บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แก้วทางชีวภาพหรือ Bioactive glass เป็นวัสดุที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาที่พื้นผิวได้อย่างรวดเร็วเมื่อนำไปฝังในร่างกาย โดยสามารถก่อให้เกิดชั้นของผลึกไฮดรอกซีอะปาไตท์ (Hydroxyapatite, HA) การเกิดชั้นของ HA นี้จะทำให้เกิดการเชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อได้ในอนาคต ได้มีการพัฒนาและศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางเพื่อนำไปใช้ในการซ่อมแซมและการเกิดเนื้อเยื่อใหม่ (Tissue regeneration) รวมทั้งการสูญเสียอวัยวะหรือได้รับความเสียหายอันเนื่องมาจากมะเร็ง เชื้อโรค การบาดเจ็บ หรืออายุขัย โดยจากการวิจัยพบว่าแก้วไบโอแอกทีพสามารถนำมาใช้ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อและอวัยวะได้สำเร็จ นอกจากนี้การขึ้นรูปแก้วไบโอแอกทีพให้มีความพรุนตัวเพื่อใช้เป็นโครงสร้างยึดเกาะของเซลล์ และสามารถก่อให้เกิดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใหม่ โดยสามารถเร่งให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้โดยการใส่ Growth factors หรือโมเลกุลทางชีวภาพอื่นๆที่เหมาะสม ดังนั้นในการออกแบบทางด้านวัสดุให้มีโครงสร้างที่มีความพรุนตัวจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งจะช่วยให้เกิดความเหมาะสมต่อเซลล์ในการยึดเกาะ และเกิดการเจริญเติบโตไปเป็นเนื้อเยื่อตามธร รมชาติต่อไป ทางด้านวัสดุศาสตร์นั้นสามารถเตรียมหรือขึ้นรูปวัสดุให้มีรูปร่างหรือโครงสร้างตามต้องการได้ เช่นการขึ้นรูปโดยใช้เทคนิค Electrospinning, solid freeform หรือ rapid prototyping รวมถึงการใช้เทคนิค dry Freezing

โครงสร้างยึดเกาะ (Scaffolds) ที่ดีควรมีสมบัติดังนี้

1. ไม่เป็นพิษ และเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ซึ่งเซลล์จะเกาะและเพิ่มจำนวนได้
2. เมื่อนำไปใส่ทดแทนเนื้อเยื่อหรือกระดูก ควรจะมีสมบัติเชิงกลที่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อกับกระดูกนั้น
3. มีโครงสร้างที่เป็นรูพรุนสามมิติ รูพรุนที่เชื่อมต่อถึงกัน เพื่อให้เซลล์สามารถเพิ่มจำนวน สารอาหารและของเหลวสามารถทะลุผ่านได้
4. สามารถสลายตัวได้ในร่างกาย โดยมีอัตราการสลายตัวใกล้เคียงกับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ และสารที่สลายตัวไม่เป็นพิษต่อร่างกาย สามารถดูดซึมหรือขับถ่ายออกจากร่างกายได้
5. มีต้นทุนต่ำ สามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ และขึ้นรูปได้ง่ายเหมาะกับการใช้งานทางแพทย์ นอกจากนี้ควรจะสามารถนำไปฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้ได้โดยไม่เสียสภาพเดิมของวัสดุ

แก้วไบโอแอกทีพ สามารถแบ่งออกได้เป็น ประเภท ดังนี้

2.1 ชนิดของแก้วไบโอแอกทีพ

2.1.1 แก้วไบโอแอกทีพประเภทซิลิเกต (Silicate bioactive glass)

แก้วไบโอแอกทีพชนิดซิลิเกตได้พัฒนาขึ้นมาเมื่อ 40 ปีก่อน โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Bioglass ®45S5 โดยมีองค์ประกอบของซิลิกาค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับแก้วซิลิเกตทั่วไป และมีปริมาณ Na_2O และ CaO ค่อนข้างสูง มีสัดส่วนของ CaO/P_2O_5 สูง ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เมื่อ Bioglass ® 45S5 สัมผัสกับของเหลวในร่างกายสามารถเกิดชั้นของผลึก carbonate-substituted hydroxyapatite-like (HCA) บนผิวของแก้วนั้น ผลึกของ HCA นั้นมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับกระดูกตามธรรมชาติ จึงมีแนวโน้มที่จะเชื่อมต่อกับกระดูกหรือเนื้อเยื่อได้ดี [1]

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของแก้วไบโอแอกทีพชนิดต่างๆ

องค์ประกอบทางเคมี (wt.%)	**45S5**	**13-93**	**6P53B**	**58S**	**70S30C**	**13-93B1**	**13-93B3**	**P50C35N15**
Na_2O	24.5	6.0	10.3	0	0	5.8	5.5	9.3
K_2O	0	12.0	2.8	0	0	11.7	11.1	0
MgO	0	5.0	10.2	0	0	4.9	4.6	0
CaO	24.5	20.0	18	32.6	28.6	19.5	18.5	19.7
SiO_2	45.0	53	52.7	58.2	71.4	34.4	0	0
P_2O_5	6	4.0	6	9.2	0	3.8	3.7	71.0
B_2O_3	0	0	0	0	0	19.9	56.6	0

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อผิวของแก้วไบโอแอกทีพสัมผัสกับของเหลวในร่างกาย

ขั้นที่ 1 เกิดการแลกเปลี่ยนอิออนระหว่าง Na^+, Ca^{2+} ที่ผิวของแก้วกับ H^+ หรือ H_3O^+ ในสารละลาย ทำให้เกิดกลุ่มของ Silanol (Si-OH) บนผิวแก้วขึ้นดังสมการ

$$Si\text{-}O\text{-}Na^+ + H^+ \rightarrow Si\text{-}OH + Na^+ (aq.) \quad (1)$$

ดังนั้นค่า pH ของสารละลายจะสูงขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาของ H^+

ขั้นที่ 2 ค่า pH เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการละลายของซิลิกา และกลายเป็น Silicic acid ($Si(OH)_2$) ทำให้เกิด Si-OH groups บนผิวแก้ว ดังสมการ

$Si\text{-}O\text{-}Si + H_2O \rightarrow Si\text{-}OH + OH\text{-}Si$ (2)

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

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

ขั้นที่ 5 เกิดการละลายต่อไป และ ชั้น ACP รวมกับ $(OH)^-$ และ $(CO_3)^{2-}$ ในสารละลายทำให้เกิดชั้นของไฮดรอกซีอะปาไตท์ (HCA)

ดังนั้นเมื่อเกิดชั้นของ HCA จะให้เกิดการเชื่อมต่อของกระดูก เกิดการเกาะ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เกิดการยึดเกาะของเนื้อเยื่อกระดูกและในขณะเดียวก็เกิดการสลายตัวของแก้วด้วย แก้ว 45S5 ได้รับความสนใจมากแต่มีข้อเสียคือการขึ้นรูปให้เป็นโครงสร้างรูพรุนทำได้ยาก และมีการสลายตัวช้าทำให้อัตราการสลายตัวของแก้วไม่เหมาะกับอัตราการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกตามธรรมชาติ ส่วนแก้ว 13-93 มีการขึ้นรูปเป็นโครงสร้างรูพรุนได้ง่ายกว่า แต่ยังมีการสลายตัวช้ากว่า 45S5

2.1.2 แก้วไบโอแอกทีพประเภทแก้วโบเรท (Borate Bioactive Glass)

จากตารางที่ 1 แก้วโบเรทจะมีความว่องไวทางชีวภาพดีกว่าแก้วซิลิเกต โดยสามารถสลายตัวได้ดีกว่าแก้วซิลิเกต จึงทำให้เกิดชั้น HCA ได้เร็วกว่า แต่จากการวิจัยพบว่าแก้วโบเรทมีความเป็นพิษ เมื่อเกิดการสลายตัว จากการนำไปทดสอบกับเซลล์ MLO-A5 osteogeneic cells ใน in vitro พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่จากการทดสอบโดยการฝังในขาของหนูพบว่าไม่เป็นพิษ โดยปริมาณความเข้มข้นของโบรอนในเลือดอยู่ในระดับที่ต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการวิจัยโดยการแทนที่ SiO_2 ด้วย B_2O_3 ในแก้วซิลิเกตเพื่อควบคุมอัตราการสลายตัวและระดับของความเป็นพิษต่อเซลล์และในสิ่งมีชีวิต

2.1.3 แก้วไบโอแอกทีพประเภทแก้วฟอสเฟต (Phosphate Bioactive Glass)

แก้วประเภทนี้มีออกไซด์ของโครงสร้างแก้วเป็น P_2O_5 และมี CaO, Na_2O เป็นออกไซด์ที่ปรับปรุงโครงสร้างแก้ว ดังแสดงองค์ประกอบทางเคมีในตารางที่ 1 แก้วประเภทนี้มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกับกระดูกตามธรรมชาติ ดังนั้นการสลายตัวของแก้วจึงสามารถควบคุมได้ด้วยการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมี และจัดเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่สามารถสลายตัวได้ดี

2.2 กระบวนการขึ้นรูปโครงสร้างยึดเกาะที่มีรูพรุนด้วยแก้วไบโอแอกทีพ (Bioactive glass scaffolds for bone regeneration)

2.2.1 กระบวนการหลอม (Melt-derived bioactive glass scaffolds)

ตารางที่ 2.2 ได้รวบรวมกระบวนการขึ้นรูปโครงสร้างยึดเกาะที่มีความพรุนตัว รวมทั้งสมบัติเฉพาะของโครงสร้างที่ได้

ตาราง 2.2 เปรียบเทียบกระบวนการเตรียมและลักษณะเฉพาะของ Scaffold

กระบวนการ	ชนิดแก้ว	ความพรุนตัว (%)	ขนาดรูพรุน (ไมครอน)	ความแข็งแรง (MPa)	อ้างอิง
Thermal bonding of particles	13-93	40-45	100-300	22±1	[2]
Thermal bonding of short fibers	13-93	45-50	>100	5	[3]
Polymer foam replication	45S5 13-93 13-93B3	89-92 75-85 80-85	510-720 100-500 100-500	0.4±0.1 11±1 5±0.5	[4] [5] [6]
Sol-gel foam	70S30C	82	500	2.4	[7]
Unidirectional freezing of suspensions	13-93 13-93	53-57 50-55	90-110 60-120	25±3 27±8	[8] [9]
Solid freeform fabrication -Selective laser sintering -Freeze extrusion fabrication -Robocasting	 13-93 13-93 6P53B	 58-60 50 60	 700-1000 300 500	 15±1 140±70 136±22	[10]

ในการเตรียมวัสดุโดยใช้เทคนิค sol-gel ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก (Wen Jin, 2002) เนื่องจากสามารถเตรียมวัสดุที่เก็บกักโปรตีน เอนไซม์ และสารแอนติ้บอดี้ได้ โดยการผสมชีวโมเลกุลและสารอนินทรีย์ สารอินทรีย์หรือสารประกอบเชิงซ้อนไฮบริดต์นาโน (hybrid nanocomposites) โดยที่ชีวโมเลกุลไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเสียสภาพไป ทำให้วัสดุทางชีวภาพนี้มีสมบัติที่เหมาะสมและนำไปใช้งานทางการแพทย์ที่หลากหลาย เทคนิค sol-gel ยังสามารถพัฒนาไปเพื่อการเคลือบผิวสำหรับงานทางไฟฟ้าเคมีเพื่อใช้เป็นตัวตรวจจับทางชีวภาพ (electrochemical biosensors) ได้ ซึ่งเทคนิคนี้จำเป็นต้องเลือกสารตั้งต้นและสารตัวเติมที่เหมาะสมเพื่อการออกแบบวัสดุให้เหมาะสมกับการใช้งานทางการแพทย์ที่หลากหลาย เช่น ใช้ในการส่งผ่านยาต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย หรือเป็น scaffolds เป็นต้น โดยขั้นตอนในการใส่ชีวโมเลกุลลงในวัสดุโดยผ่านกระบวนการ sol-gel ทำได้โดย สารตั้งต้นและสารตัวเติมในรูปของสารละลาย จะต้องเข้ากันได้กับชีวโมเลกุลและไม่ทำให้สารชีวโมเลกุลเสียสภาพ ขั้นต่อมาการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่นต้องเกิดใน pH ที่

เหมาะสม ซึ่งกระบวนการต้องเกิดในสภาวะที่หรือใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เพื่อรักษาสภาพของชีวโมเลกุล วัสดุจะต้องมีขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมในการให้ชีวโมเลกุลผ่านได้ นอกจากนี้ในกรณีที่จะพัฒนาวัสดุเพื่อเป็นตัวตรวจจับทางชีวภาพนั้น วัสดุควรจะมีความโปร่งแสงหรือนำไฟฟ้าได้เพื่อทำการตรวจวัดโดย spectroscopic หรือ electrochemical ได้

งานวิจัยของ Balamurugan A. และคณะ (2008) ได้เตรียม bioglass (SiO_2-CaO-P_2O_5) ที่มีการเติมซิลเวอร์ (SiO_2-CaO-P_2O_5-Ag_2O) โดยวิธี sol-gel เพื่อให้แก้วสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งพบว่าการเติม silver เข้าไปในเจลแก้วนี้ ทำให้เกิดเป็นแก้วที่มีความพรุนตัวซึ่งสามารถส่งผ่านยาและต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งเหมาะกับการใช้งานทางทันตกรรมที่มีการติดเชื้อได้ง่าย

งานวิจัยของ Jenny Andersson และคณะ (2005) ได้ศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนของ silica/apatite โดยเทคนิค sol-gel ที่มีความสามารถในการสลายตัวในร่างกายได้และมีความพรุนตัว วัสดุไฮบริดต์นี้ช่วยเร่งการเกิดของแคลเซียมฟอสเฟตภายในสภาวะการทดลอง in vitro และมีประสิทธิภาพดีในการส่งผ่านยาได้

งานวิจัยของ Anbalagan B. และคณะ (2007) ได้เตรียม SiO_2-CaO-P_2O_5-ZnO bioglass โดยเทคนิค sol-gel ซึ่งพบว่ามีการเจริญเติบโตของ Osteoblasts cell ได้ดี

งานวิจัยของ Xudong Li. และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของ pH ต่อสมบัติของผิวและการการละลายของ phosphate bioglass-ceramics (CaO-P_2O_5-Na_2O-SrO-ZnO) โดยเทคนิค sol-gel ซึ่งพบว่าการแช่ในสารละลายที่ pH ต่างๆ มีผลต่อสมบัติที่ผิวและวัฏภาคของสารบนแก้ว bioactive glass-ceramic และพบว่าผิวที่ขรุขระจะทำให้เกิดชั้นใหม่ และก่อให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์และกระดูกได้ดี

2.3 การเจือธาตุต่างๆ ในองค์ประกอบของแก้วไบโอแอททีพ

เนื่องจากกลไกการสร้างกระดูกในร่างกายมนุษย์มีความเกี่ยวข้องกับธาตุหรืออิออน เช่น Ca, P, Si, Sr, Zn, B V, Co และ Mg จึงได้มีการค้นคว้าการนำธาตุหรืออิออนเหล่านี้มาเจือลงในวัสดุทางชีวภาพเพื่อศึกษาผลของการละลายอิออนหรือธาตุต่อ angiogenesis, growth และ mineralization ของเนื้อเยื่อกระดูก ตารางที่ 3 รวบรวมการตอบสนองทางชีวภาพต่ออิออนต่างๆ

แคลเซียม (Ca) เป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการสร้างเสริมกระดูก ซึ่งมีผลต่อ Osteoblastic cells ในการทดสอบใน in vitro โดย Maeno และคณะ [11] พบว่าแคลเซียมในปริมาณ 2-4 mmol และ 6-8 mmol จะมีความเหมาะสมต่อ osteoblast proliferation, differentiation and extracellular matrix (ECM)

mineralization ในขณะที่หากมีปริมาณ มากกว่า 10 mmol จะก่อให้เกิดความเป็นพิษ นอกจากนี้แคลเซียมยังเป็น Ca-sensing receptor ต่อ osteoblastic cells

ตาราง 2.3 การเจือธาตุต่างๆในแก้วไบโอแอททีพที่ส่งผลต่อการตอบสนองทางชีวภาพ [12]

ชนิดของอิออน	การตอบสนองทางชีวภาพใน in vitro และ in vivo
Si	- จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอริซึม การเกิดเนื้อเยื่อกระดูก - เพิ่ม Bone mineral density (BMD) - ช่วยให้เกิด HA - $Si(OH)_4$ กระตุ้นให้เกิด collagen I and osteoblastic differentiation
Ca	- ส่งเสริม Osteoblast proliferation, differentiation and extracellular matrix mineralization - กระตุ้น Ca-sensing receptor ใน osteoblast cells และเพิ่ม growth factor IGF-I or IGF-II
P	- กระตุ้น expression of matrix la protein (MGP) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างกระดูก
Zn	- มีผลต่อต้านการอักเสบและกระตุ้นการสร้างกระดูกใน In vivo โดยกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนใน osteoblast - เพิ่มการทำงานของ ATPase activity, regulates transcription of osteoblastic differentiation genes e.g. collagen I, ALP, osteopontin and osteocalcin.
Mg	- กระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ - เพิ่มการยึดเกาะของเซลล์กระดูก
Sr	- ส่งผลดีต่อเซลล์กระดูกและการเกิดกระดูกใหม่ใน in vivo
Cu	- สนับสนุนในการทำงานร่วมกันในการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ด้วยการทำงานร่วมกับ angiogenic growth factor FGF-2
B	- กระตุ้นการสังเคราะห์ RNA ใน fibroblast cells - ควบคุมกระบวนการเกิดกระดูกใหม่

2.4 การทดสอบโครงสร้างยึดเกาะของแก้วทางชีวภาพ In vitro

สมบัติทางชีวภาพในการทดสอบ In vitro ได้แก่ อัตราการสลายตัวของแก้ว (degradation rate) การเปลี่ยนเป็นสารไฮดรอกซีอะปาไตท์, การตอบสนองทางกลและการตอบสนองต่อเซลล์ ซึ่งสมบัติเหล่านี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของแก้วและโครงสร้างของวัสดุยึดเกาะ สมบัติด้านการสลายตัวของแก้วสามารถทดสอบได้ด้วยการนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาแช่ในสารละลายของเหลวที่คล้ายของเหลวในร่างกายมนุษย์ (SBF) ที่อุณหภูมิ 37^{o}C และนำมาชั่งหาน้ำหนักที่หายไปเป็นฟังก์ชันกับเวลาที่แช่ การสลายตัวของแก้วทางชีวภาพขึ้นอยู่กับการละลายของอิออน เช่น Na^{+}, $(BO_3)^{3-}$ และ $Si(OH)_4$ ที่มีอยู่ในองค์ประกอบของแก้วนั้นๆ ดังนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย SBF

2.5 การทดสอบโครงสร้างยึดเกาะของแก้วทางชีวภาพ In vivo

Chidambaram และคณะ (ปี 2014) ได้ศึกษาการนำส่งยาด้วย bioactive glass ที่มีความพรุนตัวด้วยโครงสร้างรูพรุน โดยการใช้แก้วที่มีองค์ประกอบ SiO_2-Na_2O-ZnO, CaO-MgO-P_2O_5 ผลการทดลองพบว่า bioactive glass ด้วยความพรุนตัว 63-66% และขนาดรูพรุน 5-50 μm สามารถส่งผ่านยาได้ 43 วัน

Hui-Suk Yun และคณะ (ปี 2011) ได้เตรียม Bioactive glass ที่มีความพรุนตัวสูงโดยกระบวนการ polymer templating โดยได้ศึกษาความสัทพันธ์ระหว่างโครงสร้างความพรุนตัวและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) โดยใช้ MC3T3-E1 pre-osteoblast cells และการศึกษา in vivo ในกระต่ายเป็นเวลา 8 สัปดาห์ หลังจาก implantation พบว่า bioactive glass ball จะมีรูพรุนในระดับนาโนถึงไมครอน จะส่งผลต่อการเกาะได้ดีทั้งในการทดสอบ in vitro และ in vivo และพบว่าไม่มีความเป็นพิษ แต่พบว่าหากมีรูพรุนที่มีขนาดใหญ่หลายไมครอน จะส่งผลต่ออัตราการสลายตัว และทำให้ผล in vitro และ in vivo ไม่ดี ดังนั้นโครงสร้างรูพรุนจึงมีอิทธิพลต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ