

ผลของสารละลายโครงร่างสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์สามมิติ
ต่อเซลล์ปฐมภูมิกระดูกมนุษย์
Effect of 3D-printed nano hydroxyapatite solution on
primary human osteoblast cells

สุนทรีย์ บุญนาดี¹, อุทัยวรรณ อารยะตระกูลลิขิต², พูนศักดิ์ ภิเศก³,
ธิดารัตน์ อังวรารวงค์⁴ และ จินตมัย สุวรรณประทีป⁵

¹นักศึกษาระดับปริญญาโทภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์ 098-1033683 e-mail: soontaree_dt30@hotmail.com

²ผศ.ดร. สาขาวิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น e-mail: uthaiara@hotmail.com

³รศ.ดร. สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น e-mail: poonsakpisek@yahoo.com

⁴ผศ.ดร. สาขาวิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵ดร. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

บทคัดย่อ

วัสดุชีวภาพ (Biomaterial) ถูกนำมาใช้เป็นโครงร่างปลูกถ่ายทดแทนกระดูกตนเอง (Autologous bone grafting) เพื่อหลีกเลี่ยงการผ่าตัดเพิ่มเติมในตำแหน่งของการนำกระดูกตนเองมาใช้ ลดเวลาในการรักษา และภาวะแทรกซ้อน ปัจจุบันมีการพัฒนาวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ในการทำหน้าที่เป็นโครงร่างปลูกถ่ายทดแทน อย่างไรก็ตามการนำโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติมาใช้ ยังไม่มีการรายงานผลกระทบในด้านความเป็นพิษและการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ (3D-printed nano HA ,MTEC, Thailand) ต่อความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์กระดูกมนุษย์ร่วมกับสารละลายวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% Cell Viability) ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ผลการศึกษาพบว่าวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สรุปได้ว่าวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกมนุษย์ ดังนั้นน่าจะเหมาะในการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการทำหน้าที่เป็นโครงร่างปลูกถ่ายทดแทนบริเวณที่เกิดความพิการของกระดูกในอนาคต

คำสำคัญ: เครื่องพิมพ์สามมิติ, ไฮดรอกซีอะพาไทต์, เซลล์ออสติโอบลาสต์, ความมีชีวิตของเซลล์

Abstract

Biomaterial has been used as an alternative to autologous bone grafting with an attempt to avoid reconstruction and replacing skeletal defect and also reduce treatment time and complications. Recent development technology has advocated the construction of 3D-

printed nanohydroxyapatite (3D-printed nano HA). Due to lacking of study in cell biocompatibility, the objective of this study was to investigate the osteoblast cell biocompatibility on 3D-printed nano HA and HA. Human osteoblast cells were cultured and fostered on two material frameworks: 3D-printed nano HA (MTEC, Thailand), and HA (Sigma-aldrich, USA). Material concentrations were classified into 0, 20, 40, and 80 mg/ml, and incubation time was grouped as 24, 48, and 72 hours. Cell viability was determined by MTT assay. One-way ANOVA was performed to investigate the significant differences. The result showed there was no significant difference of cell viability between 3D-printed nano HA and HA amongst various concentrations and incubation time ($p > 0.05$). Conclusively, 3D-printed nano HA with no toxicity has good biocompatibility to primary human alveolar bone cells. Thus 3D-printed nano HA may be advantageous for hard tissue repair.

Keywords: 3D-Printed, nanohydroxyapatite, osteoblast cell, cell viability, cell biocompatibility

1. บทนำ

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) เป็นรูปแบบหนึ่งของแคลเซียมฟอสเฟต เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ไม่ก่อให้เกิด ความเป็นพิษ เกิดกระบวนการอักเสบ และไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลต่อความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับส่วนประกอบอนินทรีย์ของกระดูก (Yoshikawa et al., 2005; Zhou et al., 2011; Shepherd et al., 2012; Balázs et al., 2007; Heise et al., 1990; Currey, 2001) ไฮดรอกซีอะพาไทต์เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในการใช้ปลูกถ่ายทดแทนบริเวณที่เกิดความพิการของกระดูก ใช้ในงานศัลยกรรมช่องปากและแมกซิลโลเฟเชียล (Miura et al., 2012) ใช้ในการเคลือบพื้นผิวรากเทียม (Nikolidakis et al., 2006) เป็นต้น โดยทั่วไปไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถขึ้นรูปได้หลายวิธี เช่น วิธีไฮโดรเทอร์มัล (Hydrothermal processes), วิธีเชิงกลร่วมเคมี (Mechanochemical techniques), วิธีทางเคมีแบบเปียก (Wet chemistry), วิธีโซล-เจล (Sol-gel synthesis) และ วิธีให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave processing) เป็นต้น (Sadat-Shojai et al., 2013; Šupová, 2015; Jadalannagari et al., 2011; Dhand et al., 2014) ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการขึ้นรูปด้วยอุณหภูมิสูง มีประสิทธิภาพในการเป็นโครงร่างชักนำ (Osteoconductive) ให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกทดแทนได้เป็นอย่างดี แต่กลับพบว่ามีอัตราการสลายตัวค่อนข้างต่ำและใช้เวลานาน เนื่องจากลักษณะของโครงร่างผลึกที่ยึดเกาะกันแน่น ทั้งยังพบการหดตัวของวัสดุร่วมด้วย (Benhayoune et al., 2000; Dorozhkin, 2011)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องพิมพ์สามมิติ (3D-printed) ขึ้น เป็นเครื่องที่ใช้กระบวนการเติมเนื้อวัสดุลงไปทีละชั้นเพื่อทำให้เกิดรูปร่างสามมิติ โดยอาศัยข้อมูลในรูปแบบดิจิทัล (Ventola, 2014; Shirazi et al., 2015; Bandyopadhyay et al., 2015) ทางด้านวิศวกรรมชีวเวช (Biomedical engineering) และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เริ่มมีการนำเครื่องพิมพ์สามมิติ เข้ามาประยุกต์ใช้ในการสร้างวัสดุชีวภาพและวัสดุทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถออกแบบและผลิตได้รวดเร็ว ควบคุมได้ทั้งขนาด รูปร่าง รูปทรง การใช้เครื่องพิมพ์สามมิติร่วมกับการใช้อุณหภูมิต่ำสามารถขึ้นรูปไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีโครงสร้างระดับนาโน (Nanohydroxyapatite) มีการยึดเกาะของผลึกอย่างหลวมๆ เกิดการสลายตัวได้เร็วกว่าเมื่อเทียบกับการขึ้นรูปด้วยการใช้อุณหภูมิสูง (Suwanprateeb et al., 2009; Suwanprateeb et al., 2016) ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) เริ่มต้นพัฒนาโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูป

ด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ จากการออกแบบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ สามารถควบคุมได้ทั้งขนาดรูปร่างและรูพรุนของวัสดุ ทำการขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติภายใต้อุณหภูมิต่ำ เพื่อให้ได้โครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีการยึดเกาะของผลึกอย่างหลวมๆ โครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ มีคุณสมบัติทางกลที่ดี มีความต้านทานต่อการแตกหักและโค้งงอสูง (Suwanprateeb et al., 2009) ปัจจุบันมีความพยายามในการพัฒนาโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ในการทำหน้าที่ปลูกถ่ายทดแทนบริเวณที่เกิดความพิการของกระดูก

จึงเกิดคำถามทางงานวิจัยขึ้นว่า หากนำโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติใช้เป็นวัสดุทดแทน หรือนำมาใช้กับเซลล์กระดูกมนุษย์ที่เป็นปฐภูมิเซลล์ จะส่งผลอย่างไรต่อความมีชีวิตของเซลล์

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลกระทบของวัสดุโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติต่อความมีชีวิตของเซลล์ปฐภูมิกระดูกมนุษย์

3. วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการพิจารณาและอนุมัติด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่โครงการ HE622091 เซลล์กระดูกมนุษย์เตรียมจากอาสาสมัครที่มารับการรักษาด้วยการถอนฟันหรือผ่าฟันคุด ในตำแหน่งฟันกรามซี่ที่ 3 ในคลินิกศัลยศาสตร์และกระดูกขากรรไกร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยหลังผ่าฟันคุดหรือถอนฟันจะนำกระดูกเข้าฟันตำแหน่งนั้นออกมาเพื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก โดยมีวิธีการพอสั่งเข็บดังนี้ ล้างชิ้นกระดูกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ (PBS) 2-3 ครั้ง และตัดให้มีขนาด 1x1x1 มิลลิเมตร วางบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร (Corning, NY, USA) เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco® BRL, NY, USA), ซีรัม (Fetal bovine serum; FBS, Gibco® BRL, NY, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 15, L-glutamine (Gibco® BRL, NY, USA) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, penicillin G ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม (Gibco® BRL, NY, USA) บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ทำการเพาะเลี้ยง (Subculture) ไปยังจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาด 60 มิลลิเมตร (Corning, NY, USA) ด้วย Trypsin-EDTA (Gibco® BRL, NY, USA) ร้อยละ 0.25 ถือเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 โดยเซลล์ที่จะนำมาใช้ในการศึกษาเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-6

เตรียมวัสดุโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยโลหะและวัสดุแห่งชาติ ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA; Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก โดยวัสดุที่ได้จะผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการอบแก๊สเอทิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide) ภายหลังสิ้นสุดการอบแก๊สปล่อยวัสดุโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ และไฮดรอกซีอะพาไทต์ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อระบายสารตกค้าง ก่อนนำมาใช้ในการศึกษา

นำเซลล์ปฐมภูมิกระดูกมนุษย์มาหว่านใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Transwell® (Corning, NY, USA) ชนิด 24 หลุม โดยหว่านเซลล์ในชั้นล่างของ Transwell® ที่ความหนาแน่น 20,000 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดไม่มีซีรัม (Serum free media) 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่วโมง เพื่อล้างซีรัมออก บ่มเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดไม่มีซีรัมต่อจนครบเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบเซลล์กระดูกมนุษย์ด้วยการนำวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ และ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางไว้ชั้นบนของ Transwell® แบบ 24 หลุม เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 และกลุ่มที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดไม่มีซีรัม (ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่เติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO; Analar® grade, Poole, Dorset, UK) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ก่อนครบกำหนดเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ 1 ครั้ง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดไม่มีฟีนอลเรด (Phenol red) ผสมกับสารละลายเอ็มทีที (MTT solution, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 450 ไมโครลิตร บ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์จนครบเวลาของการทดสอบ เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและละลายผลึกฟอมาแซน (Formazan) ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ผสมไกลซีนบัฟเฟอร์ (Glycine buffer) หลุมละ 450 ไมโครลิตร วางจานเพาะเลี้ยงเซลล์บนเครื่องเขย่าให้สีของสารละลายเข้ากัน อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (Microplate reader, Thermo scientific, Waltham, MA, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละกลุ่มการทดลองไปหาค่าเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยที่ได้จะถูกคำนวณเป็นร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ โดยจะคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ในกลุ่มทดลองหารด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ในกลุ่มสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่มที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ไม่มีซีรัม) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากเซลล์กระดูกมนุษย์ของอาสาสมัครจำนวน 3 ราย

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อทดสอบด้วยสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับกลุ่มสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่มควบคุม) ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS v20: IBM Crop. Somers, NY, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

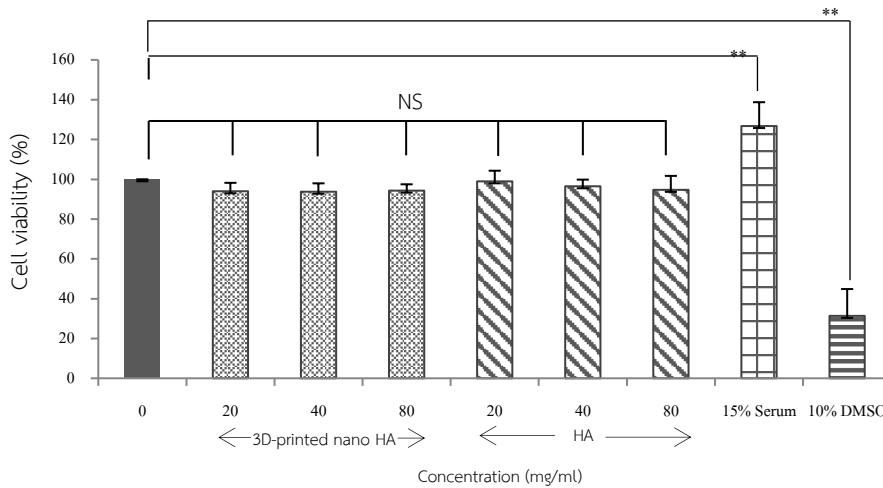
4. ผลการวิจัย

พบว่าสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม) ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และในกลุ่มควบคุมที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 พบว่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์สูงกว่ากลุ่มสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ความเข้มข้น 20, 40 และ 80

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ทั้งในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกลุ่มที่เติมสารละลายไฮดรอกซีอะพาไทต์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ทั้งในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

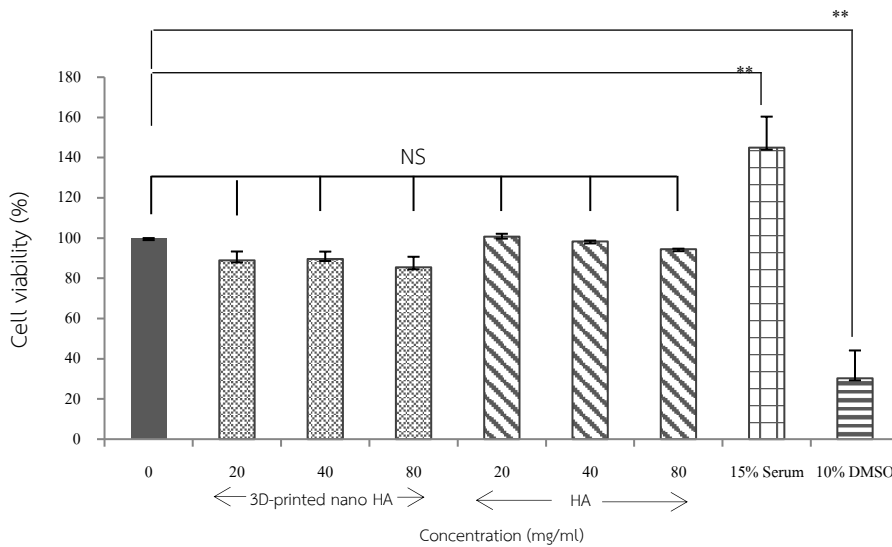
นอกจากนี้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกรังพบว่าการละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับสารละลายไฮดรอกซีอะพาไทต์ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยผลการวิจัยพบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ปฐมภูมิกระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 100, 93.98, 93.75 และ 94.30 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมบวกรัง) มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตคิดเป็นร้อยละ 98.95, 96.64 และ 94.69 ตามลำดับ (รูปที่ 1)



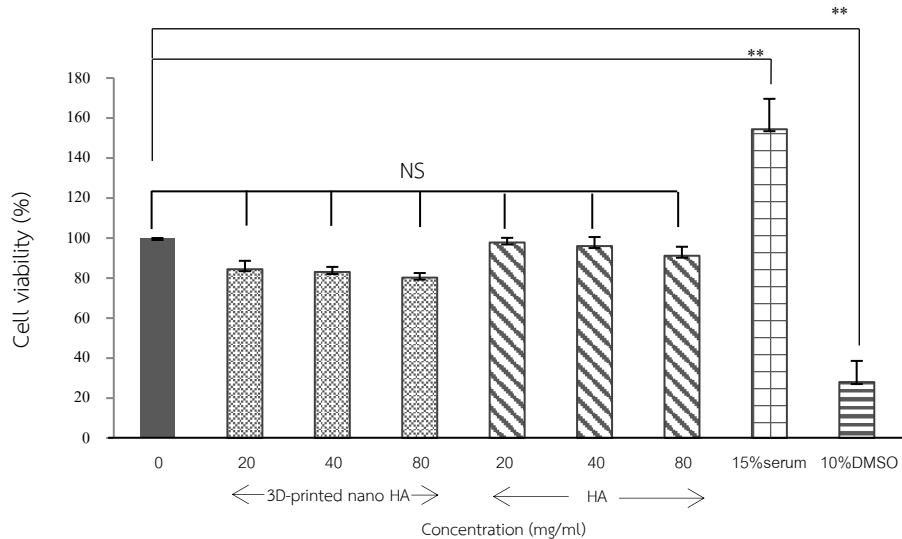
รูปที่ 1 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ (3D-printed nano HA) และ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีเอ็มทีที ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$, **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$, NS แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$)

ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์กระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายวัสดุโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 100, 88.92, 89.60 และ 85.46 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 100.72, 98.33 และ 94.47 ตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสารละลายโครงร่างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ (3D-printed nano HA) และ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีเอ็มทีที ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง
 (*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$, **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$,
^{NS}แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$)

ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์กระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายวัสดุโครงร่างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 100, 84.49, 83.03 และ 80.21 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรคิดเป็นร้อยละ 97.77, 95.98 และ 91.14 ตามลำดับ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสารละลาย โครงสร้างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ (3D-printed nano HA) และ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีเอ็มทีที ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

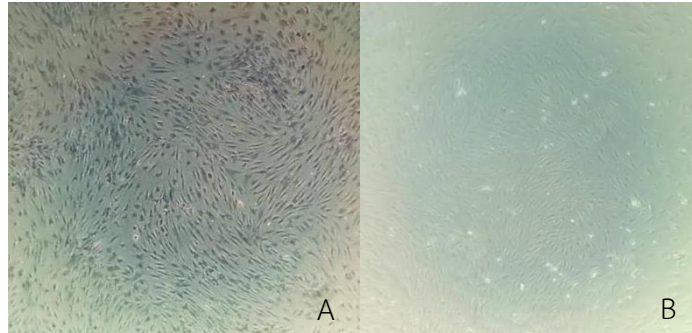
(*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$, **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$,
^{NS}แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$)

5. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สารละลายวัสดุโครงสร้างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก ความมีชีวิตของเซลล์กระดูกมนุษย์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน นั่นแสดงว่า สารละลายวัสดุโครงสร้างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกมนุษย์ มีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพกับเซลล์ เซลล์กระดูกมนุษย์สามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับในกลุ่มสารละลายไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก เพราะเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตวัสดุทางการแพทย์

โครงสร้างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ภายใต้อุณหภูมิต่ำ มีการยึดเกาะของผลึกอย่างหลวมๆ เกิดการสลายตัวได้เร็วกว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการดั้งเดิม เหมาะในการนำมาใช้ปลุกถ่ายทดแทนบริเวณที่เกิดความพิการของกระดูก การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงผลของโครงสร้างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพในเซลล์กระดูกมนุษย์ที่แยกได้จากกระดูกขากรรไกรมนุษย์ การศึกษานี้เลือกใช้เซลล์ปฐมภูมิกระดูกมนุษย์ เนื่องจากมีคุณสมบัติเหมือนเซลล์กระดูกที่อยู่ในร่างกายมนุษย์ทุกประการ มีความไวต่อผลกระทบของสารพิษมากกว่าเซลล์ไลน์ (cell line) ซึ่งได้รับการสอดแทรกด้วยยีนกลายพันธุ์เหมาะสำหรับใช้เป็นแบบในการศึกษาสรีรวิทยาปกติในกระดูก (Czekanska et al., 2012) ความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพของโครงสร้างปลุกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์กระดูกมนุษย์ ในการศึกษานี้ใช้วิธีการวัดค่าความมีชีวิตของเซลล์ (Viability) ด้วยวิธีเอ็มทีที โดยเซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ปกติ เอนไซม์ซัคซิเนตดีไฮโดรจีเนส

(Succinate-dehydrogenase) ในไซโทรมโคมปีและซี จากไมโทคอนเดรียจะมีความสามารถในการรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้เป็นผลึกฟอร์มazan ที่มีลักษณะเป็นผลึกสีม่วง ส่งผลให้ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมีสีม่วง (รูปที่ 4A) แต่เซลล์ที่ตายแล้วจะมีลักษณะใสไม่มีสี (รูปที่ 4B) เมื่อนำมาละลายในตัวทำละลาย เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ จะได้สารละลายสีม่วง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) นำมาคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ เป็นวิธีที่สะดวก ถูกต้อง รวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อย (Mosmann, 1983)



รูปที่ 4 (A) แสดงผลึกฟอร์มazanจากเซลล์กระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ภายหลังบ่มร่วมกับสารละลายเอ็มทีทีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) เซลล์กระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ภายหลังบ่มร่วมกับสารละลายเอ็มทีทีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบมีลักษณะใสไม่มีสี ภายใต้อำนาจขยาย 50 เท่า

โครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ มีลักษณะการเกาะกันของผลึกอย่างหลวมๆ มีน้ำหนักเบา มีส่วนประกอบหลักคือแคลเซียมและฟอสเฟต ในการศึกษาที่ใช้ปริมาณโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของแคลเซียม 0.5, 1 และ 2 โมลาร์ ตามลำดับในปี ค.ศ.2005 Maeno และคณะ ศึกษาถึงผลจากความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน ต่อความมีชีวิต การเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการพัฒนาเปลี่ยนแปลงในการสร้างกระดูก (Osteogenic differentiation) ของเซลล์กระดูกในวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 1 ชั้น และแบบสามมิติ จากการศึกษาพบว่าเซลล์กระดูกเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 2-6 มิลลิโมลาร์ เซลล์กระดูกสามารถคงความมีชีวิต และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม แต่หากความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน เพิ่มสูงมากกว่า 10 มิลลิโมลาร์ จะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์กระดูกจะไม่สามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ (Maeno et al., 2005) ในปี ค.ศ.2010 Nakamura และคณะ ศึกษาถึงผลจากความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน ต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงในการสร้างกระดูกในเซลล์กระดูก จากการศึกษาพบว่าเซลล์กระดูกเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 1.8-50 มิลลิโมลาร์ เซลล์กระดูกก็ยังสามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้และเกิดการพัฒนาเปลี่ยนแปลงในการสร้างกระดูกได้อีกด้วย (Nakamura et al., 2010) แต่ในการศึกษานี้เซลล์กระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับโครงสร้างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ และไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งมีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงถึง 0.5, 1 และ 2 โมลาร์ กลับมีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุที่เป็นเช่นนั้นเพราะ

โครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ในการศึกษานี้ใช้รูปแบบเป็นโครงร่างปลูกถ่าย (Scaffold) รูปทรงกระบอกขนาด 2 มิลลิเมตร ส่วนไฮดรอกซีอะพาไทต์ ใช้รูปแบบเป็นผง วางอยู่บน Transwell® ซึ่งมีเยื่อแผ่นโพลีเอสเตอร์ (Polyester Membrane) ขนาดรูพรุน 8 ไมครอน โดย Transwell® จะแช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ตลอดการศึกษา อาหารเลี้ยงเซลล์จะทำหน้าที่ละลายแคลเซียมไอออน จากโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ และไฮดรอกซีอะพาไทต์ ผ่านเยื่อแผ่นโพลีเอสเตอร์ออกมาทำปฏิกิริยาต่อเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จริงนั้นไม่ได้สูงมากพอที่จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์จนเซลล์ไม่สามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ ต่างจากการศึกษาของ Maeno และ Nakamura ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน ตามที่ระบุไว้ในการศึกษาโดยตรง จากการศึกษาแล้วยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกมนุษย์ร่วมกับโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไปกลับพบว่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามระยะเวลานั้น เป็นเพราะอาหารเลี้ยงเซลล์ทำหน้าที่ในการละลายแคลเซียมไอออน จากโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ และไฮดรอกซีอะพาไทต์ออกมาตลอดเวลา ส่งผลต่อความเข้มข้นโดยรวมของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สูงขึ้นเรื่อยๆ จนส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ดังนั้นร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงสูงกว่าที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Bertazzo และคณะในปี ค.ศ.2010 ทำการศึกษาโดยใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ปริมาณ 0.03 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ pH 7 เป็นเวลา 30 วัน ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ด้วยวิธี ICP-OES พบว่า แคลเซียมไอออนสามารถเกิดการละลายออกมาจากไฮดรอกซีอะพาไทต์เรื่อย ๆ จนถึงระยะเวลา 15 วัน โดยแคลเซียมไอออน สามารถละลายออกมาได้สูงที่สุดในวันแรกและสามารถละลายออกมาได้อีกเรื่อย ๆ จนถึงระยะเวลา 15 วัน (Bertazzo et al., 2010) จากการศึกษาพบว่า เซลล์กระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ มีร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติในทุกระยะเวลา เพราะไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ใช้ในการศึกษานี้ขึ้นรูปด้วยวิธีการดั้งเดิม แม้จะมีลักษณะเป็นผงแต่ก็มีการจับตัวกันของผลึกที่แน่น ทำให้เกิดการละลายออกมาได้ช้ากว่าโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติที่มีลักษณะการยึดเกาะของผลึกอย่างหลวมๆ

จากการศึกษานี้พบว่าเซลล์กระดูกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่มีสารละลายโครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่มที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นแล้วยังแตกต่างกับกลุ่มควบคุมบวก ซึ่งเป็นกลุ่มของสารละลายไฮดรอกซีอะพาไทต์ข ซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตวัสดุทางการแพทย์ อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจากการทดลองนี้สรุปได้ว่า โครงร่างปลูกถ่ายประเภทสังเคราะห์ชนิดไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และ มีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกมนุษย์ อาจเหมาะในการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการทำหน้าที่ปลูกถ่ายทดแทนบริเวณที่เกิดความพิการของกระดูกในอนาคต

6. ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่สามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปสรุปผลต่อร่างกายโดยตรง เนื่องจากร่างกายมนุษย์มีกลไกการทำงานที่ซับซ้อนเกิดจากการทำงานร่วมกันในเซลล์และโมเลกุลหลายชนิด ควรทำการศึกษาทดลองในสิ่งมีชีวิตเพิ่มเติมก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ทพญ.ดร.อุทัยวรรณ อารยะตระกูลลิขิต อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพลุ่มน้ำโขง ศูนย์วิจัยผู้ป่วยปากแห้ง เพดานโหว่และความพิการแต่กำเนิดของศีรษะและใบหน้า กลุ่มวิจัยโรคอ้ากเสบเรื้อรังของช่องปากและโรคทางระบบที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพช่องปาก ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ผู้สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษานี้ ขอขอบพระคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

8. เอกสารอ้างอิง

- Balázs, Csaba, Ferenc Wéber, Zsuzsanna Kövér, Enikő Horváth, and Csaba Németh. 2007. 'Preparation of calcium-phosphate bioceramics from natural resources', *J. Eur. Ceram. Soc.*, 27: 1601-06.
- Bandyopadhyay, Amit, Susmita Bose, and Suman Das. 2015. '3D printing of biomaterials', *MRS Bulletin*, 40: 108-15.
- Benhayoune, Hicham, E. Jallot, Patrice Laquerriere, Gérard Balossier, P. Bonhomme, and Patrick Frayssinet. 2000. 'Integration of dense HA rods into cortical bone', *BIOMATERIALS*, 21: 235-42.
- Bertazzo, Sergio, Willian F. Zambuzzi, Daniela D. P. Campos, Thais L. Ogeda, Carmen V. Ferreira, and Celso A. Bertran. 2010. 'Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion', *Colloids Surf B Biointerfaces*, 78: 177-84.
- Currey, J. 2001. 'Sacrificial bonds heal bone', *Nature*, 414: 699.
- Czekanska, E. M., M. J. Stoddart, R. G. Richards, and J. S. Hayes. 2012. 'In search of an osteoblast cell model for in vitro research', *Eur Cell Mater*, 24: 1-17.
- Dhand, Vivek, Kyong Yop Rhee, and Soo-Jin Park. 2014. 'The facile and low temperature synthesis of nanophase hydroxyapatite crystals using wet chemistry', *Mater. Sci. Eng. C*, 36: 152-59.
- Dorozhkin, Sergey V. 2011. 'Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications', *Biomatter*, 1: 121-64.
- Heise, U., J. F. Osborn, and F. Duwe. 1990. 'Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute', *Int Orthop*, 14: 329-38.

- Jadalannagari, Sushma, Sandeep More, Meenal Kowshik, and Sutapa Ramanan. 2011. 'Low temperature synthesis of hydroxyapatite nano-rods by a modified sol-gel technique', *Mater. Sci. Eng. C*, 31: 1534-38.
- Maeno, Shinichi, Yasuo Niki, Hideo Matsumoto, Hideo Morioka, Taku Yatabe, Atsushi Funayama, Yoshiaki Toyama, Tetsushi Taguchi, and Junzo Tanaka. 2005. 'The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture', *BIOMATERIALS*, 26: 4847-55.
- Miura, K., K. Matsui, T. Kawai, Y. Kato, A. Matsui, O. Suzuki, S. Kamakura, and S. Echigo. 2012. 'Octacalcium phosphate collagen composites with titanium mesh facilitate alveolar augmentation in canine mandibular bone defects', *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*, 41: 1161-69.
- Mosmann, T. 1983. 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays', *J Immunol Methods*, 65: 55-63.
- Nakamura, Shinya, Takuya Matsumoto, Jun-Ichi Sasaki, Hiroshi Egusa, Kuen Lee, Takayoshi Nakano, Taiji Sohmura, and Atsushi Nakahira. 2010. 'Effect of Calcium Ion Concentrations on Osteogenic Differentiation and Hematopoietic Stem Cell Niche-Related Protein Expression in Osteoblasts', *Tissue Eng, Part A*, 16: 2467-73.
- Nikolidakis, D., J. van den Dolder, J. G. Wolke, P. J. Stoelinga, and J. A. Jansen. 2006. 'The effect of platelet-rich plasma on the bone healing around calcium phosphate-coated and non-coated oral implants in trabecular bone', *Tissue Eng*, 12: 2555-63.
- Sadat-Shojai, Mehdi, Mohammad-Taghi Khorasani, Ehsan Dinpanah-Khoshdargi, and Ahmad Jamshidi. 2013. 'Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures', *Acta Biomater*, 9: 7591-621.
- Shepherd, J. H., D. V. Shepherd, and S. M. Best. 2012. 'Substituted hydroxyapatites for bone repair', *J Mater Sci Mater Med*, 23: 2335-47.
- Shirazi, Seyed, Samira Gharehkhani, Mehdi Mehrali, Hooman Yarmand, Hendrik Metselaar, Nahrizul Adib Kadri, and Noor Azuan Abu Osman. 2015. 'A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: Selective laser sintering and inkjet 3D printing', *Sci. Technol. Adv. Mater*, 16.
- Šupová, Monika. 2015. 'Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review', *Ceram. Int*, 41: 9203-31.
- Suwanprateeb, Jintamai, Waraporn Suvannapruk, and K. Wasoontarat. 2009. 'Low temperature preparation of calcium phosphate structure via phosphorization of 3D-printed calcium sulfate hemihydrate based material', *J Mater Sci Mater Med*, 21: 419-29.
- Suwanprateeb, Jintamai, Faungchat Thammarakcharoen, and Nattapat Hobang. 2016. 'Enhancement of mechanical properties of 3D printed hydroxyapatite by combined

low and high molecular weight polycaprolactone sequential infiltration', *J Mater Sci Mater Med*, 27.

Ventola, C. 2014. 'Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses', *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 39: 704-11.

Yoshikawa, H., and A. Myoui. 2005. 'Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics', *J Artif Organs*, 8: 131-6.

Zhou, H., and J. Lee. 2011. 'Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering', *Acta Biomater*, 7: 2769-81.