดคอลลาเจนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเพื่อใช้แทน เช่น สุกร[14] ม้า[27] หนังปลาทะเล[26] สำหรับการศึกษานี้ ได้เลือกที่จะสกัดคอลลาเจนจากหนังสุกร เนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูก อีกทั้งมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าโครงค้ำยันที่ผลิตจากหนังสุกร สามารถทำให้เซลล์บุหลอดเลือดเพิ่มจำนวนได้ดี[14] วิธีการสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้โดยการละลายกรดเพียงอย่างเดียว หรือใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ ซึ่งในการศึกษานี้ได้เลือกใช้การสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เพปซิน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ เอนไซม์ทำลายพันธะเพปไทด์ที่ส่วนปลายของโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้ ทำให้คอลลาเจนถูกตัดเป็นสายสั้นลง ที่เรียกว่า “อะทีโลคอลลาเจน” (atelocollagen) ดังนั้นคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการนี้จึงมีขนาดโมเลกุลสั้นกว่าวิธีการละลายคอลลาเจนด้วยกรดเพียงอย่างเดียว ข้อดีของการสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีการนี้ คือ มีการกำจัดส่วนของโมเลกุลที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายออกไป[36]

ในระยะแรกโครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่มีความคงตัวและย่อยสลายง่าย ทำให้ยากแก่การนำไปใช้ในบาดแผล เพราะไม่สามารถคงรูปเป็นโครงให้เซลล์เกิดการยึดเกาะและเคลื่อนที่ได้ ตลอดจนไม่สามารถคงรูปร่างและเก็บพื้นที่ให้กับการเจริญของเซลล์กระดูกได้ และจะส่งผลให้เกิดลักษณะการซ่อมแซมบาดแผลเป็นเนื้อเยื่อไฟบรัส โครงค้ำยันที่ดีจึงต้องมีความแข็งแรงเพื่อคงช่องว่างบริเวณบาดแผล การศึกษานี้จึงเพิ่มความคงตัวของโครงค้ำยันด้วยการเชื่อมขวางโมเลกุลของคอลลาเจนด้วยสาร 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบ-ไดไอไมด์ร่วมกับเอ็นไฮดรอกซีซักซินิไมด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคาร์โบไดไอไมด์ โดยปฏิกิริยาเชื่อมขวางที่เกิดขึ้น เกิดจากการกระตุ้นปลายคาร์บอกซิล (carboxyl terminus) ของเส้นใยคอลลาเจนให้ทำปฏิกิริยากับปลายอะมิโนของเส้นใยคอลลาเจนอื่นที่อยู่ใกล้เคียง ทำให้เกิดการเชื่อมโยงพันธะ โครงค้ำยันคอลลาเจนที่ได้จึงมีความแข็งแรงและคงตัวมากขึ้น[37] อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่าสาร 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดไอไมด์ร่วมกับเอ็นไฮดรอกซีซักซินิไมด์ มีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์และเนื้อเยื่อ[24,38]

โครงค้ำยันที่ผลิตจากคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นวัสดุทางชีวภาพที่มีความเหมาะสมกับการนำมาใช้ซ่อมแซมแผลกระดูก มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์มีสมบัติทางกลและอัตราการย่อยสลายเหมาะสมกว่าการใช้คอลลาเจนอย่างเดียวในการผลิตโครงค้ำยันเลี้ยงเซลล์[39] และมีการศึกษาใช้โครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในการเสริมกระดูกขากรรไกร จากนั้นประเมินผลทางจุลกายวิภาค 1 ปี พบว่ามีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพเป็นอย่างมาก[40]

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่า โครงค้ำยันคอลลาเจนผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์หลังการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่อัดกันแน่นเป็นแผ่น ผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ติดอยู่ที่ผนังของรูพรุน เมื่อศึกษาขนาดของรูพรุนด้วยการตัดเป็นแผ่นบางแล้วดูด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบแสงขาว พบว่าเมื่อความเข้มข้นของคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น ค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุนที่ได้ไม่แตกต่าง ซึ่งผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Tierney และคณะ[41] ที่พบว่าความเข้มข้นของคอลลาเจนมีผลกับขนาดของรูพรุน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษานี้ใช้คอลลาเจนที่มีความเข้มข้นมากกว่า คือ ใช้คอลลาเจนร้อยละ 1.5 กรัมขึ้นไป ในขณะที่การศึกษาของ Tierney และคณะ ใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนเพียงร้อยละ 0.25-1 กรัมเท่านั้น อีกทั้งวิธีการวัดขนาดของรูพรุนก็แตกต่างกัน โดย Tierney และคณะ ใช้วิธีการวัดขนาดของรูพรุนจากค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางที่กว้างที่สุดและแคบที่สุดของรูพรุน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบได้ อย่างไรก็ตาม ขนาดของรูพรุนที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบแสงขาวมีรูปร่างคล้ายวงรี ไม่สม่ำเสมอ ทำให้การใช้ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนไม่มีความเหมาะสมเท่าที่ควร การศึกษานี้จึงใช้ขนาดของพื้นที่ เพื่อเป็นตัวแทนขนาดของรูพรุน

เมื่อพิจารณาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดถึงขนาดของรูพรุนที่เกิดจากการใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่แตกต่างกันทั้งสองสภาวะพบว่ากลุ่มที่ลดอุณหภูมิแช่แข็งอย่างช้า ๆ จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนมากกว่า 100 ไมโครเมตร ซึ่งต่างจากกลุ่มที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างรวดเร็วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนประมาณ 100 ไมโครเมตร ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของรูพรุนจากการศึกษาของ Kang และคณะ[42] ที่ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการแช่แข็งโครงค้ำยันเจลลาตินที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส -80 องศาเซลเซียส และแช่ในไนโตรเจนเหลว มีค่าเฉลี่ยของรูพรุน 250 ± 120 85 ± 35 และ 45 ± 5 ไมโครเมตร ตามลำดับ

และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุนเมื่อศึกษาด้วยวิธีการตัดเป็นแผ่นบางแล้วดูด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบแสงขาว พบว่าค่าเฉลี่ยของพื้นที่รูพรุนมีความสอดคล้องกับสภาวะของอุณหภูมิแช่แข็งที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างรวดเร็วจะทำให้ขนาดของพื้นที่รูพรุนของโครงค้ำยันมีค่าน้อยกว่าการใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างช้า ๆ เช่นเดียวกันกับการศึกษาอื่น ๆ[5,34,42] เนื่องจากเมื่อใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างช้า ๆ มีจำนวนผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นน้อย และขยายขนาดใหญ่ขึ้นแทรกซึมเข้าไประหว่างเส้นใยคอลลาเจนจึงทำให้เกิดรูพรุนขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของโครงค้ำยันที่ใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่ำลงอย่างรวดเร็ว[42]

สำหรับผลการศึกษาถึงขนาดรูพรุนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ Itala และคณะ[6] พบว่าขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำสุดประมาณ 75-100 ไมโครเมตร ในขณะที่การศึกษาของ Oh และคณะ[43] พบว่าขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ประมาณ 300-400 ไมโครเมตร ซึ่งภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดพบว่าขนาดรูพรุนของโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์ขึ้นอยู่ในช่วงดังกล่าว จึงนับว่าโครงค้ำยันคอลลาเจนจากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในการศึกษานี้มีขนาดรูพรุนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก

อย่างไรก็ตามโครงค้ำยันที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้ยังมีข้อบกพร่องบางประการ เช่น การกระจายของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผนังของรูพรุน และขนาดของรูพรุนที่ได้ยังไม่สม่ำเสมอ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาต่อ สำหรับการขึ้นรูปโครงค้ำยันให้ได้ขนาดของรูพรุนที่สม่ำเสมอนี้ O'Brien และคณะ[34] รายงานว่าการลดอุณหภูมิแช่แข็งในการผลิตโครงค้ำยันให้คงที่จะทำให้ขนาดของรูพรุนที่ได้สม่ำเสมอ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ทำการทดสอบและพัฒนาโครงค้ำยันในระยะต่อไป

โครงค้ำยันที่สังเคราะห์จากคอลลาเจนที่ได้จากหนังสุกรผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ในการศึกษานี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางทันตกรรมได้หลายสาขา เช่น ศัลยกรรมปริทันต์ที่มีการทะลุของกระดูก ศัลยกรรมกระดูกในขากรรไกรและใบหน้าจากสาเหตุอุบัติเหตุหรือการตัดเนื้องอกใช้ทดแทนกระดูกที่สูญเสียไปมากภายหลังจากการถอนฟันเพื่อคงสภาพของสันเหงือก งานทันตกรรมรากเทียม และงานรักษาคลองรากฟัน ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นวัสดุกั้นรูเปิดปลายรากฟันที่เปิดกว้างในการทำเอเพคซิฟิเคชัน (apexification) ก่อนทำการอุดด้วยมิเนอรัลไตรออกไซด์แอกกริเกต หรือเอ็มทีเอ (Mineral Trioxide Aggregate; MTA) แทนการใช้แผ่นเยื่อคอลลาเจนซึ่งมีราคาแพง

สรุป

คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังสุกร เมื่อนำไปผสมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ สามารถนำไปผลิตเป็นโครงค้ำยันด้วยวิธีอบแห้งเยือกแข็ง โดยใช้สาร 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-คาร์โบไดไอไมด์ร่วมกับเอ็นไฮดรอกซีซักซินิไมด์เป็นตัวเชื่อมพันธะ โดยอัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการแช่แข็งมีผลต่อขนาดรูพรุน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์ไพพรรณ พิทยานนท์ ที่ให้คำปรึกษาด้านสถิติ เจ้าหน้าที่ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา ศูนย์วิจัยชีววิศวกรรมและทดสอบวัสดุทางการแพทย์ ศูนย์วิจัยทันตวัสดุและศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ

เอกสารอ้างอิง

1. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. J Clin Periodontol. 1980;7:96-105.
2. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol. 1982;9:290-6.
3. Rankow HJ, Krasner PR. Endodontic applications of guided tissue regeneration in endodontic surgery. J Endod. 1996;22:34-43.
4. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. Ann Biomed Eng. 2004;32:148-59.
5. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterials. 2005;26:

433-41.

6. Itala AI, Ylanen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT. Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. J Biomed Mater Res. 2001;58:679-83.
7. Lien SM, Ko LY, Huang TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. Acta Biomater. 2009;5:670-9.
8. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2010;31:461-6.
9. Saber SE. Tissue engineering in endodontics. J Oral Sci. 2009;51:495-507.
10. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials. 2007;28:3587-93.
11. Yunoki S, Nagai N, Suzuki T, Munekata M. Novel biomaterial from reinforced salmon collagen gel prepared by fibril formation and cross-linking. J Biosci Bioeng. 2004;98:40-7.
12. Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. J Oral Implantol. 2002; 28:220-5.
13. Kanungo BP, Silva E, Van Vliet K, Gibson LJ. Characterization of mineralized collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone regeneration. Acta Biomater. 2008;4:490-503.
14. Xu Y, Wu J, Guan J, Zhang X, Li Z, Wang P, et al. Physiochemical and biological properties of modified collagen sponge from porcine skin. Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci Ed. 2009;24:619-26.
15. Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:933-7.
16. Park SN, Lee HJ, Lee KH, Suh H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. Biomaterials. 2003;24:1631-41.
17. DelBalso AM, Adrian JC. Collagen gel in osseous defects. A preliminary study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1976;42:562-9.
18. Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. Biomaterials. 2003;24:759-67.
19. Weadock KS, Miller EJ, Bellincampi LD, Zawadsky JP, Dunn MG. Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. J Biomed Mater Res. 1995;29:1373-9.
20. Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. Biomaterials. 1996;17:471-84.
21. Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. Adv Drug Deliv Rev. 2003;55:1613-29.
22. Huang-Lee LL, Cheung DT, Nimni ME. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. J Biomed Mater Res. 1990;24:1185-201.
23. Pieper JS, Oosterhof A, Dijkstra PJ, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. Biomaterials. 1999;20:847-58.
24. Wissink MJ, Beernink R, Pieper JS, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, et al. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. Biomaterials. 2001;22:151-63.
25. Lupi O. Prions in dermatology. J Am Acad Dermatol. 2002;46:790-3.
26. Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, Walsh D, Mann S. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of Pagrus major and Oreochromis

niloticas. Int J Biol Macromol. 2003;32:199-204.
27. Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, et al. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. Biomaterials. 2004;25:2831-41.
28. Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G. In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. Biomaterials. 1993;14:97-106.
29. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. Biomaterials. 2003;24:2161-75.
30. Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA, et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials. 2003;24:4987-97.
31. Wu TJ, Huang HH, Lan CW, Lin CH, Hsu FY, Wang YJ. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. Biomaterials. 2004;25:651-8.
32. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials. 2000;21:2529-43.
33. Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. Eur Cell Mater. 2006;11:43-56.
34. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. Biomaterials. 2004;25:1077-86.
35. Rousseau CF, Gagnieu CH. In vitro cytocompatibility of porcine type I atelocollagen crosslinked by oxidized glycogen. Biomaterials. 2002;23:1503-10.
36. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004;71:343-54.
37. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. Biomaterials. 1996;17:765-73.
38. van Wachem PB, van Luyn MJ, Olde Damink LH, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P. Tissue regenerating capacity of carbodiimide-crosslinked dermal sheep collagen during repair of the abdominal wall. Int J Artif Organs. 1994;17:230-9.
39. Song JH, Kim HE, Kim HW. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007;83:248-57.
40. Mehlisch DR, Leider AS, Roberts WE. Histologic evaluation of the bone/graft interface after mandibular augmentation with hydroxylapatite/purified fibrillar collagen composite implants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990;70:685-92.
41. Tierney CM, Haugh MG, Liedl J, Mulcahy F, Hayes B, O'Brien FJ. The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering. J Mech Behav Biomed Mater. 2009;2:202-9.
42. Kang HW, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials. 1999;20:1339-44.
43. Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. Biomaterials. 2007;28:1664-71.

Fabrication and characterization of porcine collagen/hydroxyapatite scaffold

Sukuntha Phuaknapho D.D.S.[1]
Chantavat Sutthiboonyapan D.D.S., Cert. in Endodontics, M.S., Diplomate, Thai Board of Endodontics[2]
Somporn Swasdison D.D.S., Cert. in Pathology, Ph.D.[3]

[1]Graduate Student, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
[2]Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
[3]Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstracts

Objective To fabricate and characterize collagen scaffolds from porcine skin collagen mixed with hydroxyapatite for using as scaffolds in guided bone regeneration.

Materials and methods The collagen used in this study was extracted from porcine skin by dissolving in acid-enzyme mixture and salt precipitation. Three different concentrations (1.5% 2% and 2.5% by weight) of the extracted collagen solutions were mixed with hydroxyapatite at the ratio of hydroxyapatite : collagen = 1:10 (weight/volume). The collagen-hydroxyapatite mixtures were fabricated to sponge-like scaffolds by 24-hour freeze drying method under 2 conditions, slow freezing and fast freezing. The fabricated scaffolds were then cross-linked to increase their stability. Ultrastructural characteristics of the scaffolds prepared by different conditions were studied using scanning electron microscopy. Determination of the scaffold pore sizes was performed under the light microscope and the data were statistically analyzed.

Results All collagen/hydroxyapatite scaffolds fabricated in this study were sponge-like, soft, white, odorless and easily dissolved in water. Cross-linking of these scaffolds helped increasing their stability. These scaffolds were porous under scanning electron microscopic observation. The walls of the pores were made up of interconnecting sheaths of tightly packed collagen fibers with hydroxyapatite crystals decorated at the surface. The pore sizes of scaffolds prepared from different collagen concentrations were not statistically different ($p > 0.05$) while the pore sizes of the scaffolds prepared under different freezing conditions were statistically different ($p < 0.05$). The scaffolds prepared under slow freezing condition had larger pore sizes than those prepared under fast freezing condition.

Conclusion Porcine skin collagen mixed with hydroxyapatite can be fabricated to porous scaffold by freeze drying and cross-linking techniques. The morphological characteristics and the pore sizes of scaffolds were related to the rate of freezing condition but not to collagen concentration.

(CU Dent J. 2012;35:1-14)

Key words: *hydroxyapatite; porcine skin collagen; scaffold; tissue engineering*