



รายงานการวิจัย

การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคา
โพรแลคโตนเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ
(Development of biomimetic 3D printed nanohydroxyapatite-
reinforced polycaprolactone/hydrogel bioink as artificial
meniscus)

ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคา
โพรแลคโตนเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ
(Development of biomimetic 3D printed nanohydroxyapatite-
reinforced polycaprolactone/hydrogel bioink as artificial
meniscus)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.ปิยาอร นำไพศาล

สาขาวิชาออร์โธปิดิกส์

สำนักวิชาแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ยุพาพร รักสกุลพิวัฒน์

ดร.ราชสิทธิ์ จินแซม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2569

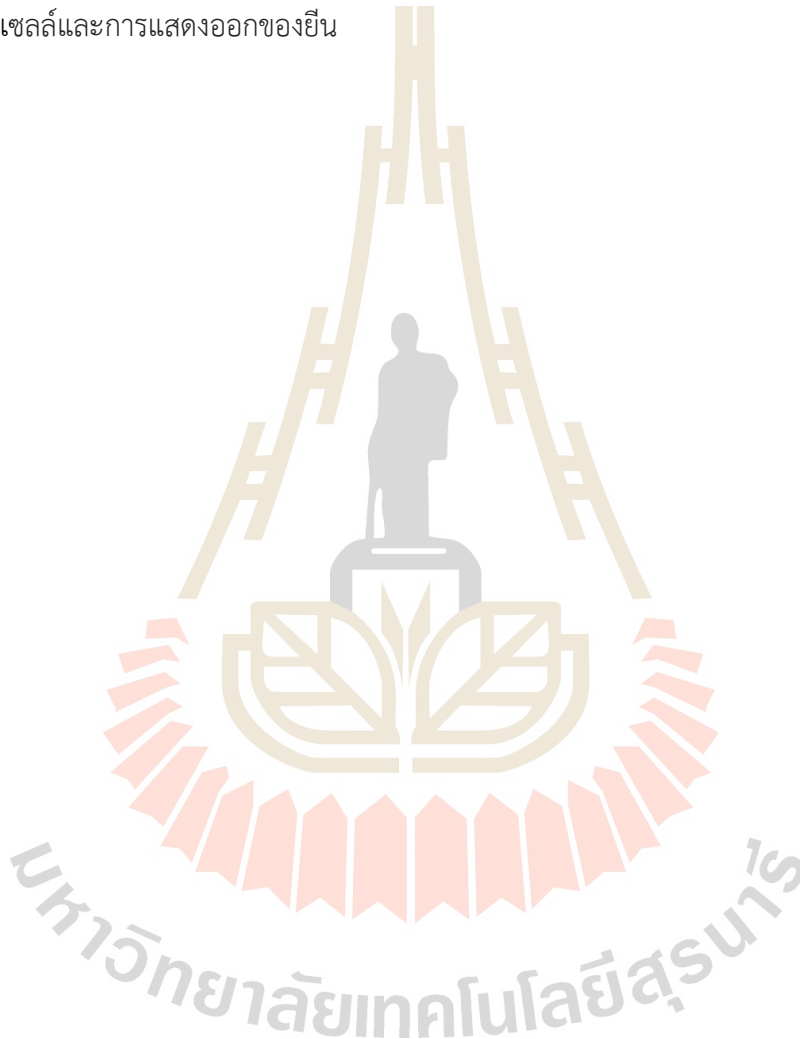
กิตติกรรมประกาศ

การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพนี้ ได้รับการสนับสนุนจากเงินกองทุนนวัตกรรมและสิ่งประดิษฐ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้โดยความร่วมมือจากผู้ช่วยวิจัยคือ นางสาวสุมาลี พลชนะ นักศึกษาหลักสูตร นวัตกรรม วิศวกรรมชีวการแพทย์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ขอขอบคุณ รศ.ดร.นพ. ตุลยพฤกษ์ ถาวรสวัสดิ์รักษ์ และ นายณรงค์ฤทธิ์ ศรีแก้ว งานห้องปฏิบัติการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการสนับสนุนด้านเทคนิค การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์และการแสดงออกของยีน

ปิยาอร นำไพศาล

มีนาคม 2569



๒
บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้พัฒนา หมอนรองเข่าเสมือนจริงสามมิติ ที่เลียนแบบโครงสร้าง สมบัติเชิงกล และชีวเคมี ของหมอนรองเข่ามนุษย์ โดยใช้เทคนิคการพิมพ์สามมิติแบบหัวพิมพ์คู่ จากพอลิคาโพรแลคโตน (PCL) เสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) ร่วมกับไฮโดรเจล ไฮโดรเจลใช้เป็นหมึกพิมพ์ชีวภาพมีสองชนิด ได้แก่ เจลลาตินเมทาคริเลท (GelMA) สำหรับ บริเวณภายนอกที่เลียนแบบสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นการสร้างเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ และโพลิไวนิลแอลกอฮอล์กราฟต์ด้วยไกลซิديلเมทาคริเลท (PVA-g-GMA) ผสมกับ ไหมไฟโบรอินกราฟต์ด้วยไกลซิديلเมทาคริเลท (SF-g-GMA) สำหรับ บริเวณภายในที่เลียนแบบสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นการสร้างเซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ นอกจากนี้ยังมีการใส่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ในบริเวณภายนอก และเซลล์ต้นกำเนิดคอนโดเจเนติกมนุษย์ (human chondrogenic progenitor cells, HCPCs) ในบริเวณภายใน หมอนรองเข่าที่พิมพ์สามมิติจาก PCL/HA/ไฮโดรเจลนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับโครงสร้างทางกายวิภาค สมบัติเชิงกล และทางชีวเคมีของหมอนรองเข่ามนุษย์ หมอนรองเข่าสามมิติจาก PCL/HA และ ไฮโดรเจล แสดง สมบัติเชิงกลที่ดี โดยบริเวณภายนอกมีความทนต่อแรงอัด (compressive strength) ที่ 20.67 MPa และความทนต่อแรงดึง (tensile strength) 7.78 MPa ขณะที่บริเวณภายในมีความทนต่อแรงอัด 21.26 MPa และความทนต่อแรงดึง 8.05 MPa ทั้งสอง บริเวณมีความพรุน (Porosity) 34% และแสดงสมบัติการเปียกต่อพื้นผิวที่ดี โดยมีมุมสัมผัส (contact angle) 82.33° สำหรับบริเวณภายนอกและ 37° สำหรับบริเวณภายใน วัสดุผสมนี้แสดงถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี โดยมีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 90% นอกจากนี้ PCL/HA/GelMA แสดงการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 (COL1A1) ในระดับสูงที่สุด ในขณะที่ PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA แสดงการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 (COL2A1), อะกรีแคน (ACAN) และโปรตีน SRY-box transcription factor 9 (SOX9) ในระดับสูงที่สุด หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 28 วัน ซึ่งบ่งชี้ว่า บริเวณภายนอกมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และบริเวณภายในมีลักษณะคล้ายกับเซลล์คอนโดโรไซต์ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของหมอนรองเข่าในร่างกายมนุษย์ ผลการศึกษาเหล่านี้ยืนยันว่าโครงสร้างที่พิมพ์ขึ้นเลียนแบบลักษณะสำคัญของหมอนรองเข่ามนุษย์ ซึ่งเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการทดแทนหมอนรองเข่าที่ได้รับบาดเจ็บหรือเสื่อมสภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

In this study, a 3D-printed artificial meniscus was developed to mimic the structure, mechanical properties, and biochemistry of the human meniscus. A dual-nozzle 3D printing technique was employed to fabricate the meniscus from polycaprolactone/nanohydroxyapatite (PCL/HA) and hydrogels. Two specialized hydrogels were used as bioinks: gelatin methacrylate (GelMA) for the outer zone, mimicking a fibrogenic environment and poly(vinyl alcohol) grafted with glycidyl methacrylate and silk fibroin grafted with glycidyl methacrylate (PVA-g-GMA/SF-g-GMA) for the inner zone, replicating a chondrogenic environment. In addition, the 3D-printed PCL/HA/hydrogel was seeded with fibroblasts in the outer zone and human chondrogenic progenitor cells in the inner zone. This research successfully produced a 3D-printed construct composed of PCL/HA/hydrogel that closely mimics the anatomical structure, mechanical properties, and biochemical organization of the human meniscus. The 3D-printed PCL/HA/hydrogel demonstrated mechanical properties with the outer zone achieving compressive strength of 20.67 MPa and tensile strength of 7.78 MPa, while the inner zone exhibited compressive strength of 21.26 MPa and tensile strength of 8.05 MPa. Both zones maintained a porosity of 34% and exhibited high surface wettability, with contact angles of 82.33° for the outer zone and 37° for the inner zone. The composite materials exhibited excellent biocompatibility, with cell viability exceeding 90%. The PCL/HA/GelMA hydrogel showed the highest level of type I collagen (COL1A1) expression, while the PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA exhibited the highest levels of type II collagen (COL2A1), aggrecan (ACAN), and SRY-box transcription factor 9 (SOX9) expression after 28 days of cell culture, indicating the presence of a fibroblast-like outer region and a chondrocyte-like inner region in the anatomical meniscus. These results confirm that the construct replicates the essential characteristics of the human meniscus, providing a promising solution for enhanced meniscal replacement.

ง
สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 หมอนรองเข่า (Meniscus).....	4
2.2 การบาดเจ็บของหมอนรองเข่า	5
2.3 วิธีการฟื้นฟูหมอนรองเข่า.....	7
2.4 การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติ	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	9
3.1 วัสดุใช้ในการทดลอง	9
3.2 วิธีการทดลอง	9
3.2.1 การเตรียม PCL/HA คอมพอสิต	9
3.2.2 การเตรียม PVA-g-GMA	9
3.2.3 การเตรียม SF-g-GMA.....	10
3.2.4 การเตรียม GelMA ไฮโดรเจล	10
(สำหรับบริเวณด้านนอกของหมอนรองเข่าเสมือนจริง).....	10
3.2.5 การเตรียม PVA-g-GMA/SF-g-GMA ไฮโดรเจล	10
(สำหรับบริเวณด้านในของหมอนรองเข่าเสมือนจริง).....	10
3.2.6 การพิมพ์ไฮโดรเจลแบบสามมิติ	10
3.2.7 การพิมพ์ PCL/HA คอมพอสิต ร่วมกับไฮโดรเจล แบบสามมิติ	11
3.2.8 การพิมพ์หมอนรองเข่าเสมือนจริง	11
3.2.9 การฆ่าเชื้อชิ้นตัวอย่างสามมิติ	12
3.2.10 แผนการวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis).....	13
3.3 การตรวจสอบสมบัติของไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	13
3.3.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยา เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย	13
และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน	13
3.3.2 การหาค่าส่วนที่เป็นเจล (Gel fraction)	13
3.3.3 การทดสอบการดูดซึมน้ำ (Water uptake).....	13

จ
สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.4 การทดสอบการบวมน้ำ (Water swelling).....	13
3.3.5 การทดสอบสมบัติแรงอัด (compression properties).....	14
3.3.6 การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์.....	14
3.4 การตรวจสอบสมบัติของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	14
3.4.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยา (Morphology).....	14
3.4.2 การทดสอบความสามารถในการเปียกของพื้นผิว (Surface wettability)	14
3.4.3 การตรวจสอบความเป็นรูพรุน (Porosity).....	15
3.4.4 การทดสอบสมบัติเชิงกล (Mechanical properties)	15
3.4.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า (Gene expression).....	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	17
4.1 การศึกษาสมบัติของไฮโดรเจลแบบสามมิติ	17
4.1.1 ลักษณะและสัณฐานวิทยาของไฮโดรเจลแบบสามมิติ	17
4.1.2 ส่วนที่เป็นเจล การดูดซึมน้ำ และการบวมน้ำ.....	18
4.1.3 สมบัติแรงอัด	19
4.1.4 ความมีชีวิตของเซลล์.....	20
4.2 การศึกษาสมบัติของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	21
4.2.1 ลักษณะ ความเป็นรูพรุน และสัณฐานวิทยาของ PCL/HA/ไฮโดรเจล แบบสามมิติ	21
4.2.2 ความสามารถในการเปียกของพื้นผิวของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	23
4.2.3 สมบัติเชิงกลของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	24
4.2.4 การแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า	26
4.3 การศึกษาความเป็นไปได้ในการพิมพ์หมอนรองเข่าเสมือนจริง	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	29
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	29
5.2 ข้อเสนอแนะ	29
บรรณานุกรม.....	30
ภาคผนวก.....	34
ภาคผนวก ก ผลผลิตจากการดำเนินโครงการ	35
ผลผลิตจากการดำเนินโครงการ	36
ประวัติผู้วิจัย.....	37

ฉ
สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 พารามิเตอร์สำหรับการพิมพ์ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	11
3.2 พารามิเตอร์สำหรับการพิมพ์ PCL/HA คอมพอสิต ร่วมกับไฮโดรเจล แบบสามมิติ.....	12
3.3 ลำดับของชุด primer สำหรับเทคนิค qRT-PCR.....	16
4.1 ส่วนที่เป็นเจล การดูดซึมน้ำ และการบวมตัวของไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	19
4.2 สมบัติแรงอัดของไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	19
4.3 สมบัติเชิงกลของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	26



ช
สารบัญภาพ

	หน้า
2.1 ภาพมูบบนหมอนรองกระดูกข้อเข่า.....	4
2.2 การเปลี่ยนแปลงการสร้างหลอดเลือดและจำนวนเซลล์ของหมอนรองกระดูกข้อเข่า.....	5
2.3 การจัดเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยกระจายแบบสุ่ม (1) เส้นใยเรียงตัวตามแนวรัศมี (2) และเส้นใยเรียงตัวตามเส้นรอบวง (3).....	5
2.4 ชนิดการฉีดขาดของหมอนรองเข่า.....	6
4.1 (ก) ลักษณะของไฮโดรเจลที่พิมพ์สามมิติ (ข) ภาพ FE-SEM ของไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	18
4.2 การกระจายตัวขนาดรูพรุนของไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	18
4.3 (ก) การย้อมสีด้วยสารย้อมเซลล์ที่มีชีวิต/เซลล์ตาย ของไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงใน GelMA ไฮโดรเจล HCPCs ที่เพาะเลี้ยงใน PVA-g-GMA/SF-g-GMA ไฮโดรเจล และ PCL/HA คอมพอสิต (ข) ความมีชีวิตของเซลล์ในไฮโดรเจล และ PCL/HA คอมพอสิต ที่มีการการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 1 3 และ 7 วัน.....	21
4.4 (ก) ลักษณะ (ข) สัณฐานวิทยาของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	23
4.5 (ก) ภาพค่ามุมสัมผัสของหยดน้ำบนพื้นผิว (ข) มุมสัมผัสน้ำที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	24
4.6 (ก) การทดสอบแรงอัด (ข) ตัวอย่างก่อนและหลังการทดสอบแรงอัด (ค) เส้นโค้งความเค้นแรงอัด-ความเครียด (ง) การทดสอบแรงดึง (จ) ตัวอย่างก่อนและหลังการทดสอบแรงดึง (ฉ) ความเค้นแรงดึง-ความเครียด ของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ.....	25
4.7 ระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า คือ COL1A1 COL2A1 ACAN และSOX9 ที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน (ก) PCL/HA (ข) PCL/HA/GelMA ไฮโดรเจล (ค) PCL/HA/ PVA-g-GMA/SF-g-GMA แบบสามมิติเป็นเวลา 7 14 และ 28 วัน.....	27
4.8 (ก) โมเดลหมอนรองเข่า (ข) หมอนรองเข่าเสมือนจริงแบบสามมิติ.....	28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หมอนรองเข่า (Meniscus) เป็นโครงสร้างรูปพระจันทร์เสี้ยว ซึ่งทำหน้าที่ในการรับน้ำหนักกระจายแรง และเพิ่มความมั่นคงให้กับกระดูกเคลื่อนไหวย่าง (Myers et al., 2014) การฉีกขาดของหมอนรองเข่าเป็นอาการบาดเจ็บเข่าที่พบบ่อยที่สุดในทุกช่วงอายุ และนำไปสู่ภาวะข้อเข่าเสื่อม (OA) (Sari et al., 2018) และการบาดเจ็บหรือเสื่อมของหมอนรองเข่า เกิดจากการสลายและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างระดับโมเลกุลในหมอนรองเข่า (Englund et al., 2009) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหมอนรองเข่านี้ กระตุ้นต่อชีวกลศาสตร์ของข้อเข่าและสภาวะสมดุลอย่างถาวร ดังนั้นการซ่อมแซมหรือรักษาหมอนรองเข่านอกจากจะบรรเทาอาการปวด และทำให้ผู้ป่วยกลับไปใช้ชีวิตได้ตามปกติแล้ว ยังเป็นการป้องกันภาวะข้อเข่าเสื่อมอีกด้วย หมอนรองเข่าที่มีการฉีกขาดขนาดเล็กสามารถซ่อมแซมได้โดยการเย็บบริเวณที่ฉีกขาด ส่วนหมอนรองเข่าที่ฉีกขาดขนาดใหญ่จนไม่สามารถแก้ไขซ่อมแซมได้มักได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดนำหมอนรองเข่าออก (meniscectomy) แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ การผ่าตัดเอาหมอนรองเข่าออกทั้งหมด (total meniscectomy) และการผ่าตัดเอาหมอนรองเข่าออกบางส่วน (partial meniscectomy) ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและตำแหน่งของการฉีกขาดของหมอนรองเข่า แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การผ่าตัดนี้จะส่งผลกระทบต่อชีวกลศาสตร์ของข้อเข่าและส่งผลให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในระยะยาว (Roos et al., 1998) ดังนั้นจึงมีวิธีฟื้นฟูหมอนรองเข่าขึ้นมาใหม่หลังจากการผ่าตัดนำหมอนรองเข่าออก ในปัจจุบันการฟื้นฟูหมอนรองเข่า แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ (1) การปลูกถ่ายหมอนรองเข่าที่ได้รับจากผู้บริจาค (meniscal allograft) (2) การปลูกถ่ายหมอนรองเข่าเสมือนจริงเพื่อทดแทนหมอนรองเข่าบางส่วนที่ฉีกขาดและถูกผ่าตัดออกไป (3) การปลูกถ่ายหมอนรองเข่าเสมือนจริงเพื่อทดแทนหมอนรองเข่าทั้งหมดที่ฉีกขาดและถูกผ่าตัดออกไป ทางเลือกการรักษาที่เป็นที่ยอมรับสำหรับผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดนำหมอนรองเข่าออกบางส่วนหรือทั้งหมด คือการปลูกถ่ายหมอนรองเข่าที่ได้รับจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต แต่ผลลัพธ์ทางคลินิกไม่เป็นที่น่าพอใจ ปัญหาหลักได้แก่ วัสดุที่มีจำกัด การฟื้นตัวของเนื้อเยื่อที่ไม่สมบูรณ์ และการปฏิเสธเนื้อเยื่อ ในขณะเดียวกัน เนื่องจากหมอนรองเข่าของแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกันจึงทำให้หมอนรองเข่าของผู้บริจาคไม่เหมาะสมกับสรีระของกับผู้รับบริจาคทำให้เป็นอุปสรรคต่อประสิทธิภาพของการฟื้นฟูหมอนรองเข่าด้วยวิธีนี้ (Deng et al., 2021) ในปัจจุบัน มีหมอนรองเข่าเสมือนจริงเชิงพาณิชย์สำหรับการทดแทนหมอนรองเข่าที่ถูกผ่าตัดออกไป ได้รับการอนุมัติและนำไปใช้ในการทดลองทางคลินิก แต่ผลทางคลินิกมีอัตราความล้มเหลวในการรักษาสูงซึ่งไม่เอื้ออำนวยต่อการใช้งานจริง เนื่องจากยังมีคุณสมบัติที่ไม่มีความใกล้เคียงกับหมอนรองเข่าจริง ได้แก่ สมบัติเชิงกล การออกแบบรูปร่าง โครงสร้างที่ไม่เหมาะสมกับสรีระของหมอนรองเข่าผู้ป่วย (Deng et al., 2021; Borges et al., 2018)

ความท้าทายของการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงเพื่อทดแทนหมอนรองเข่าที่ถูกผ่าตัดออกไปนั้น ไม่ได้มีเพียงคุณสมบัติทางชีวภาพที่เข้ากันได้กับเซลล์ และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ยังต้องคำนึงถึงคุณสมบัติอื่นๆ ที่จะทำให้โครงร่างเลียนเซลล์คล้ายกับหมอนรองเข่าจริงของมนุษย์มากที่สุด โครงร่างเลียนเซลล์ช่วยเกิดการสร้างเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็วไปในทิศทางทั้งสามมิติ ซึ่งโครงร่างสามมิตินี้จะส่งเสริมการทำงานของเซลล์ให้ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปกติในร่างกาย เทคนิคการพิมพ์สามมิติ (3D) เป็นเทคนิคการผลิตแบบเติมเนื้อที่ช่วยให้สามารถผลิตโครงร่างในรูปทรงและโครงสร้างภายในที่ต้องการ และด้วยเหตุนี้จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจในการสร้างหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่เลียนแบบหมอนรองเข่าของมนุษย์ แม้ว่ามีงานวิจัยมากมาย

เกี่ยวกับการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่สามารถออกแบบโครงสร้างและรูปร่างได้ใกล้เคียงกับหมอนรองเข่าของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม หมอนรองเข่าเสมือนจริงเหล่านี้ยังต่างจากหมอนรองเข่าของมนุษย์ในด้านสมบัติเชิงกลและองค์ประกอบทางชีวเคมีเฉพาะส่วน จึงยังไม่เอื้อต่อการใช้งานจริง ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่พัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนและพิมพ์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ และหมอนรองเข่าเสมือนจริงจากพอลิคาโพรแลคโตนผสมกับโพลียูรีเทนพิมพ์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ และมีงานวิจัยเดียวที่พัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่มีการออกแบบให้มีการกระตุ้นองค์ประกอบทางชีวเคมีเฉพาะส่วน ด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนและมีการใส่ไฮโดรเจล 2 ชนิด บริเวณด้านนอก และบริเวณด้านในของหมอนรองเข่าเสมือนจริง พบว่าหมอนรองเข่าเสมือนจริงเหล่านี้ มีโครงสร้างและรูปร่างได้ใกล้เคียงกับหมอนรองเข่าของมนุษย์ มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดี แต่มีสมบัติเชิงกลต่ำกว่าหมอนรองเข่าของมนุษย์ (Chae S et al., 2021); Jian et al., 2021; Bahcecioglu et al., 2019)

ในการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงให้สามารถนำไปใช้งานจริงทางการแพทย์ได้ ต้องคำนึงถึงโครงสร้าง สมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงกล และองค์ประกอบทางชีวเคมี ให้มีความใกล้เคียงกับหมอนรองเข่าของมนุษย์ให้มากที่สุด โดยใช้เทคนิคการพิมพ์สามมิติ ที่สามารถออกแบบโครงสร้างและรูปร่างได้ใกล้เคียงกับหมอนรองเข่าของมนุษย์ โดยแนวคิดในการออกแบบหมอนรองเข่าเสมือนจริงให้มีส่วนประกอบทางชีวเคมีเหมือนหมอนรองเข่าของมนุษย์ คือในหมอนรองเข่าของมนุษย์ บริเวณด้านนอก เป็นเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ (fibroblast-like cell) มีคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในปริมาณสูง (COL I คิดเป็น 70-80% ของคอลลาเจนทั้งหมด) ในขณะที่หมอนรองเข่าบริเวณด้านในเป็นเซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ (chondrocyte-like cells) มีคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในปริมาณสูง (COL II คิดเป็น 50-60% ของคอลลาเจนทั้งหมด) และมีโปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) ซึ่งประกอบด้วยไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) ที่จับกับโปรตีนหลัก เช่น aggrecan, decorin และ biglycan (Bahcecioglu et al., 2019) ดังนั้นการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงโดยมีแนวคิดให้หมอนรองเข่าเสมือนจริงบริเวณด้านนอกเกิดการสร้างองค์ประกอบทางชีวเคมี มีการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์เป็น เซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในปริมาณสูง และให้หมอนรองเข่าเสมือนจริงบริเวณด้านในเกิดการสร้างองค์ประกอบทางชีวเคมี มีการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์เป็นเซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ และคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ โปรตีโอไกลแคนในปริมาณสูง โดยการใช้หมึกพิมพ์ชีวภาพที่ต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ไฮโดรเจล เจลาตินเมทาคริเลต (GelMA) สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในปริมาณสูงในขณะที่ ไฮโดรเจล โพลีไวนิลแอลกอฮอล์กราฟต์ด้วยไกลซิديلเมทาคริเลต (PVA-g-GMA) ผสมด้วยไหมไฟโบรอินกราฟต์ด้วยไกลซิديلเมทาคริเลต (SF-g-GMA) สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ คอลลาเจนชนิดที่ 2 และ โปรตีโอไกลแคนในปริมาณสูง (Bahcecioglu et al., 2019)

งานวิจัยนี้จะเป็นการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงโดยใช้การพิมพ์พอลิเมอร์คอมพอสิตร่วมกับการพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ชีวภาพ (dual printing) โดยพัฒนาพอลิเมอร์คอมพอสิตที่ได้จากพอลิคาโพรแลคโตนและเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้มีสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับหมอนรองเข่ามนุษย์ พอลิคาโพรแลคโตนเป็นพอลิเมอร์ ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และสามารถขึ้นรูปด้วยการพิมพ์สามมิติได้ ใช้ในด้านการแพทย์ ย่อยสลายที่ช้าและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา แต่ค่าความแข็งแรงต่ำกว่าหมอนรองเข่าของมนุษย์เล็กน้อย (Yang et al., 2021) ดังนั้นจึงมีการเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบขนาดใหญ่ของแร่ธาตุกระดูก มีความสามารถช่วยเพิ่มความแข็งแรงเชิงกลให้กับวัสดุทางการแพทย์ได้ ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

กระดุก (Jiao et al., 2019) ในการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงจะออกแบบเป็นสองบริเวณเลียนแบบองค์ประกอบทางชีวเคมีของหมอนรองเข่ามนุษย์ โดยที่หมอนรองเข่าเสมือนจริงบริเวณด้านนอก จะเป็นการพิมพ์พอลิเมอร์คอมพอสิตร่วมกับการพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ชีวภาพ ชนิด GelMA ที่มีการ seed เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) และหมอนรองเข่าเสมือนจริงบริเวณด้านในเป็นการพิมพ์พอลิเมอร์คอมพอสิตร่วมกับการพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ชีวภาพ ชนิด PVA-g-GMA/SF-g-GMA ที่มีการ seed เซลล์ต้นกำเนิดคอนโดเจเนติกมนุษย์ (human chondrogenic progenitor cells, HCPCs) จากการออกแบบหมอนรองเข่าเสมือนจริงจากพอลิเมอร์คอมพอสิตร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติ ผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าจะสามารถใช้เป็นหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่มี โครงสร้าง รูปร่าง สมบัติทางกายภาพ เชิงกล และทางชีวเคมีที่มีความใกล้เคียงกับหมอนรองเข่าของมนุษย์ ทำให้มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้และรักษาทางการแพทย์ได้จริง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อสร้างต้นแบบหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของหมอนรองเข่าเสมือนจริง
- 1.2.3 เพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์และการแสดงออกของยีนส์ที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ เลียนแบบโครงสร้าง และรูปร่างหมอนรองเข่ามนุษย์โดยใช้เครื่องพิมพ์ชีวภาพ 3 มิติ เลียนแบบองค์ประกอบทางชีวเคมีของหมอนรองเข่าของมนุษย์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยที่หมอนรองเข่าเสมือนจริงบริเวณด้านนอก จะเป็นการพิมพ์พอลิเมอร์คอมพอสิตร่วมกับการพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ชีวภาพ ชนิด GelMA ที่มีการ seed เซลล์ไฟโบรบลาสต์ หมอนรองเข่าเสมือนจริงบริเวณด้านในเป็นการพิมพ์พอลิเมอร์คอมพอสิตร่วมกับการพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ชีวภาพ ชนิด PVA-g-GMA/SF-g-GMA ที่มีการ seed HCPCs และศึกษาสมบัติทางกายภาพและเชิงกล ได้แก่ สันฐานวิทยา ความสามารถในการเปียกของพื้นที่ผิว และสมบัติเชิงกล ได้แก่ ค่าการทนต่อแรงอัด โมดูลัสแรงอัด ค่าการทนต่อแรงดึง ค่าความยืดหยุ่นที่จุดขาด และค่าโมดูลัสของยัง ศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี live and dead cells staining ศึกษาการแสดงออกของยีนส์ของเซลล์กระดูกอ่อนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า และการศึกษาการขึ้นรูปหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- เมื่องานวิจัยสำเร็จลุล่วงคาดว่าจะได้รับประโยชน์ดังต่อไปนี้
- ได้รับการจดสิทธิบัตรการประดิษฐ์
 - ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์

1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

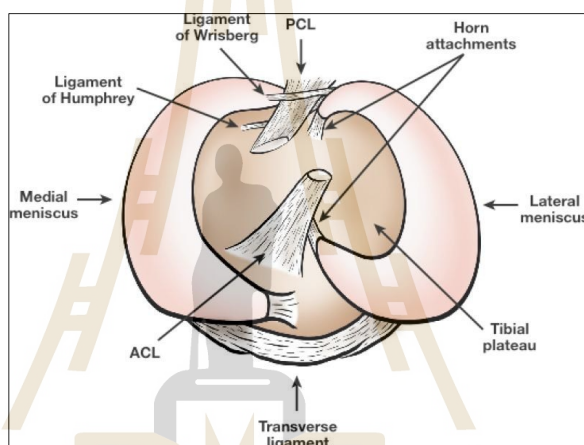
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและอุตสาหกรรมทางการแพทย์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หมอนรองเข่า (Meniscus)

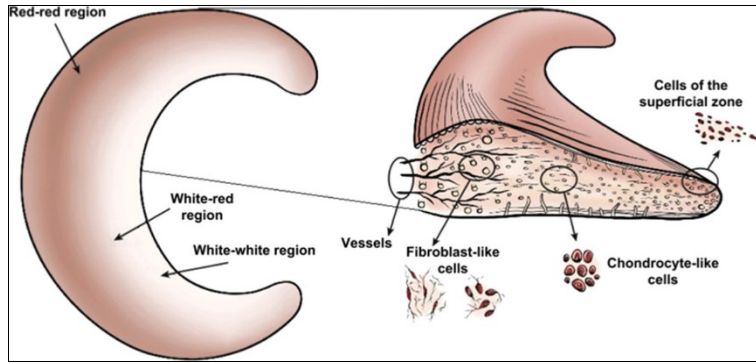
หัวเข่าเป็นข้อต่อบานพับขนาดใหญ่ในร่างกายและไวต่อการบาดเจ็บ การอักเสบ การติดเชื้อ และการเสื่อมสภาพ ซึ่งอยู่ระหว่างข้อต่อกระดูกต้นขาและกระดูกหน้าแข้ง หมอนรองกระดูกข้อเข่ามีลักษณะเป็นรูปเสี้ยวของกระดูกอ่อนไฟโบรคาร์ทีเลจมีสีขาว มันวาวดังที่แสดงในรูปที่ 2.1 ซึ่งอยู่บริเวณด้านในและด้านข้างของข้อเข่า (Fox et al., 2012; Vadodaria et al., 2019) กระดูกหน้าแข้งจะถูกปกคลุมโดย lateral menisci (ด้านข้าง 80-90%) เมื่อเทียบกับ medial menisci ที่อยู่ตรงกลาง (ตรงกลาง 50-70%) (Ridley et al., 2017)



รูปภาพที่ 2.1 ภาพมูมนของหมอนรองกระดูกข้อเข่า (Makris et al., 2011)

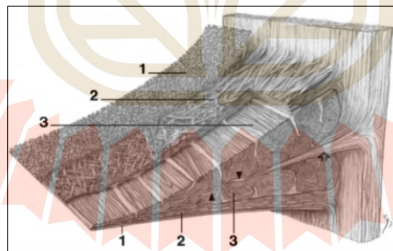
หมอนรองกระดูกข้อเข่าประกอบด้วยน้ำประมาณ 70% และอินทรียัตถ์ 30% ปริมาณน้ำมีผลในการรองรับและการหล่อลื่นตลอดจนในการถ่ายโอนสารอาหาร โดยปกติหมอนรองกระดูกแบบแท่งประกอบด้วยคอลลาเจนเป็นหลัก (75%), ไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans; GAGs) (17%), DNA (2%), อีลาสติน (น้อยกว่า 1%), ไกลโคโปรตีน (น้อยกว่า 1%) ในเมทริกซ์ของหมอนรองกระดูก สัดส่วนข้างต้นอาจแตกต่างกันไปตามอายุ การบาดเจ็บ และสภาวะทางพยาธิวิทยาอื่นๆ (Makris et al., 2011)

หมอนรองกระดูกข้อเข่าแบ่งได้ 3 บริเวณดังนี้ บริเวณด้านนอก (Outer zone/ Red-red zone) บริเวณตรงกลาง (Middle zone/ Red-white zone) และบริเวณด้านใน (Inner zone/ White-white zone) ความสามารถในการสร้างหลอดเลือดและการรักษาจะขึ้นอยู่กับบริเวณ บริเวณด้านนอกมักจะมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงทำให้สามารถรักษาแผลได้อย่างรวดเร็ว ส่วนบริเวณด้านใน ส่วนใหญ่จะไม่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง (avascular) เมื่อเกิดการฉีกขาดหรือมีบาดเจ็บจะมีโอกาสหายช้า ในขณะที่บริเวณตรงกลาง เป็นบริเวณที่มีปริมาณเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงลดลงเมื่อเทียบกับด้านนอก ความสามารถของพื้นที่หมอนรองกระดูกข้อเข่าจะแตกต่างกันไปตามการมีหลอดเลือด (de Caro et al., 2020) เป็นผลให้ในกรณีส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับแผลหมอนรองกระดูกข้อเข่าจำเป็นต้องมีการรักษา



รูปภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของการสร้างหลอดเลือดและจำนวนเซลล์ของหมอนรองกระดูกข้อเข่า (Makris et al., 2011)

เซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ (Chondrocyte-like cells) ดังที่แสดงในรูปที่ 2.2 ที่อยู่ในคอลลาเจนประเภทที่สอง และไกลโคซามิโนไกลแคนสามารถพบได้ในบริเวณด้านในของหมอนรองกระดูก ส่วนบริเวณด้านนอกของหมอนรองกระดูก มีการสะสมของคอลลาเจนประเภทที่หนึ่ง และมีจำนวนเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ (fibroblast-like cells) ที่มากกว่าบริเวณด้านใน (Li et al., 2021) ดังที่แสดงในรูปที่ 2.3 เส้นใยคอลลาเจนภายในหมอนรองกระดูกข้อเข่า จะจัดเรียงตัวเป็นสามชั้นที่แตกต่างกัน เส้นใยจำนวนมากถูกวางตามแนวเส้นรอบวงและพบได้ในชั้นกลางซึ่งให้ความต้านทานต่อความเค้นแบบห้วง (hoop stresses) ชั้นนี้ถูกประกบระหว่างชั้นผิวสองชั้นที่มีเส้นใยสั้นกว่าซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมและจัดเรียงตัวเป็นแนวรัศมี เส้นใยเหล่านี้ให้สมบัติความทนทานต่อแรงอัด ป้องกันการฉีกขาดออกตามยาว และต้านทานต่อแรงเฉือน

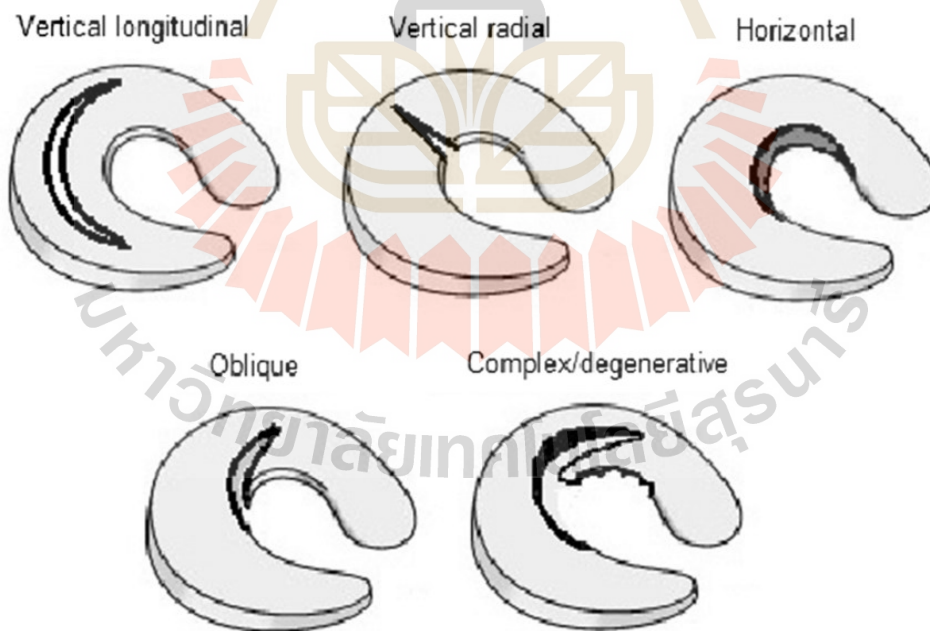


รูปที่ 2.3 การจัดเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยกระจายแบบสุ่ม (1), เส้นใยเรียงตัวตามแนวรัศมี (2) และเส้นใยเรียงตัวตามแนวเส้นรอบวง (3) (Petersen & Tillmann, 1998)

2.2 การบาดเจ็บหมอนรองเข่า

การบาดเจ็บหมอนรองเข่าเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ (Luvsannyam et al., 2022) เช่น การบิดและการหมุนข้อเข่าอย่างแรง เป็นต้น สาเหตุเหล่านี้อาจเกิดขึ้นจากกิจกรรมกีฬา อุบัติเหตุ หรือการเสื่อมสภาพข้อเข่า โดยความรุนแรงของอาการบาดเจ็บสามารถแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ถูกระทบ และสามารถเกิดการฉีกขาดได้หลายรูปแบบ ดังแสดงดังภาพที่ 2.4 เช่น Radial Tears เกิดขึ้นจากขอบด้านในและขยายไปขอบด้านนอกเป็นเส้นตรง Vertical longitudinal คือการฉีกขาดแบบเส้นแนวตั้ง รอยฉีกจะขนานไปกับความยาวของโครงสร้าง Horizontal Tears เกิดขึ้นขนานกับพื้นผิว มักเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงตามความเสื่อม

ในผู้สูงอายุ Oblique/Flap Tears เกิดขึ้นเมื่อส่วนหนึ่งของวงเดือนถูกแยกออกบางส่วน ทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายแผ่นพับ และ Complex Tears and degenerative tears คือการรวมกันของรูปแบบการฉีกขาดที่แตกต่างกันเช่นในแนวรัศมีและแนวนอนเกิดขึ้นพร้อมกัน อาการทั่วไปที่ส่งผลจากการบาดเจ็บหมอนรองเขารวมถึงอาการเจ็บปวด บวม และความไม่มั่นคงในข้อเข่า การวินิจฉัยของการบาดเจ็บหมอนรองเข่าต้องการการตรวจร่างกายโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ รวมถึงการใช้ภาพเครื่องมือเช่น MRI (Magnetic Resonance Imaging) หรือบางครั้งอาจใช้อัลตราซาวนด์เพื่อทำความเข้าใจระดับความรุนแรงของบาดเจ็บ ตัวเลือกในการรักษาการบาดเจ็บหมอนรองเข่าขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ตำแหน่งที่เกิดการบาดเจ็บ ขนาดของบาดเจ็บ อายุของผู้ป่วย และระดับกิจกรรมที่ผู้ป่วยมี การผ่าตัดยังคงเป็นทางเลือกที่พบบ่อยที่สุดในการรักษา แต่ประสิทธิภาพในระยะยาวยังเป็นหัวข้อการศึกษา เพื่อการซ่อมแซมหมอนรองเข่าด้วยวิศวกรรมเนื้อเยื่อกำลังได้รับความสนใจ ในเรื่องการรักษาหมอนรองเข่าสามารถแบ่งออกเป็นหลายแนวทาง ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อายุของผู้ป่วย อาการของผู้ป่วย การมีโรคร่วม และการผ่าตัดที่ผ่านมา เช่น meniscectomy ที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม ในปัจจุบัน Arthroscopic partial meniscectomy (APM) เป็นวิธีการผ่าตัดหมอนรองเข่าที่ใช้กล้องส่องตรวจ แต่จากการศึกษาพบว่าไม่ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการผ่าตัดแบบ หลอก (sham) ในกรณีการซ่อมแซมหมอนรองเข่า (Meniscal repair) สามารถเป็นทางเลือกที่ดีและมีประสิทธิภาพ โดยความล้มเหลวในผลลัพธ์สามารถเกิดขึ้นน้อยกว่า 10% ในการติดตามระยะยาว 2 ปี และในระยะยาว 5 ปี อาจเกิดความล้มเหลวถึง 30% ในอนาคต นอกจากนี้ การใช้เทคโนโลยี 3-D printing สำหรับการปลูกถ่ายหรือสร้างเสาหลักของหมอนรองเข่าสำหรับบุคคลเฉพาะก็เป็นทางเลือกที่เป็นไปได้ (DePhillipo et al., 2021) อย่างไรก็ตาม การใช้เทคโนโลยีนี้ในระยะยาวยังขาดข้อมูลอยู่ในปัจจุบัน



ภาพที่ 2.4 ชนิดการฉีกขาดของหมอนรองเข่า

2.3 วิธีการฟื้นฟูหมอนรองเข่า

วิธีการฟื้นฟูหมอนรองเข่าขึ้นมาใหม่หลังจากการผ่าตัดนำหมอนรองเข่าออก ในปัจจุบันการฟื้นฟูหมอนรองเข่า แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ (1) การปลูกถ่ายหมอนรองเข่าที่ได้รับจากผู้บริจาค (meniscal allograft) (2) การปลูกถ่ายหมอนรองเข่าเสมือนจริงเพื่อทดแทนหมอนรองเข่าบางส่วนที่ฉีกขาดและถูกผ่าตัดออกไป (3) การปลูกถ่ายหมอนรองเข่าเสมือนจริงเพื่อทดแทนหมอนรองเข่าทั้งหมดที่ฉีกขาดและถูกผ่าตัดออกไป ทางเลือกการรักษาที่เป็นที่ยอมรับสำหรับผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดนำหมอนรองเข่าออกบางส่วนหรือทั้งหมดคือการปลูกถ่ายหมอนรองเข่าที่ได้รับจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต แต่ผลลัพธ์ทางคลินิกไม่เป็นที่น่าพอใจ ปัญหาหลักได้แก่ วัสดุที่มีจำกัด การฟื้นตัวของเนื้อเยื่อที่ไม่สมบูรณ์ และการปฏิเสธเนื้อเยื่อ ในขณะเดียวกัน เนื่องจากหมอนรองเข่าของแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกันจึงทำให้หมอนรองเข่าของผู้บริจาคไม่เหมาะสมกับสรีระของกับผู้ป่วยบริจาคทำให้เป็นอุปสรรคต่อประสิทธิภาพของการฟื้นฟูหมอนรองเข่าด้วยวิธีนี้ (Deng et al., 2021) ในปัจจุบัน มีหมอนรองเข่าเสมือนจริงเชิงพาณิชย์สำหรับการทดแทนหมอนรองเข่าที่ถูกผ่าตัดออกไปได้รับการอนุมัติและนำไปใช้ในการทดลองทางคลินิก แต่ผลทางคลินิกมีอัตราความล้มเหลวในการรักษาสูงซึ่งไม่เอื้ออำนวยต่อการใช้งานจริง CMI® (โครงร่างเส้นใยเซลล์ทำมาจากคอลลาเจน) และ Actifit® (โครงร่างเส้นใยเซลล์ทำมาจากพอลิคาโพรลแลกโตน 80% และโพลียูรีเทน 20%) ได้รับการอนุมัติและนำไปใช้ทางคลินิกเพื่อทดแทนหมอนรองเข่าบางส่วน มีรายงานทางคลินิก ว่า CMI® และ Actifit® มีอัตราความล้มเหลวในการรักษาที่ 12% และ 32% ตามลำดับ เนื่องจากบริเวณหมอนรองเข่าที่ปลูกถ่ายไม่มีเลือดหล่อเลี้ยง ส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการฟื้นฟู นอกจากนี้ ผลลัพธ์เชิงพาณิชย์ทั้งสองยังมีคุณสมบัติเชิงกลที่แย่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหมอนรองเข่าจริง และการฝังเข้าไปภายในร่างกายนั้นทำได้ยากเนื่องจากค่อนข้างเปราะบาง (Deng et al., 2021) NUsurface® หมอนรองเข่าเสมือนจริง ทำจากโพลีคาร์บอนเอทียูรีเทน (PCU) ที่ฝังด้วยเส้นใยเสริมแรงโพลีเอทิลีนน้ำหนักโมเลกุลสูงพิเศษ (UHMWPE) ได้รับการพัฒนาเพื่อทดแทนหมอนรองเข่าทั้งหมดที่ถูกผ่าตัดออกไป NUsurface® ได้รับการอนุมัติและนำไปใช้ทางคลินิก อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของ NUsurface® คือไม่ได้ยึดไว้กับข้อเข่า ทำให้สามารถเคลื่อนไหวยได้อย่างอิสระและอาจส่งผลให้เข่าลื่นได้ NUsurface® ไม่มีรูพรุน และด้วยเหตุนี้ จึงไม่มีส่วนช่วยในการหล่อลื่นข้อต่อผ่านกลไก “weeping” ทำให้กลไกการหล่อลื่นตามธรรมชาติของข้อต่อลดลง (Borges et al., 2018) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้รับรายงานว่า NUsurface® มีเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงในช่วง 24 เดือนแรกของการปลูกถ่าย ความเสียหายของ NUsurface® หลังการปลูกถ่าย 29% และการหลุดของข้อออกจากตำแหน่งปกติ (dislocation) 15% และมีอัตราความล้มเหลวสูงถึง 17%

2.4 การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติ

เทคนิคการพิมพ์สามมิติ (3D) เป็นเทคนิคการผลิตแบบเติมเนื้อที่ช่วยให้สามารถผลิตโครงสร้างในรูปทรงและโครงสร้างภายในที่ต้องการ และด้วยเหตุนี้จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจในการสร้างหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่เลียนแบบหมอนรองเข่าของมนุษย์ แม้ว่ามีงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่สามารถออกแบบโครงสร้างและรูปร่างได้ใกล้เคียงกับหมอนรองเข่าของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม หมอนรองเข่าเสมือนจริงเหล่านี้ยังต่างจากหมอนรองเข่าของมนุษย์ในด้านสมบัติเชิงกลและองค์ประกอบทางชีวเคมีเฉพาะส่วน จึงยังไม่เอื้อต่อการใช้งานจริง ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่พัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรลแลกโตนและพิมพ์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ และหมอนรองเข่าเสมือนจริงจากพอลิคาโพรลแลกโตนผสมกับโพลียูรีเทนพิมพ์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ และมีงานวิจัยเดียวที่พัฒนาหมอนรองเข่าเสมือน

จริงที่มีการออกแบบให้มีการกระตุ้นองค์ประกอบทางชีวเคมีเฉพาะส่วน ด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนและมีการใส่ไฮโดรเจล 2 ชนิด บริเวณด้านนอก และบริเวณด้านในของหมอนรองเข้าเสมือนจริง พบว่าหมอนรองเข้าเสมือนจริงเหล่านี้ มีโครงสร้างและรูปร่างได้ใกล้เคียงกับหมอนรองเข้าของมนุษย์ มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดี แต่มีสมบัติเชิงกลต่ำกว่าหมอนรองเข้าของมนุษย์ (Chae S et al., 2021); Jian et al., 2021; Bahcecioglu et al., 2019)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

พอล리카โพรแลคโตน (polycaprolactone (PCL), average Mn 80,000 g/mol) นาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ (nanohydroxyapatite, HA, ≤ 200 nm particle size, $\geq 97\%$) โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (poly (vinyl alcohol), PVA, MW 13,000–23,000 g/mol, 87–89% hydrolyzed) เจลลาตินเมทาคริเลต (gelatin methacrylate, GelMA, Type A: porcine skin, gel strength 300 g Bloom, degree of methacrylate substitution 60%) ไกลซิดิลเมทาคริเลต glycidyl methacrylate (GMA, 97%) เตตระเมทิลเอทิลีนไดอะมีน (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine, TEMED, 99%) 2-ไฮดรอกซี-4-(2-ไฮดรอกซีเอทอกซี)-2-เมทิลโพรพิโอฟีโนน (2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone, Irgacure 2959) MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) ลิเทียม ฟีนิล-2,4,6-ไตรเมทิลเบนโซอิล ฟอสฟิเนต (lithium phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinate, LAP) L-glutamax and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-high glucose and PLTGold® Human platelet lysate ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MI, USA) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, DCM) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ซื้อจากบริษัท RCI Labscan Co., Ltd. (Bangkok, Thailand) เอทานอล (Ethanol, EtOH) โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) และอะซิโตน (acetone) ซื้อจากบริษัท Carlo Erba Reagents (Rodano, Milan, Italy) แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride, CaCl_2) และ แคลเซียม ไนเตรต (calcium nitrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) ซื้อจากบริษัท ANAPURE (Auckland, New Zealand). ไหมไฟโบรอิน ซื้อจาก ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ นครราชสีมา Snakeskin pleated dialysis tube (MWCO at 10,000 Daltons) ซื้อจากบริษัท Thermo Scientific Inc. (Illinois, USA)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียม PCL/HA คอมพอสิต

PCL 20 กรัมถูกละลายใน DCM 200 มิลลิลิตร โดยใช้การกวนคงที่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม HA ซึ่งมีน้ำหนัก 10% ของ PCL (2 กรัม) ลงในสารละลาย PCL และกวนต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คอมพอสิต PCL/HA ถูกทำให้เกิดการสั่น โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Vibra-Cell™, VCX 750, Newtown, Connecticut, USA) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นผสมถูกกวนต่ออีก 24 ชั่วโมง คอมพอสิตถูกเทลงในจานแก้วและปล่อยให้ระเหยที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ฟิล์ม PCL/HA คอมพอสิต ที่แห้งแล้ว ถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และเก็บในเครื่องดูดความชื้น

3.2.2 การเตรียม PVA-g-GMA

การดัดแปลงการกราฟต์ของ PVA ด้วย GMA (PVA-g-GMA) เกิดจากปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยเริ่มจากการละลาย PVA 5 กรัมใน DMSO 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 60 °C ขณะกวนอย่างต่อเนื่อง เมื่อ PVA ละลายหมดแล้ว เติม GMA 100 มิลลิโมลาร์ และ TEMED 0.17 มิลลิลิตรเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นคง

อุณหภูมิของสารผสมที่ 60 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยให้สารละลาย PVA-g-GMA เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง (RT) แล้วตกตะกอนด้วยอะซิโตน PVA-g-GMA ที่ตกตะกอนถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการอบแห้งในเตาอบลมร้อนที่ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสุดท้ายอบในเตาอบสุญญากาศที่ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง PVA-g-GMA แสดงระดับการแทนที่ของเมทาคริเลต (degree of methacrylate substitution) ที่ 12.06%

3.2.3 การเตรียม SF-g-GMA

ในการกำจัดเซรีซิน เริ่มต้นโดยการต้มรังไหมดิบในสารละลาย Na_2CO_3 1% (w/v) ที่อุณหภูมิ 98 ± 2 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างรังไหมด้วยน้ำ DI สามครั้ง แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C ไหมที่ลอกกาแล้ว 10 กรัมถูกละลายในสารละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)_2$ (30:5:45:20 ในอัตราส่วนกรัม) แล้วนำไปอุ่นในไมโครเวฟ (Samsung, MS23K3513AW, 800 วัตต์) เป็นเวลา 2 นาที ในกระบวนการ grafting เตรียมอัตราส่วนโมลของ SF/GMA ที่ 1/0.490 แล้วเติม GMA ลงในสารละลาย SF จากนั้นกวนสารละลาย SF-g-GMA ที่ 60 ± 2 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลาย SF-g-GMA ไป dialysis ด้วยถุง Snakeskin pleated dialysis tube (MWCO at 10,000 Daltons) กับน้ำ DI ที่อุณหภูมิห้อง (RT) เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาและเกลือที่ตกค้าง หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงสารละลายที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อล้างสิ่งปนเปื้อนที่เป็นอนุภาค จากนั้นสารละลาย SF-g-GMA นำไปทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (freeze dry) และเก็บในเครื่องดูดความชื้น SF-g-GMA แสดงระดับการแทนที่ของเมทาคริเลต (degree of methacrylate substitution) ที่ 9.92%

3.2.4 การเตรียม GelMA ไฮโดรเจล (สำหรับบริเวณด้านนอกของหมอนรองเข้าเสมือนจริง)

ไฮโดรเจลเตรียมขึ้นโดยการผสมสารละลาย GelMA (5% w/v) ซึ่งถูกละลายในน้ำ DI ที่อุณหภูมิ 60 °C และคนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม IR2959 0.3% ซึ่งเป็นตัวเริ่มการถ่ายภาพลงในสารละลาย GelMA ที่ 60°C และคนต่อไปอีก 30 นาที เพื่อปรับปรุงความสามารถในการพิมพ์โดยการเพิ่มความหนืด จากนั้นเติม XG ที่ความเข้มข้น 4% (w/v) ลงในสารละลาย GelMA/IR2959 ที่อุณหภูมิห้อง และคนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.5 การเตรียม PVA-g-GMA/SF-g-GMA ไฮโดรเจล (สำหรับบริเวณด้านในของหมอนรองเข้าเสมือนจริง)

ไฮโดรเจลเตรียมขึ้นโดยการผสม PVA-g-GMA SF-g-GMA และ XG โดยเริ่มจากการละลาย PVA-g-GMA (10% w/v) ใน 10% DMSO ในน้ำ DI ที่อุณหภูมิ 60 °C และกวนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น SF-g-GMA (50% w/v) ถูกละลายในน้ำ DI ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยการกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อได้สารละลายทั้งสองแล้ว นำมาผสมกันในอัตราส่วน 75/25 (w/w ของสารแห้ง) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนเติม LAP 0.3% (w/v) ลงไปและคนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นเติม XG ในความเข้มข้น 3% (w/v) ลงในสารละลายที่อุณหภูมิห้องแล้วกวนต่ออีก 1 ชั่วโมง

3.2.6 การพิมพ์ไฮโดรเจลแบบสามมิติ

การพิมพ์ของไฮโดรเจลพิมพ์โดยใช้เครื่องพิมพ์ชีวภาพ 3 มิติ (ROKIT INVIVO Premium, ROKIT Healthcare, Seoul, Korea) พารามิเตอร์การพิมพ์แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์สำหรับการพิมพ์ไฮโดรเจลแบบสามมิติ

Project	Parameter
3D bioprinter model	ROKIT INVIVO Premium
Printing system	Single nozzle
Dispenser type	Syringe dispenser
Nozzle size	400 μm in inner diameter
Infill rotate angle	0/90°
Curing	UV light crosslinking (365 nm)

3.2.7 การพิมพ์ PCL/HA คอมพอลิเมอร์ ร่วมกับไฮโดรเจล แบบสามมิติ

เครื่องพิมพ์ชีวภาพ 3 มิติแบบหัวฉีดคู่ถูกนำมาใช้เพื่อพิมพ์หมอนรองเข่าที่เลียนแบบบริเวณหมอนรองเข่าของมนุษย์ด้านนอก โดยใช้ PCL/HA (หัวฉีด 1) และ GelMA hydrogel (หัวฉีด 2) นอกจากนี้มีการพิมพ์สามมิติเลียนแบบบริเวณหมอนรองเข่าของมนุษย์ด้านใน โดยใช้ PCL/HA (หัวฉีด 1) และ PVA-g-GMA/SF-g-GMA (หัวฉีด 2) พิมพ์แบบคู่ พารามิเตอร์การพิมพ์แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

3.2.8 การพิมพ์หมอนรองเข่าเสมือนจริง

การพิมพ์หมอนรองเข่าเสมือนจริง ที่มีความถูกต้องทั้งในแง่ของโครงสร้าง กายวิภาค และชีวเคมี เริ่มจาก ดาวน์โหลดโมเดล 3 มิติของหมอนรองเข่าเสมือนจริง (medial และ lateral) ซึ่งออกแบบด้วยซอฟต์แวร์ Blender จาก <https://cults3d.com/en/3d-model/game/meniscos-de-la-rodilla-humano-escala-1-1> ไฟล์การสร้างแบบจำลอง (.stl) จะถูกนำเข้าไปยังซอฟต์แวร์ NewCreatorK เวอร์ชัน 1.57.71 ROKIT INVIVO Premium, ROKIT Healthcare, Seoul, Korea) เพื่อออกแบบเส้นทางการพิมพ์ โดยใช้ไฟล์ G-code การตั้งค่าการพิมพ์ถูกกำหนดตามข้อมูลในตารางที่ 3.2 ก่อนที่จะเริ่มกระบวนการพิมพ์

ตารางที่ 3.2 พารามิเตอร์สำหรับการพิมพ์ PCL/HA คอมพอลิเมอร์ ร่วมกับไฮโดรเจล แบบสามมิติ

Project	Parameter
3D Bioprinter Model	ROKIT INVIVO Premium
Printing system	Dual nozzle
Printing nozzle	
Nozzle 1 (PCL/HA)	Hot-melting pneumatic dispenser (600 μm in inner diameter)
Nozzle 2 (Hydrogel bioink)	Syringe dispenser (400 μm in inner diameter)
Infill rotate angle	
Nozzle 1	0/90°
Nozzle 2	0/90°
Curing	UV light crosslinking (365 nm)

3.2.9 การฆ่าเชื้อชิ้นตัวอย่างสามมิติ

การฆ่าเชื้อดำเนินการภายในตู้ปลอดเชื้อ (Heal Force, Shanghai, China) เพื่อให้มั่นใจว่าสภาพแวดล้อมปราศจากเชื้อ ในขั้นแรก ตัวอย่างที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติจะถูกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 70% และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Yin et al., 2023) หลังจากนั้น ตัวอย่างจะถูกแช่ในน้ำเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่ปลอดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องอีก 24 ชั่วโมง ตัวอย่างแต่ละด้านได้รับการฆ่าเชื้อด้วยรังสี UV-C จากหลอดไฟที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรเป็นเวลา 30 นาทีต่อด้าน เพื่อให้มั่นใจว่าการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพ (Promnil et al., 2022)

3.2.10 แผนการวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลเชิงปริมาณทั้งหมดได้รับการวิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ T-test independent ในการระบุความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มเปรียบเทียบ ค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3 การตรวจสอบสมบัติของไฮโดรเจลแบบสามมิติ

3.3.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยา เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน

สัณฐานวิทยาของไฮโดรเจลสามมิติตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Carl Zeiss AURIGA®, Thuringia, Germany) โดยส่องด้านผิวหน้าและภาคตัดขวาง ขึ้นทดสอบถูกฉาบด้วยทองคำก่อนนำไปส่องกล้อง SEM ใช้ความต่างศักย์เร่ง (Acceleration voltage) ที่ 5 kV และเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่ได้จากภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดสามารถวัดได้ด้วยโปรแกรม ImageJ software (Wayne Rasband NIH, Washington DC, USA)

3.3.2 การหาค่าส่วนที่เป็นเจล (Gel fraction)

การศึกษาหาค่าส่วนที่เป็นเจล โดยนำตัวอย่างไฮโดรเจลที่ขึ้นรูปแล้ว ไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักแห้งก่อนแช่น้ำ) จากนั้นนำตัวอย่างไฮโดรเจลหลังอบไปแช่น้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (น้ำหนักแห้งหลังแช่น้ำ) จากนั้นคำนวณหาค่าส่วนที่เป็นเจล

$$\text{ค่าส่วนที่เป็นเจล (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งหลังแช่น้ำ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งก่อนแช่น้ำ (กรัม)}} \times 100 \quad (1)$$

3.3.3 การทดสอบการดูดซึมน้ำ (Water uptake)

การศึกษาหาค่าส่วนที่เป็นเจล โดยนำตัวอย่างไฮโดรเจลที่ขึ้นรูปแล้วไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไฮโดรเจลหลังอบไปแช่น้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักเปียกหลังแช่น้ำ) แล้วนำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (น้ำหนักแห้งหลังแช่น้ำ) จากนั้นคำนวณหาค่าการดูดซึมน้ำ

$$\text{ค่าการดูดซึมน้ำ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกหลังแช่น้ำ (กรัม)} - \text{น้ำหนักแห้งหลังแช่น้ำ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเปียกหลังแช่น้ำ (กรัม)}} \times 100 \quad (2)$$

3.3.4 การทดสอบการบวมน้ำ (Water swelling)

การศึกษาหาค่าส่วนที่เป็นเจล โดยนำตัวอย่างไฮโดรเจลที่ขึ้นรูปแล้วไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักแห้งก่อนแช่น้ำ) แล้วนำตัวอย่างไฮโดรเจลหลังอบไปแช่น้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักเปียกหลังแช่น้ำ) จากนั้นคำนวณหาการบวมน้ำ

$$\text{ค่าการบวมน้ำ (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักเปียกหลังแช่น้ำ (กรัม)} - \text{น้ำหนักแห้งหลังแช่น้ำ (กรัม)})}{\text{น้ำหนักแห้งหลังแช่น้ำ (กรัม)}} \times 100 \quad (3)$$

3.3.5 การทดสอบสมบัติแรงอัด (compression properties)

การทดสอบสมบัติแรงอัดของไฮโดรเจลที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ทดสอบเครื่อง Instron Universal Testing (Instron 5565, Norwood, MA, USA) พร้อมกับโหลดเซลล์ 5 kN โดยใช้แรงอัดที่ความเร็ว 1 มม./นาที่ และการบีบอัดที่ 80% ตามมาตรฐาน ASTM D695-15 ค่าโมดูลัสการบีบอัด (Compression modulus) ถูกคำนวณจากกราฟ ความเค้น ความเครียด ในช่วง 2%–10% ของตัวอย่าง

3.3.6 การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์

ความมีชีวิตของเซลล์บน GelMA ไฮโดรเจล ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ และ PVA-g-GMA/SF-g-GMA ไฮโดรเจล ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติได้รับการประเมินโดย Live/Dead viability assay ตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วถูกใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม ไบโอบราสท์ (3×10^4 เซลล์) ถูกเพาะลงบน GelMA ไฮโดรเจล ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ในขณะที่ HCPC (3×10^4 เซลล์) ถูกเพาะลงบน PVA-g-GMA/SF-g-GMA ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ทุกตัวอย่างมีอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลา 1 3 และ 7 วัน โดยมีการเปลี่ยนสารละลายสำหรับเลี้ยงเซลล์ (medium) ทุก 3 วัน การอยู่รอดของเซลล์ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต/เซลล์ตาย ในแต่ละตัวอย่างถูกวัดโดยชุดทดสอบ Live/Dead™ viability assay kit ((Calcein AM, 7-AAD, ab270789) and dead cell-Ethidium homodimer (ab145323)) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ confocal (Nikon ECLIPSE Ti, Waltham, MA, USA). การเรืองแสงสีเขียวแสดงถึงเซลล์ที่มีชีวิต ขณะที่การเรืองแสงสีแดงแสดงถึงเซลล์ที่ตายแล้ว หลังจาก 1 3 และ 7 วัน เซลล์จะถูกย้อมด้วยสารถย้อมเซลล์ที่มีชีวิต/เซลล์ตาย และบ่มในห้องมืดที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบสัญญาณวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal จำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มคือ 3 ตัวอย่าง ($n = 3$) ความมีชีวิตของเซลล์คำนวณจากจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (สีเขียว) ในกลุ่มตัวอย่าง หาค่าด้วยจำนวนเซลล์ทั้งหมด (ทั้งสีเขียวและสีแดง) โดยการนับด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ เวอร์ชัน 1.53t (Wayne Rasband NIH, Washington, DC, USA)

3.4 การตรวจสอบสมบัติของ PCL/HA/ไฮโดรเจล แบบสามมิติ

3.4.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยา (Morphology)

สัณฐานวิทยาของ PCL/HA/ไฮโดรเจล แบบสามมิติตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Carl Zeiss AURIGA®, Thuringia, Germany) โดยส่องด้านผิวหน้าและภาคตัดขวาง ขึ้นทดสอบถูกฉาบด้วยทองคำก่อนนำไปส่องกล้อง SEM ใช้ความต่างศักย์เร่ง (Acceleration voltage) ที่ 5 kV และเส้น

ผ่านศูนย์กลางของเส้นใย ที่ได้จากภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สามารถวัดได้ด้วยโปรแกรม ImageJ software (Wayne Rasband NIH, Washington DC, USA)

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการเปียกของพื้นผิว (Surface wettability)

ความสามารถในการเปียกของพื้นผิวของตัวอย่าง PCL/HA/ไฮโดรเจล ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ได้รับการประเมินโดยการตรวจสอบมุมสัมผัสของน้ำ โดยทำการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D7334-08 พื้นผิวของทุกตัวอย่างได้รับการบำบัดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจะวัดมุมสัมผัสที่อุณหภูมิห้อง (RT) ในช่วงเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล USB (1600x) จะถ่ายภาพหยดน้ำบนพื้นผิวของตัวอย่าง ซึ่งภาพเหล่านี้จะถูกประมวลผลโดยใช้ซอฟต์แวร์ ImageJ เวอร์ชัน 1.53t

3.4.3 การตรวจสอบความเป็นรูพรุน (Porosity)

การศึกษาหาค่าความเป็นรูพรุนสามารถทำได้ด้วยวิธี liquid displacement method โดยนำตัวอย่างไฮโดรเจลที่ขึ้นรูปแล้วผ่านการทำให้แห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (freeze drying) นำไปแช่ใน absolute ethanol ที่รู้ปริมาตรเริ่มต้น 5 ml เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรรวมของ Absolute ethanol และตัวอย่างไฮโดรเจล นำตัวอย่างไฮโดรเจลออกจาก จากนั้นวัดปริมาตร absolute ethanol ที่เหลือหลังจากการแช่ จากนั้นคำนวณหาค่าความเป็นรูพรุน

$$\text{ค่าความเป็นรูพรุน (\%)} = \frac{(\text{ethanol ที่รู้ปริมาตรเริ่มต้น (ml)} - \text{ethanol ที่เหลือ (ml)})}{(\text{ปริมาตรรวมของ ethanol และตัวอย่างไฮโดรเจล (ml)} - \text{ethanol ที่เหลือ (ml)})} \times 100 \quad (4)$$

3.4.4 การทดสอบสมบัติเชิงกล (Mechanical properties)

การทดสอบสมบัติแรงอัดของตัวอย่าง PCL/HA/ไฮโดรเจลที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ทดสอบโดยใช้เครื่อง Instron Universal Testing (Instron 5565, Norwood, MA, USA) พร้อมโหลดเซลล์ 5 กิโลนิวตัน โดยใช้ความเร็วการบีบอัด 1 มิลลิเมตร./นาที และระยะการบีบอัด 80% ตามมาตรฐาน ASTM D695-15 นอกจากนี้ สมบัติแรงดึง (tensile properties) ของตัวอย่าง PCL/HA/ไฮโดรเจลยังถูกทดสอบด้วยเครื่องทดสอบแรงดึง (SHIMADSU AGX-50kNVD, Tokyo, Japan) โหลดเซลล์ 5 kN ตามมาตรฐาน ASTM D882 ตัวอย่างถูกติดตั้งที่กึ่งกลางของ tensile grasp jaw โดยหนีบตัวอย่างด้านบนและด้านล่าง ความยาว 10 มม. และใช้ gauge length 30 มิลลิเมตร. สำหรับการทดสอบแรงดึง การทดสอบดำเนินการที่อัตราความเร็ว 3 มิลลิเมตร./นาที

3.4.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า (Gene expression)

ไฟโบรบลาสต์ (3×10^4 เซลล์/หลุม) ถูกเพาะลงบน PCL/HA/ ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วถูกใส่ไว้ในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม ในขณะที่ HCPC (3×10^4 เซลล์/หลุม) ถูกเพาะลงบน PCL/HA/ ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วถูกใส่ไว้ในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม โดยทำอย่างละ 3 ซ้ำ ใน 1 ตัวอย่าง 1 ตัวอย่างเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 7 14 และ 28 วัน ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ตามเวลาที่กำหนด ทำการสกัด Total RNA โดยใช้ชุด RNeasy mini-Kit

(Qiagen, Hilden, Germany) และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเชิงปริมาณโดยใช้เทคนิค qRT-PCR ดำเนินการด้วยชุด SYBR Green kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) และชุด Fluorescein Kit (BIOLINE, London, UK) ยีนเป้าหมายคือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (COL1A1) ซึ่งแสดงฟีโนไทป์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และคอลลาเจนชนิดที่ 2 (COL2A1) อะกรีแคน (ACAN) และโปรตีน SRY-box transcription factor 9 (SOX9) ซึ่งแสดงฟีโนไทป์ของเซลล์คอนโดโรไซต์ (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ลำดับของชุด primer สำหรับเทคนิค qRT-PCR

Gene		Primer sequence (5' to 3')
Type I collagen (COL1A1)	Sense	GGA GGA GAG TCA GGA AGG
	Antisense	GCA ACA CAG TTA CAC AAG G
Type II collagen (COL2A1)	Sense	GGC AGA GGT ATA ATG ATA AG
	Antisense	ATG TCG TCG CAG AGG
Aggrecan (ACAN)	Sense	ATA CCG TCG TAG TTC C
	Antisense	TCC TTG TCT CCA TAG C
SRY-Box Transcription Factor 9 (SOX9)	Sense	AGG TGC TCA AAG GCT ACG AC
	Antisense	GTA ATC CGG GTG GTC CTT CT



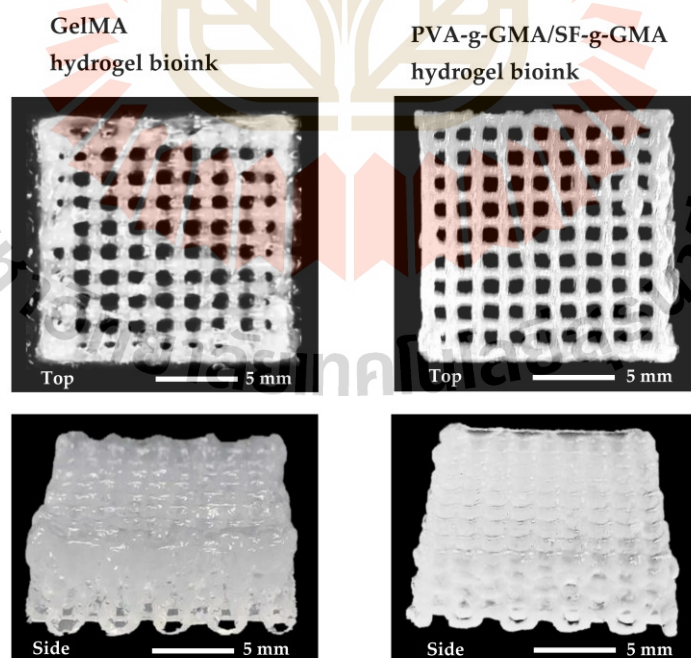
บทที่ 4

ผลการวิจัย

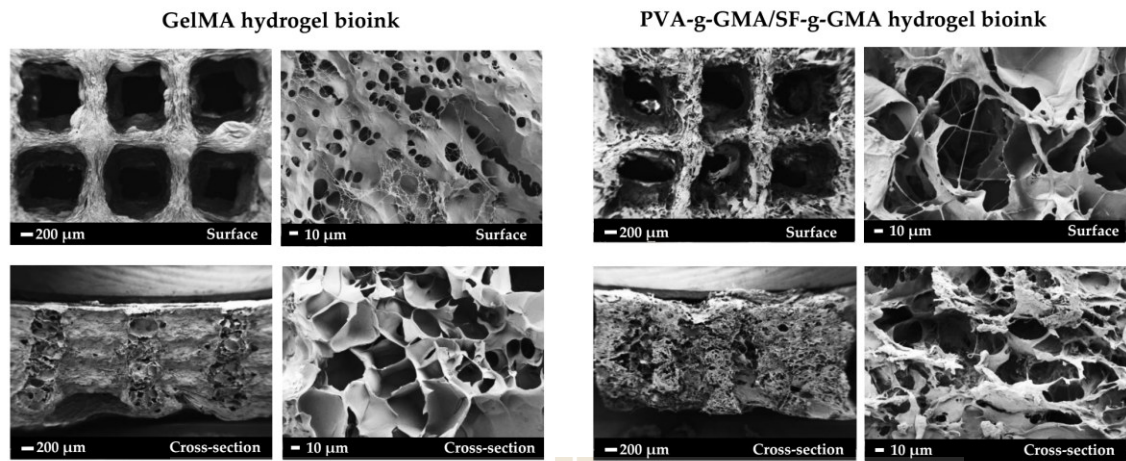
4.1 การศึกษาสมบัติของไฮโดรเจลแบบสามมิติ

4.1.1 ลักษณะและสัณฐานวิทยาของไฮโดรเจลแบบสามมิติ

ลักษณะของไฮโดรเจลที่พิมพ์แบบ 3 มิติ โดยใช้ GelMA ไฮโดรเจล และ PVA-g-GMA/SF-g-GMA ไฮโดรเจล แสดงให้เห็นคุณภาพสูงของทั้งสองสูตรที่ออกแบบสำหรับบริเวณด้านนอกและด้านในของหมอนรองเข้าเสมือนจริง ลักษณะของไฮโดรเจลนี้แสดงถึงความสมบูรณ์ของโครงสร้างและความแม่นยำในการพิมพ์ที่ดี (รูปภาพที่ 4ก) โดยทั้งสองสูตรมีความหนาของเส้นใยที่สม่ำเสมอ (เส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใย $402 \pm 4 \mu\text{m}$ สำหรับ GelMA และ $408 \pm 8 \mu\text{m}$ สำหรับ PVA-g-GMA/SF-g-GMA) ซึ่งแสดงถึง รูปร่าง ความแม่นยำ และเสถียรภาพที่ดีในทั้งมุมมองด้านบนและด้านข้าง การตรวจสอบลักษณะของไฮโดรเจลที่พิมพ์แบบ 3 มิติโดยใช้ FE-SEM แสดงให้เห็นถึงลักษณะรูพรุนที่มีความสำคัญในการสนับสนุนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (รูปภาพที่ 4ข) ทั้งในภาพพื้นผิวและภาพตัดขวาง FE-SEM มีลักษณะที่มีรูพรุนขนาดเล็กที่เชื่อมต่อกัน โดย GelMA ไฮโดรเจล ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติมีขนาดรูพรุนที่พื้นผิวอยู่ระหว่าง 5 ถึง $19 \mu\text{m}$ และขนาดรูพรุนที่หน้าตัดอยู่ระหว่าง 9 ถึง $85 \mu\text{m}$ ในขณะที่ PVA-g-GMA/SF-g-GMA ไฮโดรเจล แสดงขนาดรูพรุนที่พื้นผิวอยู่ระหว่าง 9 ถึง $87 \mu\text{m}$ และขนาดรูพรุนที่ภาคตัดขวาง อยู่ระหว่าง 5 ถึง $80 \mu\text{m}$ (รูปภาพที่ 5) ขนาดรูพรุนที่อยู่ในช่วงระหว่าง 5 ถึง $350 \mu\text{m}$ เป็นที่ยอมรับของโครงร่างเลี้ยงเซลล์ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ เนื่องจากขนาดเหล่านี้ช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kramschuster et al., 2013) ดังนั้นลักษณะของไฮโดรเจลนี้แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลสามมิติทั้งสองสูตรมีขนาดรูพรุนที่เหมาะสม ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการสนับสนุนการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

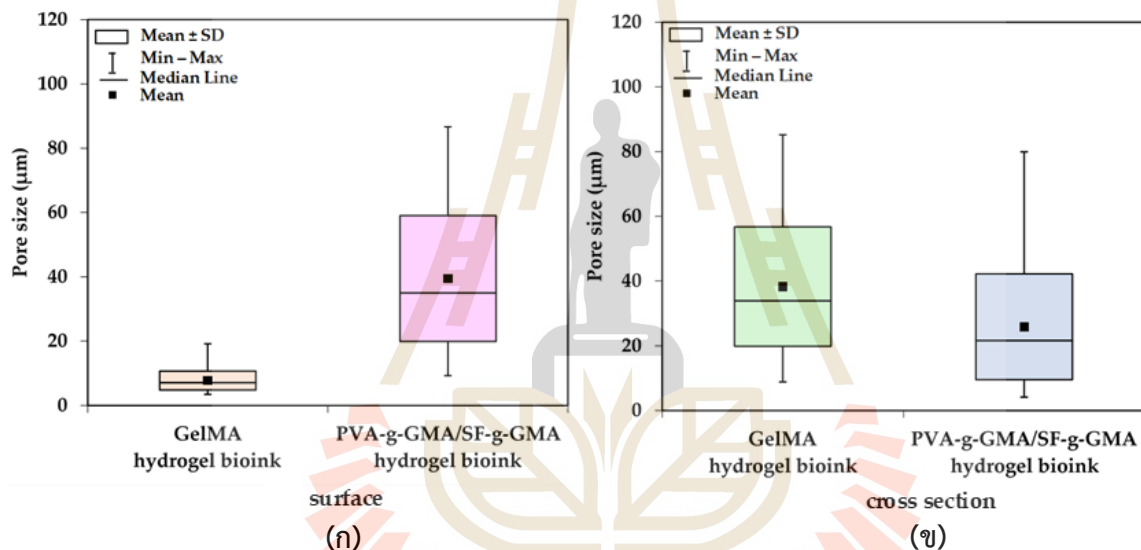


(ก)



(ข)

รูปภาพที่ 4.1 (ก) ลักษณะของไฮโดรเจลที่พิมพ์สามมิติ (ข) ภาพ FE-SEM ของไฮโดรเจลแบบสามมิติ



รูปภาพที่ 4.2 การกระจายตัวขนาดรูพรุนของไฮโดรเจลที่พิมพ์แบบสามมิติ

4.1.2 ส่วนที่เป็นเจล การดูดซึมน้ำ และการบวมน้ำ

การตรวจสอบ ส่วนที่เป็นเจลของไฮโดรเจลหลังจากการแช่ในน้ำแสดงถึงระดับของการเชื่อมขวาง (cross-linking) ซึ่งสามารถประเมินได้จากเปอร์เซ็นต์ของวัสดุที่ยังคงไม่ละลายหลังจากการแช่ในน้ำ ค่าของวัสดุที่ไม่ละลายสะท้อนถึงระดับของการเชื่อมขวางที่เกิดขึ้นในโครงสร้างของไฮโดรเจล โดยทั่วไป ไฮโดรเจลที่ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อต้องมีสัดส่วนความเป็นเจลอย่างน้อย 80% (Ozmen et al., 2006) ผลการทดสอบในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลทั้งสองสูตรที่พิมพ์แบบ 3 มิติ มีค่าเกิน 80% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลมีการเชื่อมขวางที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งช่วยให้โครงสร้างของไฮโดรเจลคงความสมบูรณ์ในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำ

การดูดซึมน้ำ และการบวมน้ำ เป็นสมบัติที่สำคัญของวัสดุวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งมีผลต่อการส่งสารอาหาร และการเจริญเติบโตของเซลล์ ในงานวิจัยทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มักต้องการให้วัสดุมีการดูดซึมน้ำไม่น้อยกว่า 50% และการขยายตัวสูงถึง 100% (Cui et al., 2023) ผลการทดสอบในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าไฮโดร

เจลทั้งสองสูตรที่พิมพ์แบบ 3 มิติสามารถแสดงคุณสมบัติที่เหมาะสมได้ โดยมีการดูดซึมน้ำสูง (74% และ 82% สำหรับไฮโดรเจล GelMA และ PVA-g-GMA/SF-g-GMA ตามลำดับ) และการขยายตัวที่ดี (281% และ 462% ตามลำดับ) ซึ่งบ่งชี้ว่าไฮโดรเจลทั้งสองชนิดมีความสามารถในการรองรับสภาพแวดล้อมที่มีน้ำและส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.1 ส่วนที่เป็นเจล การดูดซึมน้ำ และการบวมตัวของไฮโดรเจลแบบสามมิติ ($n=6$)

Formulations	Gel fraction (%)	Water absorption (%)	Water swelling (%)
GelMA hydrogel bioink	81.81 $\pm$ 2.29	82.10 $\pm$ 1.36	462.03 $\pm$ 43.02
PVA-g-GMA/SF-g-GMA hydrogel bioink	82.39 $\pm$ 3.17	73.73 $\pm$ 0.81	280.95 $\pm$ 11.87

4.1.3 สมบัติแรงอัด

การทนต่อแรงอัด (compressive stress) และโมดูลัสแรงอัด (compressive modulus) ของไฮโดรเจลที่พิมพ์แบบ 3 มิติแสดงไว้ในตารางที่ 4.2 ทั้งไฮโดรเจล GelMA และ ไฮโดรเจล PVA-g-GMA/SF-g-GMA มีค่าการทนต่อแรงอัด (0.025 และ 0.046 MPa ตามลำดับ) และโมดูลัสแรงอัด (0.017 และ 0.010 MPa ตามลำดับ) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสมบัติแรงอัดของเนื้อเยื่อหมอนรองเข่าของมนุษย์ (Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2019; Baro et al., 2012; Andrews et al., 2015) สิ่งนี้บ่งชี้ว่าไฮโดรเจลที่พิมพ์แบบ 3 มิติไม่เหมาะที่จะใช้เป็นหมอนรองเข่าเสมือนจริง และไม่ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้แทนหมอนรองเข่าของมนุษย์เนื่องจากมีสมบัติเชิงกลไม่เพียงพอ นอกจากนี้ การศึกษาจำนวนมากได้รายงานเกี่ยวกับสมบัติแรงอัดของไฮโดรเจลที่พิมพ์แบบ 3 มิติสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อหมอนรองเข่า ได้แก่ ไฮโดรเจลจาก เจลแลนกัน/ไฟบริโนเจน นาโนเซลลูโลส/อัลจิเนต คอลลาเจน และซิลค์ไฟโบรอิน/เจลาติน พบว่าสมบัติการทนต่อการไม่สามารถเทียบได้กับหมอนรองเข่ามนุษย์ (Costa et al., 2020; Markstedt et al., 2015; Rhee et al., 2016; Bandyopadhyay et al., 2019)

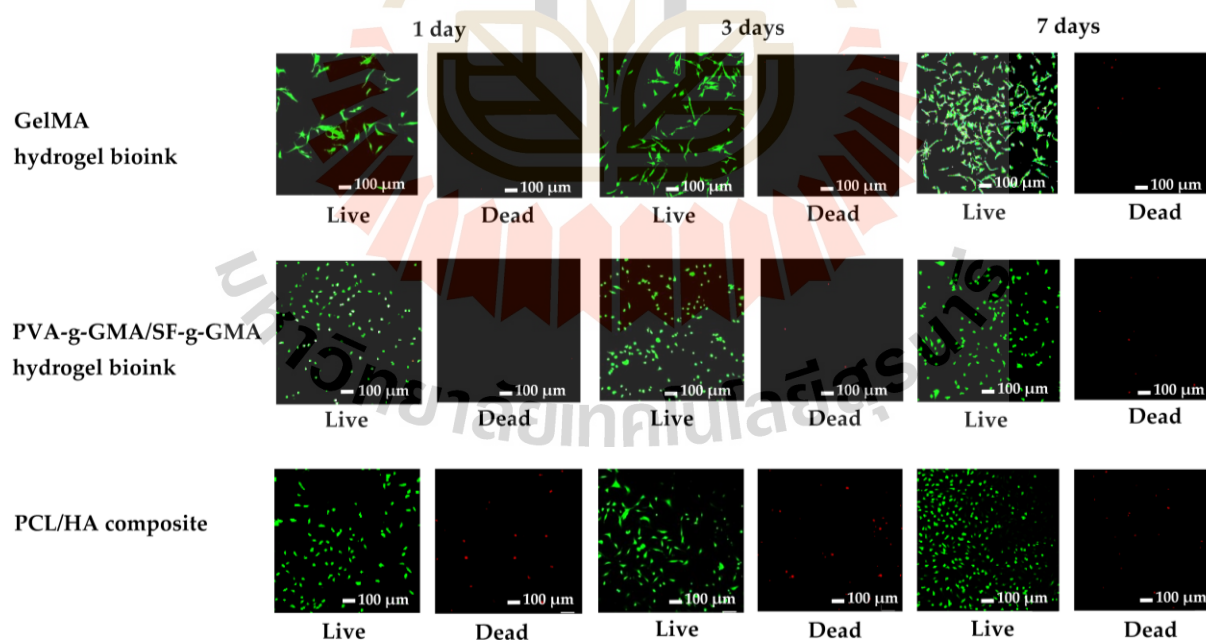
สำหรับการใช้งานจริง การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริง ที่พิมพ์แบบ 3 มิติโดยใช้ PCL/HA และไฮโดรเจล ด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบคู่ คาดว่าจะเลียนแบบโครงสร้าง สมบัติทางกายภาพและเชิงกล และองค์ประกอบทางชีวภาพของหมอนรองเข่ามนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.2 สมบัติแรงอัดของไฮโดรเจลแบบสามมิติ ($n=5$)

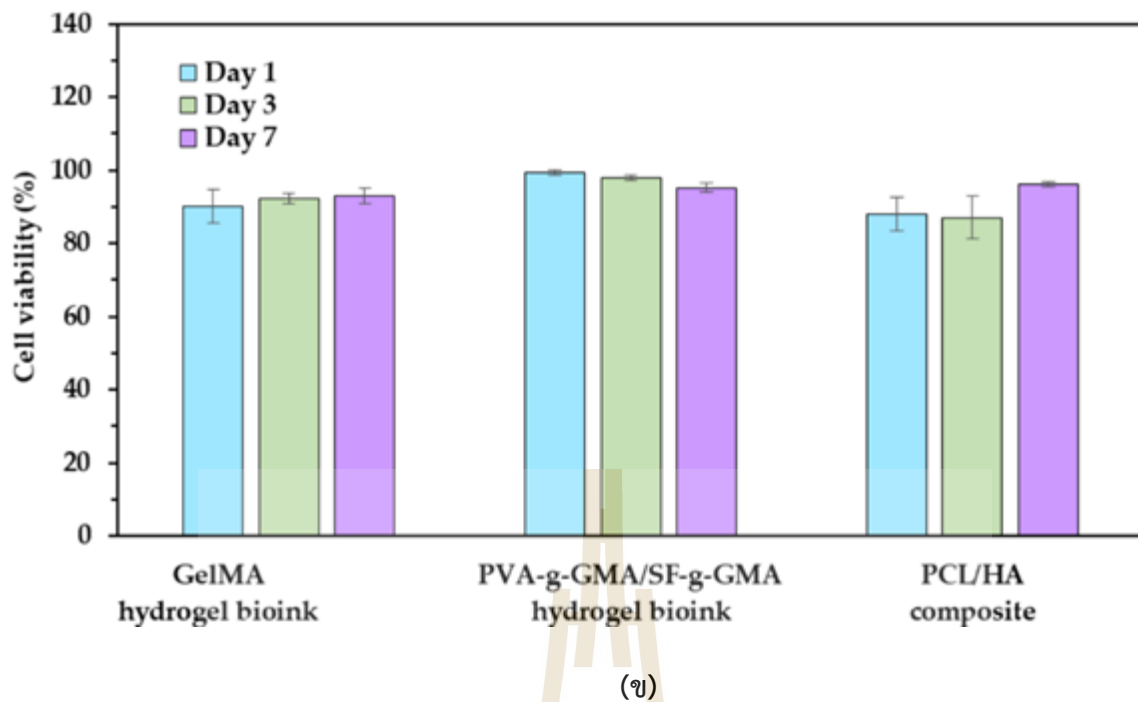
Formulations	Compressive Strength (MPa)	Compressive Modulus (MPa)
GelMA hydrogel bioink	0.025 $\pm$ 0.003	0.017 $\pm$ 0.003
PVA-g-GMA/SF-g-GMA hydrogel bioink	0.046 $\pm$ 0.002	0.010 $\pm$ 0.002
Human meniscus	8.77-18.10	0.10-3

4.1.4 ความมีชีวิตของเซลล์

ผลการศึกษาจากการย้อมสีด้วยสีย้อมเซลล์ที่มีชีวิต/เซลล์ตาย สำหรับไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรเจล GelMA ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ และสำหรับ HCPCs ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรเจล PVA-g-GMA/SF-g-GMA และคอมพอสิต PCL/HA ที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 3 และ 7 วัน แสดงในรูปที่ 6(ก) ในการทดสอบนี้ เซลล์ที่มีชีวิตถูกย้อมเป็นสีเขียว ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะถูกย้อมเป็นสีแดง โดยผลการศึกษาพบว่า ไฟโบรบลาสต์ในไฮโดรเจล GelMA แสดงสัญญาณวิทยาที่รูปร่างยาว ซึ่งบ่งชี้ถึงสถานะการเผาผลาญที่ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพและการเจริญเติบโตที่ดี ในขณะที่ HCPCs ในไฮโดรเจลทั้ง PVA-g-GMA/SF-g-GMA และคอมพอสิต PCL/HA แสดงสัญญาณวิทยาที่กลมโค้งมน ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมของเซลล์ต้นกำเนิด (progenitor cell) หลังจากการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 1 3 และ 7 วัน ผลการย้อมสีแสดงให้เห็นว่า ทั้งไฟโบรบลาสต์และ HCPCs ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ดี โดยมีเซลล์ที่ตายเพียงเล็กน้อยที่ระบุจากการย้อมสีแดง ซึ่งส่วนใหญ่เซลล์เหล่านี้ยังคงมีการย้อมสีเขียวที่เด่นชัด โดยเฉพาะความมีชีวิตของเซลล์ในทั้งสองสูตรไฮโดรเจลยังคงสูงกว่า 90% ตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 6(ข)) นอกจากนี้ ผลการศึกษาจากการย้อมสีด้วยสีย้อมเซลล์ที่มีชีวิต/เซลล์ตาย สำหรับ HCPCs ใน PCL/HA คอมพอสิต พบว่า ความมีชีวิตของเซลล์ยังคงสูงกว่า 87% หลังจากการเพาะเลี้ยง 1 และ 3 วัน และเกิน 90% หลังจาก 7 วัน ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าไฮโดรเจลและ PCL/HA คอมพอสิต เหล่านี้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการสร้างสภาพแวดล้อมที่สนับสนุนการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การรักษาความมีชีวิตของเซลล์ในระดับสูงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ยาวนานนั้นมีความสำคัญในบริบทของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมันสนับสนุนการทำงานของเซลล์ที่จำเป็นสำหรับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในอนาคต



(ก)



รูปภาพที่ 4.3 (ก) การย้อมสีด้วยสีย้อมเซลล์ที่มีชีวิต/เซลล์ตาย ของไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงใน GelMA ไฮโดรเจล HCPCs ที่เพาะเลี้ยงใน PVA-g-GMA/SF-g-GMA ไฮโดรเจล และ PCL/HA คอมพอสิต (ข) ความมีชีวิตของเซลล์ในไฮโดรเจล และ PCL/HA คอมพอสิต ที่มีการการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 1 3 และ 7 วัน ($n = 3$)

4.2 การศึกษาสมบัติของไฮโดรเจลแบบสามมิติ

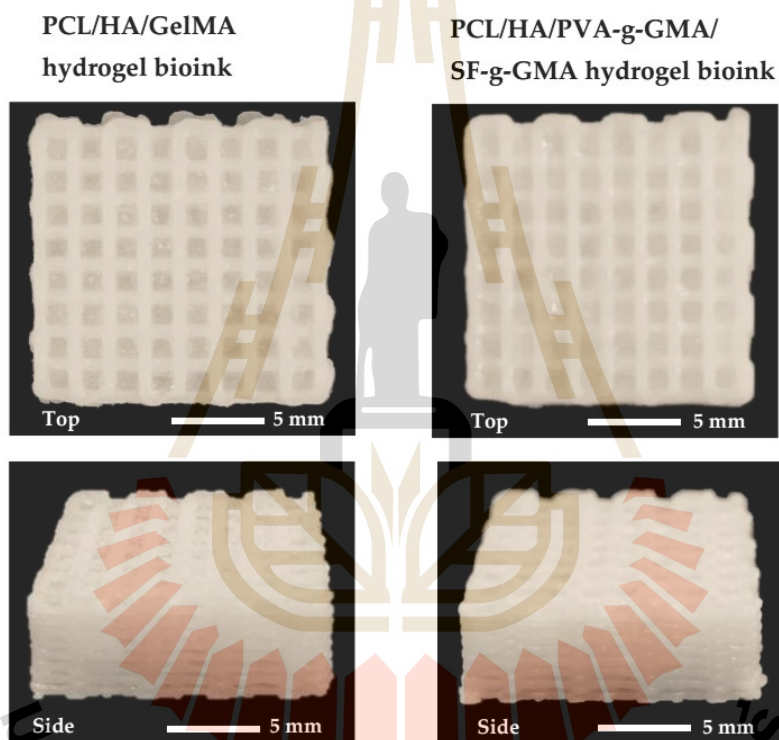
4.2.1 ลักษณะ ความเป็นรูพรุน และลักษณะรูพรุนของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ

การพิมพ์สามมิติแบบคู่โดยใช้ PCL/HA/ไฮโดรเจล สำหรับบริเวณภายนอกและภายในของหมอนรองเข้าเสมือนจริงแสดงดังรูปภาพที่ 4.4 (ก) โดยบริเวณภายนอกเป็นการพิมพ์สามมิติด้วย PCL/HA/GelMA ขณะที่บริเวณภายในเป็นการพิมพ์สามมิติด้วย PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA ทั้งสองบริเวณมีลักษณะรูปร่างที่สม่ำเสมอและความหนาของเส้นที่พิมพ์ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเส้นที่พิมพ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $616 \pm 10 \mu\text{m}$ และ $613 \pm 3 \mu\text{m}$ ซึ่งความสม่ำเสมอนี้มีความสำคัญในการรักษาสมบัติเชิงกลและประสิทธิภาพทางชีวภาพที่สม่ำเสมอตลอดทั้งโครงสร้าง การแสดงออกถึงความสามารถในการทำซ้ำและความน่าเชื่อถือของกระบวนการพิมพ์ ซึ่งเห็นได้จากความสม่ำเสมอในรูปร่างและความหนาของเส้นที่พิมพ์ ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความแม่นยำและการควบคุมที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการพิมพ์ นอกจากนี้ ช่องว่างของ PCL/HA ที่พิมพ์ใน 3D ถูกเติมเต็มด้วยการพิมพ์ไฮโดรเจล ทั้งสองบริเวณมีลักษณะรูพรุนที่คล้ายกัน โดยมีค่าความเป็นรูพรุนที่ $34.02 \pm 2.18\%$ สำหรับบริเวณภายนอก และ $33.50 \pm 3.34\%$ สำหรับบริเวณภายใน ซึ่งใกล้เคียงกับความเป็นรูพรุนของหมอนเขามนุษย์ที่ $33.92\% \pm 0.03\%$ (Zhu et al., 2021)

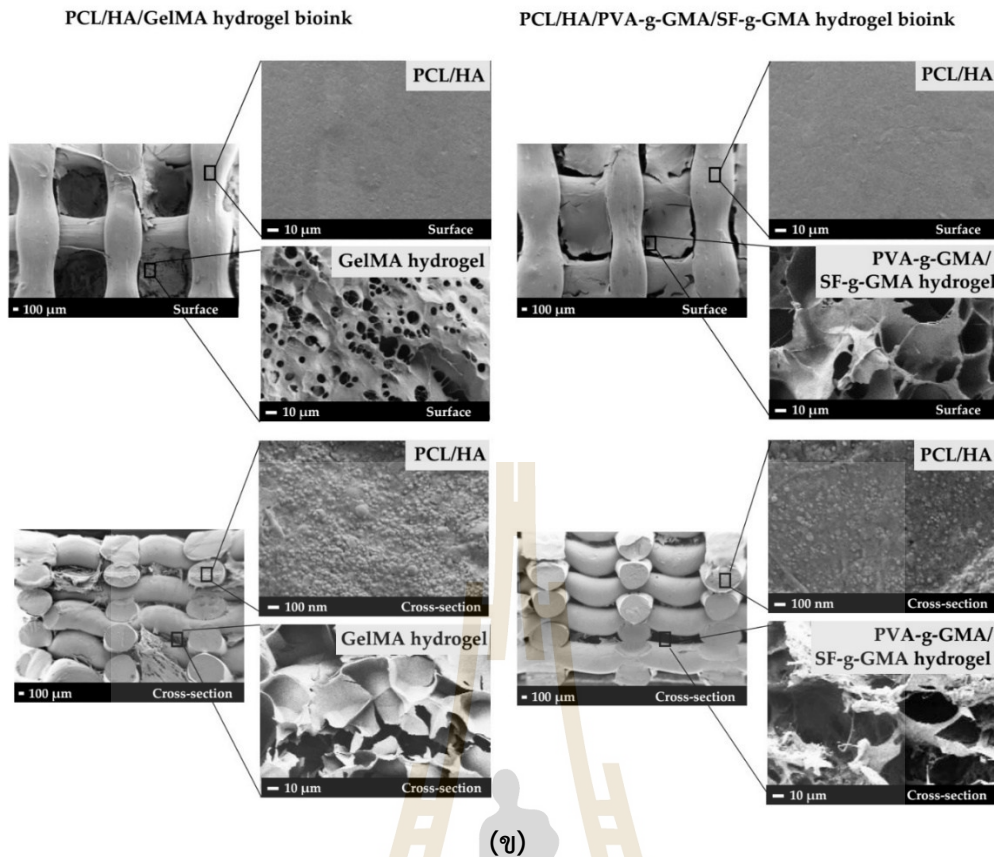
รูปที่ 4.4 (ข) แสดงลักษณะผิวหน้าและภาคตัดขวางของโครงสร้าง PCL/HA/hydrogel ที่พิมพ์สามมิติอย่างละเอียด โดยใช้กล้อง FE-SEM เส้น PCL/HA ที่พิมพ์ มีลักษณะเรียบบริเวณพื้นผิวด้านหน้า ในขณะที่มีลักษณะผิวที่ขรุขระของเส้นใย PCL/HA ในส่วนภาคตัดขวางซึ่งแสดงการกระจายตัวของ HA อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งช่วยเสริมสมบัติเชิงกลของโครงสร้าง ช่องว่างระหว่างเส้นใย PCL/HA ถูกพิมพ์ด้วย GelMA ในบริเวณ

ภายนอก และ PVA-g-GMA/SF-g-GMA hydrogel ในบริเวณภายใน ทั้งสองไฮโดรเจล แสดงโครงสร้างที่มีรูพรุนขนาดเล็กสูงและมีเครือข่ายที่เชื่อมโยงกัน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ ลักษณะโครงสร้างแบบนี้จะช่วยให้การแลกเปลี่ยนสารอาหารและของเสียเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยเพิ่มพลศาสตร์ของของเหลว โดยให้ของเหลวและสารชีวภาพแทรกซึมเข้าไปและสนับสนุนการส่งสัญญาณเซลล์ ซึ่งสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเซลล์ที่สำคัญในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อ (Zhou et al., 2023; Liang et al., 2023)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้เน้นย้ำถึงการออกแบบและการประดิษฐ์อย่างพิถีพิถันของ PCL/HA/ไฮโดรเจล ที่พิมพ์แบบสามมิติ ซึ่งบ่งบอกถึงศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สามารถเลียนแบบโครงสร้างและหน้าที่ที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อหมอนรองเข่า ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการปลูกถ่ายและการฟื้นฟูในสภาพแวดล้อมของหมอนรองเข่าอย่างมีประสิทธิภาพ



(ก)



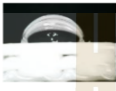
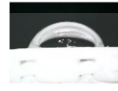
(ข)

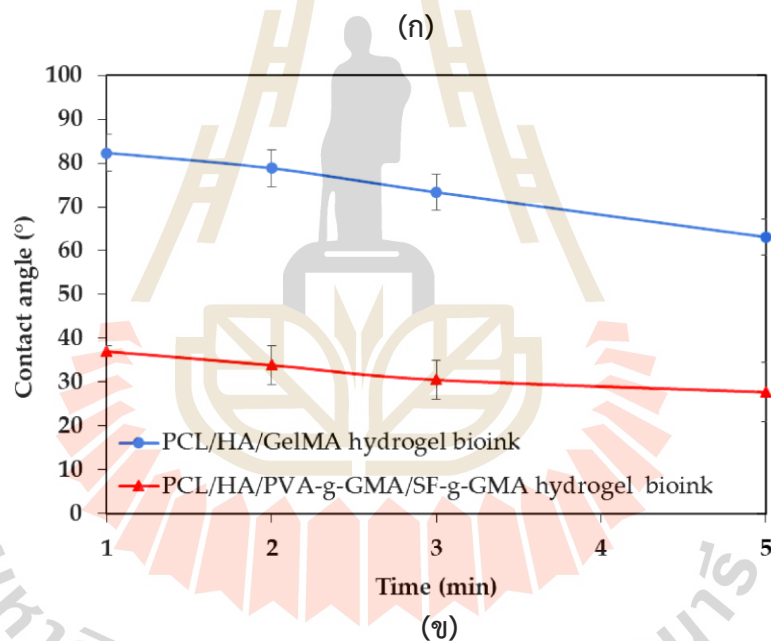
รูปภาพที่ 4.4 (ก) ลักษณะ (ข) สัณฐานวิทยาของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ

4.2.2 ความสามารถในการเปียกของพื้นผิวของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ

ความสามารถในการเปียกที่พื้นผิวของโครงร่างเลี้ยงเซลล์ เป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อสมบัติการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวน และการเจริญเติบโตของเซลล์ จากการศึกษาของ Gui-Bo และคณะ และ Wei และคณะ (Wei et al., 2009; Gui-Bo et al., 2010) ต่างพบว่า การเพิ่มความสามารถในการเปียกให้กับพื้นที่ผิวของโครงร่างเลี้ยงเซลล์ช่วยเพิ่มสมบัติการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวน และการเจริญเติบโตของเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญ ในการประเมินความสามารถในการเปียกของโครงร่างเลี้ยงเซลล์ จะใช้วิธีวัดมุมที่สัมผัส (water contact angle) ระหว่างผิวชิ้นงานกับหยดน้ำ การวัดค่ามุมของหยดน้ำ สามารถประเมินผลได้ดังนี้ ค่ามุมสัมผัส เท่ากับ 0° หมายถึง มีความสามารถในการเปียกที่สมบูรณ์ ค่ามุมสัมผัส 1° ถึง น้อยกว่า 10° หมายถึง มีความสามารถในการเปียกที่สูง ค่ามุมสัมผัส 10° ถึง น้อยกว่า 90° หมายถึง มีความสามารถในการเปียก ค่ามุมสัมผัส 90° ถึง น้อยกว่า 150° หมายถึง มีความสามารถในการเปียกต่ำ ค่ามุมสัมผัส 150° ถึง น้อยกว่า 180° หมายถึง มีความสามารถในการเปียกต่ำมาก และค่า water contact angle เท่ากับ 180° หมายถึง ไม่มีความสามารถในการเปียก (Ferrari et al., 2019) ในการศึกษาครั้งนี้ ความสามารถในการเปียกของพื้นผิวโครงสร้างหมอนรองเข่าที่พิมพ์สามมิติ โดยใช้ PCL/HA ร่วมกับไปโออิงค์ไฮโดรเจลหลายประเภท ได้รับการประเมินโดยการวัดมุมสัมผัสของน้ำกลั่น การพิมพ์สามมิติแบบคู่ของโครงสร้าง PCL/HA โดยผสมกับไฮโดรเจลคือ GelMA และ PVA-g-GMA/SF-g-GMA ช่วยเพิ่มความสามารถในการเปียกของวัสดุเหล่านี้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หลังจากการหยดน้ำบนพื้นผิวเป็นเวลา 1 นาที มุมสัมผัสลดลงเหลือ $82.33^\circ \pm 2.27^\circ$ สำหรับโครงสร้าง PCL/HA/GelMA และ $37.00^\circ \pm 1.23^\circ$ สำหรับโครงสร้าง PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA (รูปที่ 4.5 (ก)) นอกจากนี้ มุมสัมผัสน้ำที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา (dynamic contact angle) ของ

โครงสร้าง PCL/HA/ไฮโดรเจลที่พิมพ์สามมิติทั้งหมด ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปจาก 1 ถึง 5 นาที ซึ่งบ่งชี้ว่าโครงสร้างเหล่านี้มีความสามารถในการเปียกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานี้ (รูปที่ 4.5 (ข)) การลดลงของมุมสัมผัสน้ำอย่างชัดเจนนี้แสดงให้เห็นถึงการปรับปรุงที่เด่นชัดในความสามารถในการเปียก ซึ่งบ่งบอกว่าไฮโดรเจลเหล่านี้ช่วยเพิ่มความสามารถในแรงดึงดูดน้ำของโครงสร้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเพิ่มขึ้นของความสามารถในการเปียกเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโครงสร้างในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากช่วยให้การรวมตัวกับสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำและของเหลวทางชีววิทยาดีขึ้นและกระตุ้นกระบวนการฟื้นฟูเนื้อเยื่อ

	T = 1 min	T = 2 min	T = 3 min	T = 5 min
PCL/HA/GelMA hydrogel bioink				
	$\theta = 82.33^\circ$	$\theta = 78.82^\circ$	$\theta = 73.35^\circ$	$\theta = 63.12^\circ$
PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA hydrogel bioink				
	$\theta = 37.00^\circ$	$\theta = 33.88^\circ$	$\theta = 30.55^\circ$	$\theta = 27.72^\circ$

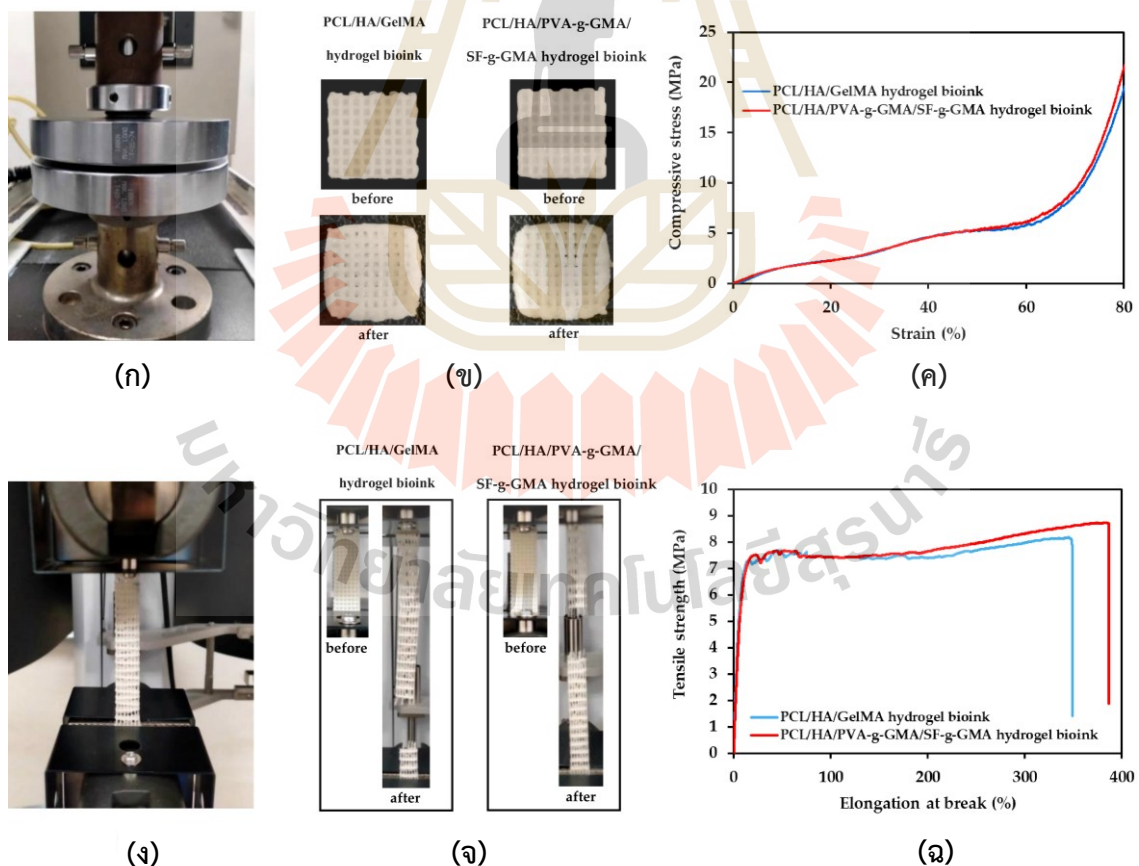


รูปภาพที่ 4.5 (ก) ภาพค่ามุมสัมผัสของหยดน้ำบนพื้นผิว (ข) มุมสัมผัสน้ำที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาของ PCL/HA/ไฮโดรเจลที่พิมพ์แบบสามมิติ ($n = 6$)

4.2.3 สมบัติเชิงกลของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ

สมบัติเชิงกลของ PCL/HA/ไฮโดรเจลที่พิมพ์สามมิติ มีความสำคัญต่อการใช้งานในการปลูกถ่ายหมอนรองเข้าเสมือนจริง ซึ่งแสดงรายละเอียดดังรูปภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.3 PCL/HA/GelMA ใช้พิมพ์สำหรับบริเวณภายนอกของหมอนรองเข้า มีค่าการทนต่อแรงอัด 20.67 MPa โมดูลัสแรงอัด 31.96 MPa การทนต่อแรงดึงที่ 7.78 MPa โมดูลัสแรงดึงที่ 80.35 MPa และค่าความยืดหยุ่นที่จุดขาดที่ 354.62% ในทำนองเดียวกัน PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA ใช้พิมพ์สำหรับบริเวณภายในของหมอนรองเข้า มีค่าการทนต่อแรงอัด 21.26 MPa, โมดูลัสแรงอัด 32.73 MPa การทนต่อแรงดึง 8.05 MPa โมดูลัสแรงดึง 89.37 MPa และค่า

ความยืดหยุ่นที่จุดขาด 333.66% PCL/HA/ไฮโดรเจลที่พิมพ์สามมิติมีความใกล้เคียงกับสมบัติของหมอนรองเข่ามนุษย์ โดยเฉพาะในแง่ของการทนต่อแรงอัด การทนต่อแรงดึง และโมดูลัสแรงดึง (Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2019; Du et al., 2023; López-Calzada et al., 2016; Stocco et al., 2022) ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.3 ความคล้ายคลึงกันนี้บ่งชี้ว่าโครงสร้างที่พิมพ์สามมิติสามารถรองรับน้ำหนักเชิงกลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยความสามารถในการทนต่อการยืดและการเปลี่ยนรูปซึ่งมีความสำคัญต่อการรักษาเสถียรภาพของข้อเข่า แม้ว่า PCL/HA/ไฮโดรเจล จะแสดงโมดูลัสแรงอัดตัวและค่าความยืดหยุ่นที่จุดขาดที่สูงกว่าหมอนรองเข่ามนุษย์ (Baro et al., 2012; Andrews et al., 2015; Bochynska et al., 2016) แต่สมบัติเหล่านี้ช่วยให้โครงสร้างสามารถรับน้ำหนักและการเปลี่ยนรูปได้ดีขึ้น (Inyang et al., 2020). โมดูลัสแรงอัดที่เพิ่มขึ้นช่วยในการเคลื่อนไหวของข้อ ขณะที่ค่าความยืดหยุ่นที่จุดขาดที่สูงขึ้นช่วยให้โครงสร้างยืดหยุ่นและรองรับการเคลื่อนไหวของข้อได้ดี การศึกษาในหลาย ๆ งานวิจัย มีการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่พิมพ์สามมิติสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อหมอนรองเข่า แต่โครงสร้างเหล่านี้มักมีสมรรถนะเชิงกลที่ต่ำกว่าเนื้อเยื่อหมอนรองเข่าธรรมชาติของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น โครงสร้าง PCL และ PCL/GelMA/MECM มีโมดูลัสแรงดึง 30.59 MPa และ 24.86 MPa ตามลำดับ (Jian et al., 2021) นอกจากนี้ การทนต่อแรงอัดของ PCL/PC ที่พิมพ์สามมิติรายงานว่ามีค่าแค่เพียง 1.27 MPa (Chae et al., 2021) และโครงสร้างที่ทำจากคอลลาเจนและ PCL/PU ก็มีสมรรถนะเชิงกลที่ไม่ดี ทำให้เกิดการแตกหักและความล้มเหลวในการทดลองทางคลินิก (Kohli et al., 2022)



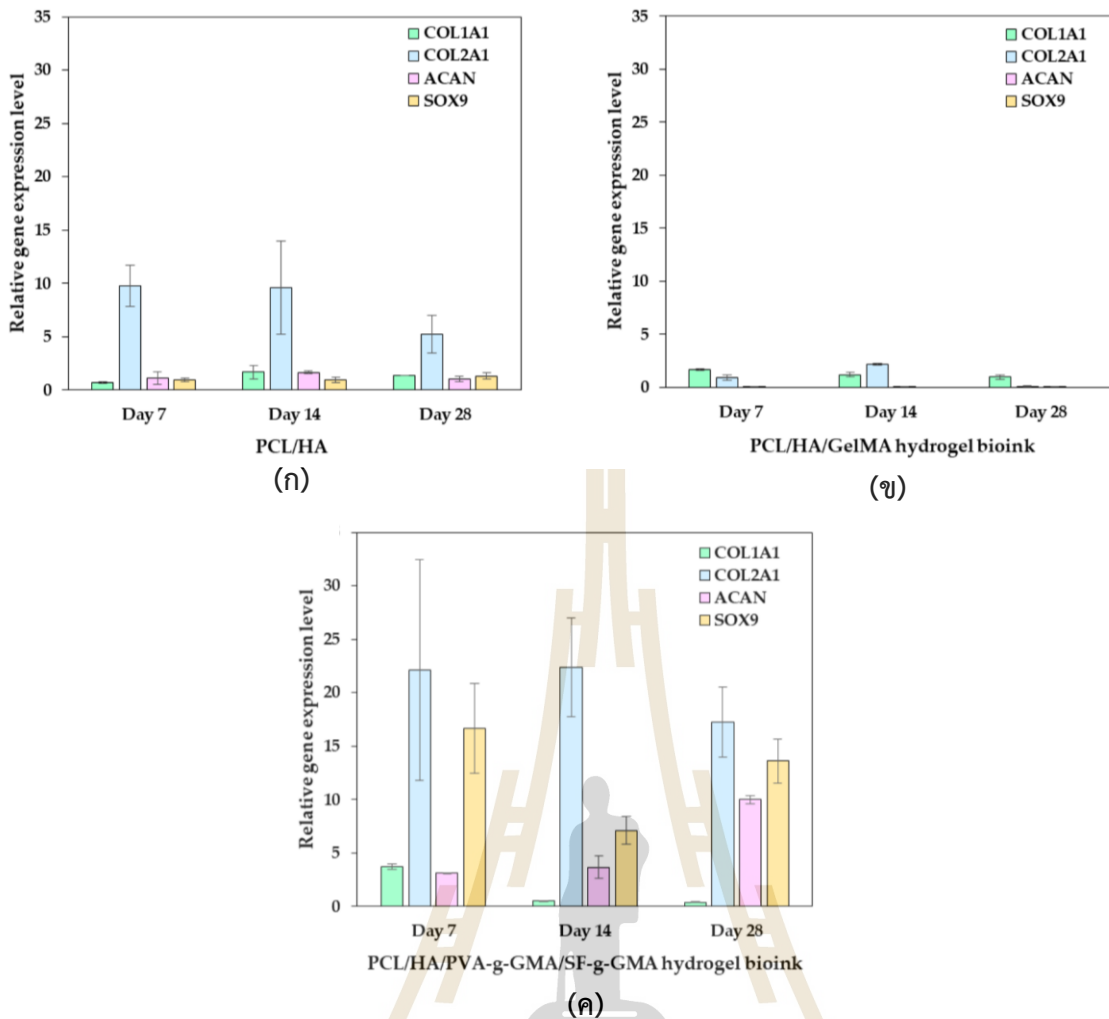
รูปภาพที่ 4.6 (ก) การทดสอบแรงอัด (ข) ตัวอย่างก่อนและหลังการทดสอบแรงอัด (ค) เส้นโค้งความเค้นแรงอัด-ความเครียด (ง) การทดสอบแรงดึง (จ) ตัวอย่างก่อนและหลังการทดสอบแรงดึง (ฉ) ความเค้นแรงดึง-ความเครียด ของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ

ตารางที่ 4.3 สมบัติเชิงกลของ PCL/HA/ไฮโดรเจลแบบสามมิติ ($n = 5$).

Formulations	Compressive Strength (MPa)	Compressive Modulus (MPa)	Tensile Strength (MPa)	Tensile Modulus (MPa)	Elongation at Break (%)
PCL/HA/GelMA hydrogel bioink	20.67±3.39	31.96±1.53	7.78±0.32	80.35±10.77	354.62±19.94
PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA hydrogel bioink	21.26±3.58	32.73±1.98	8.05±0.76	89.37±9.01	333.66±55.08
Human meniscus	8.77-18.10	0.10-3	3.48-23.54	75-300	4-61

4.2.4 การแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า

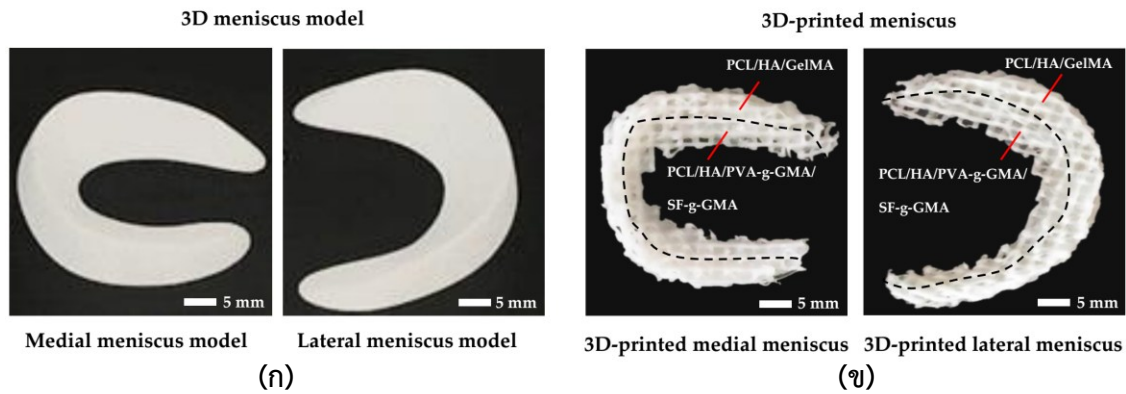
การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเพื่อประเมินระดับการแสดงออกของ COL1A1 COL2A1 ACAN และ SOX9 ใน PCL/HA/ไฮโดรเจลที่พิมพ์สามมิติ โดยเปรียบเทียบกับ PCL/HA ที่พิมพ์สามมิติที่ไม่มีการพิมพ์ไฮโดรเจล เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 7 14 และ 28 วัน การวิเคราะห์นี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อยืนยันฟีโนไทป์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibrogenic) และเซลล์คอนโดโรไซต์ (chondrogenic) ของวัสดุเหล่านี้ (รูปภาพที่ 4.7) การแสดงออกของ COL1A1 บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปสู่เซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ ขณะที่การแสดงออกของ COL2A1 ACAN และ SOX9 บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปสู่เซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ (Yi et al., 2018; Hosper et al., 2013) PCL/HA/GelMA ที่พิมพ์สามมิติ มีการแสดงออกของ COL1A1 และ COL2A1 อย่างเห็นได้ชัด และมีการแสดงออกของ ACAN เพียงเล็กน้อย ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะเวลา 7 14 วัน และในวันที่ 28 พบว่ามีการแสดงออกของ COL1A1 สูงกว่าการแสดงออกของ COL2A1 ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถในการส่งเสริมการสร้างเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ในบริเวณภายนอกของหมอนรองเข่า ในทางตรงกันข้าม PCL/HA และ PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA ที่พิมพ์สามมิติแสดงการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ COL2A1, ACAN และ SOX9 ขณะที่ระดับการแสดงออกของ COL1A1 ต่ำกว่า ซึ่งบ่งชี้ถึงบทบาทในการส่งเสริมการสร้างเซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ในบริเวณภายในของหมอนรองเข่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA ที่พิมพ์สามมิติแสดงการเพิ่มขึ้นที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของ COL2A1 ACAN และ SOX9 เมื่อเปรียบเทียบกับ PCL/HA ที่พิมพ์สามมิติ ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า PCL/HA/GelMA ไฮโดรเจลที่พิมพ์สามมิติ ช่วยส่งเสริมคุณสมบัติไฟโบรเจนิค (fibrogenicity) ซึ่งเหมาะสมสำหรับบริเวณภายนอกของหมอนรองเข่า ขณะที่สูตร PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA ส่งเสริมคุณสมบัติคอนโดโรเจนิค (chondrogenicity) ซึ่งเหมาะสมสำหรับบริเวณภายใน การค้นพบนี้สนับสนุนสมมติฐานการทดลองและเน้นย้ำถึงศักยภาพของวัสดุชีวภาพเหล่านี้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อหมอนรองเข่า



รูปภาพที่ 4.7 ระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า คือ COL1A1 COL2A1 ACAN และ SOX9 ที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน (ก) PCL/HA (ข) PCL/HA/GelMA ไฮโดรเจล (ค) PCL/HA/ PVA-g-GMA/SF-g-GMA แบบสามมิติเป็นเวลา 7 14 และ 28 วัน ($n = 3$)

4.3 การศึกษาความเป็นไปได้ในการพิมพ์หมอนรองเข่าเสมือนจริง

ในทางคลินิก หมอนรองเข่าของผู้ป่วยจะได้รับการสแกนโดยใช้การถ่ายภาพด้วยคอมพิวเตอร์โทโมกราฟี (CT) หรือการถ่ายภาพด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) แล้วแปลงผลลัพธ์เป็นไฟล์ STL จากนั้นจะใช้ซอฟต์แวร์เฉพาะในการสร้างพารามิเตอร์สำหรับการพิมพ์ สำหรับการเตรียมไฟล์ในงานวิจัยนี้ ไฟล์โมเดลหมอนรองเข่า (.stl) (รูปที่ 4.8 (ก)) ได้ถูกนำเข้าสู่ซอฟต์แวร์ NewCreaterK เวอร์ชัน 1.57.71 เพื่อออกแบบพารามิเตอร์สำหรับการพิมพ์โดยใช้ไฟล์ G-code ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถพิมพ์หมอนรองเข่าเสมือนจริง ทั้ง medial และ lateral จาก PCL/HA/ไฮโดรเจล ได้สำเร็จ โดยเลียนแบบโครงสร้าง ชีวเคมี ของหมอนรองเข่ามนุษย์ได้อย่างใกล้เคียง ซึ่งมีลักษณะทางกายวิภาคที่คล้ายกับหมอนรองเข่าจริงทั้งบริเวณภายในและภายนอก ด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติแบบคู่ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.8 (ข) วิธีการนี้สามารถพิมพ์หมอนรองเข่าบริเวณภายนอกโดยการพิมพ์ด้วย PCL/HA/GelMA และหมอนรองเข่าบริเวณภายในโดยการพิมพ์ด้วย PCL/HA/PVA-g-GMA/SF-g-GMA



รูปภาพที่ 4.8 (ก) โมเดลหมอนรองเข่า (ข) หมอนรองเข่าเสมือนจริงแบบสามมิติ

มีงานวิจัยเพียงไม่กี่ผลงาน ที่มีการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริง โดยการออกแบบโครงสร้างและองค์ประกอบทางชีวเคมี ให้ใกล้เคียงหมอนรองเข่ามนุษย์ หนึ่งในวิธีที่พัฒนา คือ การพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงจาก PCL ขึ้นรูปด้วยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิง และเคลือบด้านหนึ่งด้วยสารสกัดจากการย่อยของหมอนรองเข่าด้านใน และอีกด้านหนึ่งด้วยสารสกัดจากหมอนรองเข่าด้านนอก หมอนรองเข่าเสมือนจริงจาก PCL ขึ้นรูปด้วยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิง นี้ มีความบางเกินไป ไม่เหมาะสมเป็นโครงสร้างสามมิติที่มีความซับซ้อน และยังมีช่องว่างเล็กๆ ระหว่างเส้นใยที่จำกัดการเคลื่อนที่และการแทรกซึมของเซลล์เข้าไปภายในของโครงสร้าง (Gao et al., 2017) มีอีกวิธีหนึ่งที่พยายามจำลององค์ประกอบทางชีวเคมีของหมอนรองเข่าด้วยการสร้างโครงสร้างเป็นลักษณะฟองน้ำ (spong) ด้วยเทคนิคการขึ้นรูปโดยการทำให้แห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ แต่โครงสร้างฟองน้ำที่ได้มีความแข็งแรงเชิงกลไม่เพียงพอ (Stuckensen et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ โดยใช้ PCL ร่วมกับไฮโดรเจล agarose ในบริเวณด้านใน และไฮโดรเจล GelMA ในบริเวณด้านนอก แม้ว่าหมอนรองเข่าเสมือนจริงนี้จะส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์และสามารถจำลององค์ประกอบทางชีวเคมีได้ แต่สมบัติเชิงกลยังไม่สามารถเทียบเคียงกับคุณสมบัติของหมอนรองเข่ามนุษย์ได้ (Bahcecioglu et al., 2019) ซึ่งทำให้หมอนรองเข่าเสมือนจริงนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้งานจริง

สิ่งนี้ได้เน้นย้ำถึงความจำเป็นในการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่ผลิตจาก PCL/HA/ไฮโดรเจลที่พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ ซึ่งมีสมบัติเฉพาะตามแต่ละบริเวณของหมอนรองเข่า หมอนรองเข่าเสมือนจริงนี้ได้มีการออกแบบให้สามารถเลียนแบบโครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของหมอนรองเข่าได้อย่างเหมาะสม และมีสมบัติเชิงกลที่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อหมอนรองเข่าของมนุษย์ ดังนั้น การออกแบบนี้มีศักยภาพในการตอบโจทย์ปัญหาดังกล่าว และอาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการทดแทนหมอนรองเข่าในทางคลินิก

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาหมอนรองเข่าเสมือนจริงจาก PCL เสริมแรงด้วย HA ร่วมกับ ไฮโดรเจล เพื่อเลียนแบบโครงสร้าง สมบัติเชิงกล และลักษณะทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อหมอนรองเข่ามนุษย์ ด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติแบบหัวพิมพ์คู่ สำหรับการสร้างองค์ประกอบทางชีวเคมีเฉพาะในแต่ละบริเวณของหมอนรองเข่า โดยใช้ไฮโดรเจลสองชนิดเป็นหมึกพิมพ์ชีวภาพ คือ GelMA สำหรับบริเวณภายนอกที่จำลองสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นการสร้างเซลล์คล้ายไฟโบร بلاสต์ และ PVA-g-GMA/SF-g-GMA สำหรับบริเวณภายในที่จำลองสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นการสร้างเซลล์คล้ายคอนโดโรไซต์ หมอนรองเข่าที่พิมพ์ด้วย PCL/HA/ไฮโดรเจลนี้มีลักษณะเชิงกลที่สำคัญ โดยแสดงสมบัติการทนต่อแรงอัด และการทนต่อแรงดึง ที่ดีในทั้งสองบริเวณของโครงสร้าง มีความเป็นรูพรุน และสมบัติการเปียกของพื้นผิวที่ดี นอกจากนี้ยังแสดงถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี โดยแสดงความมีชีวิตของเซลล์สูง เมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อหมอนรองเข่า พบว่าบริเวณภายนอกของหมอนรองเข่าเสมือนจริง (PCL/HA/GelMA) มีการแสดงออกของ COL1A1 ในระดับที่เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงลักษณะของเนื้อเยื่อคล้ายกับเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ในขณะที่ภายในของหมอนรองเข่าเทียม มีระดับการแสดงออกของ COL2A1 ACAN และ SOX9 ที่สูงซึ่งบ่งชี้ถึงลักษณะของเนื้อเยื่อคล้ายกับเซลล์คอนโดโรไซต์ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหมอนรองเข่าเสมือนจริงที่พิมพ์ขึ้นสามารถจำลองโครงสร้างทางกายวิภาค สมบัติเชิงกล และลักษณะทางชีวเคมีของหมอนรองเข่ามนุษย์ได้อย่างใกล้เคียง ซึ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพในการนำไปใช้เป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการทดแทนหมอนรองเข่าที่ได้รับบาดเจ็บหรือเสื่อมสภาพ

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาต่อยอดไปใช้งานจริงทางการแพทย์โดยปัจจุบันมีระดับการประเมิน TRL ในระดับ 4 โดยขั้นตอนต่อไป คือการนำไปทดลองในสัตว์ทดลอง

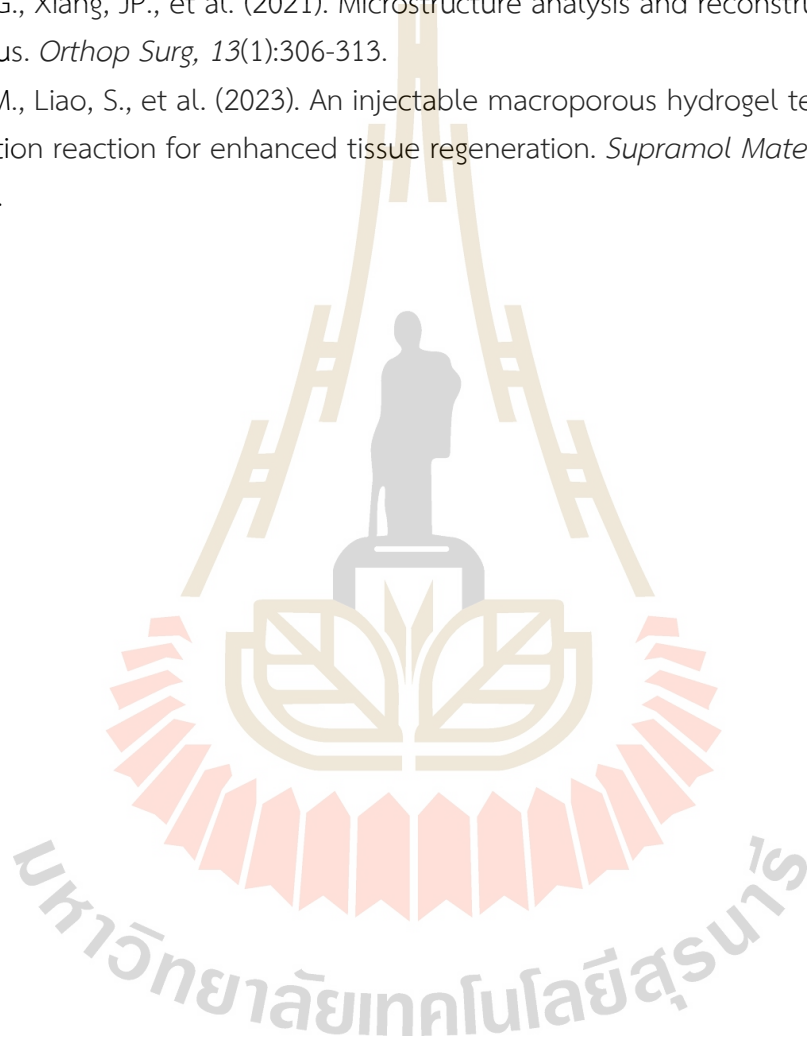
บรรณานุกรม

- Andrews, SH., Rattner, JB., Shrive, NG., et al. (2015). Swelling significantly affects the material properties of the menisci in compression. *J Biomech*, 48(8) , 1485-1489.
- Bahcecioglu, G., et al. (2019). Anatomical meniscus construct with zone specific biochemical composition and structural organization. *Biomaterials*, 218, 119361.
- Bandyopadhyay, A., Mandal, BB. (2019). A three-dimensional printed silk-based biomimetic tri-layered meniscus for potential patient-specific implantation. *Biofabrication*, 12(1), 015003.
- Baro, VJ., Bonnevie, ED., Lai, X., et al. (2012). Functional characterization of normal and degraded bovine meniscus: rate-dependent indentation and friction studies. *Bone*, 51(2), 232-240.
- Bochynska, Al., Hannink, G., Grijpma, DW., et al. (2016). Tissue adhesives for meniscus tear repair: an overview of current advances and prospects for future clinical solutions. *J Mater Sci Mater Med*, 27(5), 85.
- Borges R., et al. (2018). 3D printed PCU/UHMWPE polymeric blend for artificial knee meniscus. *Tribology International*, 122: 1-7.
- Chae S., et al. (2021). 3D cell-printing of biocompatible and functional meniscus constructs using meniscus-derived bioink. *Biomaterials*, 267, 120466.
- Costa, JB., Park, J., Jorgensen, AM., et al. (2020). 3D bioprinted highly elastic hybrid constructs for advanced fibrocartilaginous tissue regeneration. *Chem Mater*, 32(19), 8733-8746.
- Cui S, Zhang S, Coseri S. (2023). An injectable and self-healing cellulose nanofiber-reinforced alginate hydrogel for bone repair. *Carbohydr Polym*. 300, 120243.
- de Caro, F., Perdisa, F., Dhollander, A., Verdonk, R., & Verdonk, P. (2020). Meniscus Scaffolds for Partial Meniscus Defects. *Clin Sports Med*, 39(1), 83-92.
- Deng, X., Chen, X., Geng, F. et al. (2021). Precision 3D printed meniscus scaffolds to facilitate hMSCs proliferation and chondrogenic differentiation for tissue regeneration. *J Nanobiotechnol*, 19, 400.
- DePhillipo, N. N., LaPrade, R. F., Zaffagnini, S., Mouton, C., Seil, R., & Beaufils, P. (2021). The future of meniscus science: international expert consensus. *Journal of Experimental Orthopaedics* (Online), 8(1).
- Du, MZ., Dou, Y., Ai, LY., et al. (2023). Meniscus heterogeneity and 3D-printed strategies for engineering anisotropic meniscus. *Int J Bioprint*, 9(3):693.
- Englund, M., Guermazi, A., & Lohmander, S. (2009). The Role of the Meniscus in Knee Osteoarthritis: a Cause or Consequence? *Radiologic clinics of North America*, 47, 703-712.
- Ferrari, M., Cirisano, F., and Morán MC. 2019. Mammalian cell behavior on hydrophobic substrates: Influence of surface properties. *Colloids and Interfaces*. 3(48):1-16.

- Fox, A. J. S., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2012). The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. *Sports health*, 4(4), 340-351.
doi:10.1177/1941738111429419
- Gao, S., Guo, W., Chen, M., et al. (2017). Fabrication and characterization of electrospun nanofibers composed of decellularized meniscus extracellular matrix and polycaprolactone for meniscus tissue engineering. *J Mater Chem B*, 5(12), 2273-2285.
- Gui-Bo, Y., You-Zhu, Z., Shu-Dong, W., De-Bing, S., Zhi-Hui, D., & Wei-Guo, F. (2010). Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 93(1):158-163.
- Hosper, NA., van den Berg, PP., de Rond, S., et al. (2013). Epithelial-to-mesenchymal transition in fibrosis: Collagen type I expression is highly upregulated after EMT, but does not contribute to collagen deposition. *Exp Cell Res*, 319(19), 3000-3009.
- Inyang, AO., Vaughan, CL. (2020). Functional characteristics and mechanical performance of PCU composites for knee meniscus replacement. *Materials*, 13(8).
- Jian, Z., Zhuang, T., Qinyu, T., et al. (2021). 3D bioprinting of a biomimetic meniscal scaffold for application in tissue engineering. *Bioact Mater*, 6(6), 1711-1726.
- Jiao, Z., et al. (2019). 3D printing of HA / PCL composite tissue engineering scaffolds. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 2(4), 196-202.
- Kohli, S., Schwenck, J., Barlow I. (2022). Failure rates and clinical outcomes of synthetic meniscal implants following partial meniscectomy: a systematic review. *Knee Surg Relat Res*, 34(1), 27.
- Kramschuster, A.; Turng, L.S. (2013). 17-Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*; Ebnesajjad, S., Ed.; William Andrew Publishing: Boston, MA, USA, 427-446.
- Li, H., Li, P., Yang, Z., Gao, C., Fu, L., Liao, Z., . . . Guo, Q. (2021). Meniscal Regenerative Scaffolds Based on Biopolymers and Polymers: Recent Status and Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Liang, J., Liu, P., Yang, X., et al. (2023). Biomaterial-based scaffolds in promotion of cartilage regeneration: Recent advances and emerging applications. *J Orthop Translat*, 41, 54-62.
- López-Calzada, G., Hernandez-Martínez, AR., Cruz-Soto, M., et al. (2016). Development of meniscus substitutes using a mixture of biocompatible polymers and extra cellular matrix components by electrospinning. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 61, 893-905.
- Luvannyam, E., Jain, M. S., Leitao, A. R., Maikawa, N., & Leitao, A. E. (2022). Meniscus Tear: Pathology, Incidence, and Management. *Cureus (Online)*, 14(5).
- Makris, E. A., Hadidi, P., & Athanasiou, K. A. (2011). The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials*, 32(30), 7411-7431.

- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., et al. (2015). 3D Bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 16(5), 1489-1496.
- Myers, K. R., Sgaglione, N. A., & Goodwillie, A. D. (2014). Meniscal scaffolds. *J Knee Surg*, 27(6), 435-442.
- Ozmen MM, Okay O. (2006). Superfast responsive ionic hydrogels: effect of the monomer concentration. *J Macromol Sci A*, 43(8), 1215-1225.
- Petersen, W., & Tillmann, B. (1998). Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol (Berl)*, 197(4), 317-324.
- Promnil, S., Ruksakulpiwat, C., Numpaisal, P., & Ruksakulpiwat, Y. (2022). Electrospun Poly(lactic acid) and Silk Fibroin Based Nanofibrous Scaffold for Meniscus Tissue Engineering. *Polymers*, 14(12), 2435.
- Rhee, S., Puetzer, J.L., Mason, B.N., et al. (2016). 3D Bioprinting of spatially heterogeneous collagen constructs for cartilage tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2(10), 1800-1805.
- Ridley, T. J., McCarthy, M. A., Bollier, M. J., Wolf, B. R., & Amendola, A. (2017). Age Differences in the Prevalence of Isolated Medial and Lateral Meniscal Tears in Surgically Treated Patients. *Iowa Orthop J*, 37, 91-94.
- Roos H., Laurén M., Adalberth T., Roos EM., Jonsson K., Lohmander LS. (1998). Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls. *Arthritis Rheum*, 41(4), 687-693.
- Sari, A., Günaydin, B., & Dinçel, Y. M. (2018). Meniscus Tears and Review of the Literature. In *The Athletic Knee - Function, Pathology and Management* (Online). IntechOpen.
- Stocco, E., Porzionato, A., De Rose, E., et al. (2022). Meniscus regeneration by 3D printing technologies: Current advances and future perspectives. *J Tissue Eng*, 13, 20417314211065860.
- Stuckensen, K., Schwab, A., Knauer, M., et al. (2018). Tissue mimicry in morphology and composition promotes hierarchical matrix remodeling of invading stem cells in osteochondral and meniscus scaffolds. *Adv Mater*, 30(28), e1706754.
- Vadodaria, K., Kulkarni, A., Santhini, E., & Vasudevan, P. (2019). Materials and structures used in meniscus repair and regeneration: a review. *Biomedicine (Taipei)*, 9(1), 2.
- Wei, J., Igarashi, T., Okumori, N., et al. (2009). Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*, 4(4):045002.
- Yang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Chen, J., Wan, Q. (2021). The Application of Polycaprolactone in Three-Dimensional Printing Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers*, 13(16):2754.
- Yi, SW., Kim, HJ., Oh, HJ., et al. (2018). Gene expression profiling of chondrogenic differentiation by dexamethasone-conjugated polyethyleneimine with SOX trio genes in stem cells. *Stem cell res ther*, 9(1), 341.

- Yin, H., Zhu, M., Wang, Y., et al. (2023). Physical properties and cellular responses of gelatin methacryloyl bulk hydrogels and highly ordered porous hydrogels. *Frontiers in Soft Matter*, 12(2), 1101680.
- Zhang, K., Li, L., Yang, L., et al. (2019). Effect of degenerative and radial tears of the meniscus and resultant meniscectomy on the knee joint: a finite element analysis. *J OrthopTransl.* 18, 20-31.
- Zhang, K., Li, L., Yang, L., et al. (2019). The biomechanical changes of load distribution with longitudinal tears of meniscal horns on knee joint: a finite element analysis. *J Orthop Surg Res*, 14(1):237.
- Zhu, S., Tong, G., Xiang, JP., et al. (2021). Microstructure analysis and reconstruction of a meniscus. *Orthop Surg*, 13(1):306-313.
- Zhou, Y., Cui, M., Liao, S., et al. (2023). An injectable macroporous hydrogel templated by gasification reaction for enhanced tissue regeneration. *Supramol Mater.* 2023;2, 100037.





ภาคผนวก

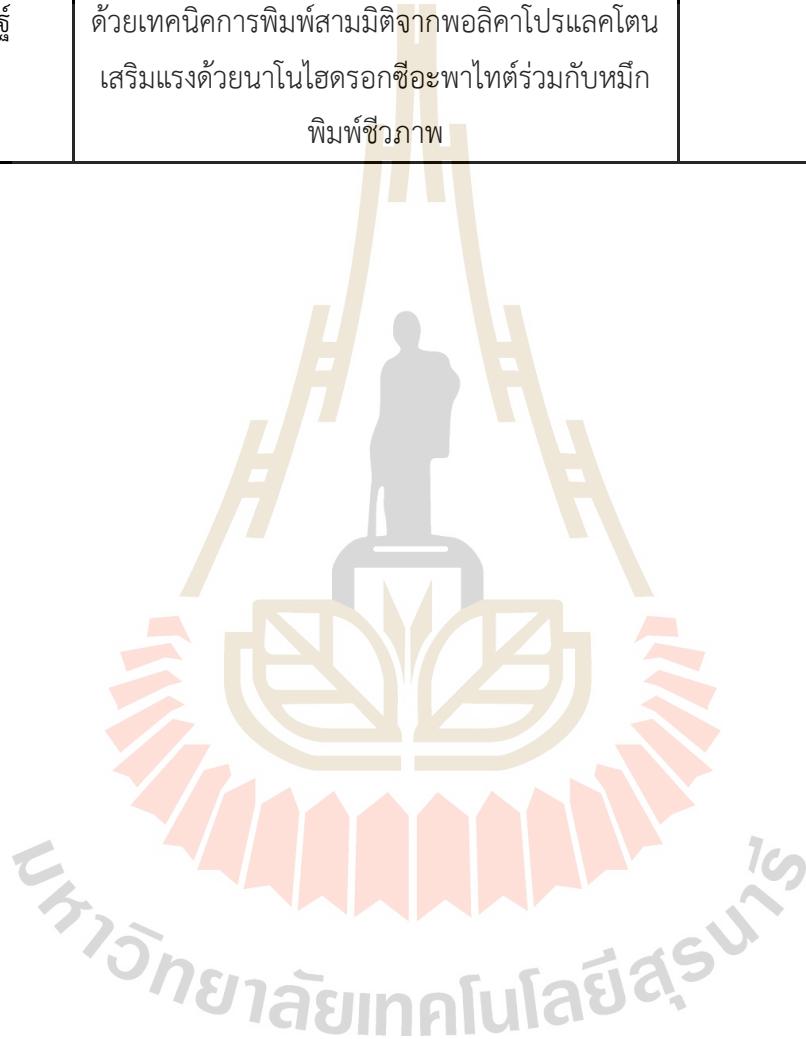


ภาคผนวก ก

ผลผลิตจากการดำเนินโครงการ

ผลผลิตจากการดำเนินโครงการ

ผลผลิต	รายละเอียดของผลผลิต	จำนวนนำส่ง	หน่วยนับ
ผลงานประดิษฐ์	ผลงานต้นแบบ หมอนรองเข้าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ	1	ผลงาน
ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร การประดิษฐ์	สูตรและกรรมวิธีการเตรียมหมอนรองเข้าเสมือนจริงด้วยเทคนิคการพิมพ์สามมิติจากพอลิคาโพรแลคโตนเสริมแรงด้วยนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับหมึกพิมพ์ชีวภาพ	1	ผลงาน



ประวัตินักวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

ชื่อ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. ปิยาอร นำไพศาล

ประวัติ รองศาสตราจารย์ พญ. ดร. ปิยาอร นำไพศาล ปัจจุบันเป็นอาจารย์ ประจำสาขาวิชาออร์โธปิดิกส์ สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา จบการศึกษาแพทยศาสตรบัณฑิตจาก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปริญญาเอก สาขาวิชา Anatomy and Cell Biology คณะแพทยศาสตร์ จาก National Taiwan University (NYU) ประเทศไต้หวัน

ผลงานทางวิชาการ

- R. Jeencham, T. Tawonsawatruk, **P. Numpaisal**, Y. Ruksakulpiwat. Reinforcement of Injectable Hydrogel for Meniscus Tissue Engineering by Using Cellulose Nanofiber from Cassava Pulp. *Polymers*. 2023; 15(9):2092. <https://doi.org/10.3390/polym15092092>
- S. Promnil, C. Ruksakulpiwat, **P. Numpaisal**, Y. Ruksakulpiwat. Electrospun Poly(lactic acid) and Silk Fibroin Based Nanofibrous Scaffold for Meniscus Tissue Engineering. *Polymers*. 2022; 14(12):2435. <https://doi.org/10.3390/polym14122435>
- A. Raksa, **P. Numpaisal**, R. Utke, C. Ruksakulpiwat, Y. Ruksakulpiwat, Nanofibrous Scaffold of Electrospun Silk Fibroin/Poly(Vinyl Alcohol) Blended for Tissue Engineering. *Suranaree J. Sci. Technol.* 2022.29(3):010132(1-7).
- **P. Numpaisal**, C.C. Jiang, C. H. Hsieh, H. Chiang, C.L. Chien, Prospective Application of Partially Digested Autologous Chondrocyte for Meniscus Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030605>. 2022.4(3).605.
- S. Promnil, **P. Numpaisal** and Y. Ruksakulpiwat, Effect of molecular weight on mechanical properties of electrospunpoly (lactic acid) fibers for meniscus tissue engineering scaffold, *Materials Today: Proceedings*, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.504>
- A. Raksa, **P. Numpaisal** and Y. Ruksakulpiwat, The effect of humidity during electrospinning on morphology and mechanical properties of SF/PVA nanofibers, *Materials Today: Proceedings*, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.459>
- J.Sinna, **P. Numpaisal**, C.Ruksakulpiwat and Y. Ruksakulpiwat. Extraction of silk fibroin and glycidyl methacrylate grafting on silk fibroin optimization of SF-g-GMA for meniscus tissue engineering, *Materials Today: Proceedings*, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.464>
- Raksa, A., Utke, R., Ruksakulpiwat, C., **Numpaisal, P.-O.**, Ruksakulpiwat, Y. Morphological and chemical characterization of electrospun silk fibroin/polyvinyl alcohol nanofibers. 2020. AIP conference proceedings, 2279, 080004.
- B. Sindhupakorn, **P. Numpaisal**, S.Thienpratharn, D. Jomkoh. A home visit program versus a non-home visit program in total knee replacement patients: a randomized controlled trial. *J Orthop Surg Res*. 2019 Nov 29;14(1):405.
- **Numpaisal PO**, Rothrauff BB, Gottardi R, Chien CL, Tuan RS. Rapidly dissociated autologous meniscus tissue enhances meniscus healing: An in vitro study. *Connect Tissue Res*. 2016 Oct 11. (Epub)

- Rothrauff BB, **Numpaisal PO**, Lauro BB, Alexander PG, Debski RE, Musahl V, Tuan RS. Augmented repair of radial meniscus tear with biomimetic electrospun scaffold: an in vitro mechanical analysis, J Exp Orthop. 2016 Dec;3(1):23
- Aron X. Sun, **Piya-on Numpaisal**, Riccardo Gottardi, He Shen, Gunag Yang and Rocky S.Tuan. Cell and Biomimetic Scaffold-Based Approach of Cartilage Regeneration. Operative Techniques in Orthopaedics, 2016; 26(3): 135-146
- Pei-Tsen Chen, **Piya-on Numpaisal**, Ching-Chuan Jiang, Hongsen Chiang. Effect of Alendronate and Teriparatide on Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. Tw J Phys Med Rehabil, 2012; 40(3): 135 – 14.

