

ผลของกระบวนการไฮโดรเทอร์มอลต่อค่าความเป็นพิษ ของพีอีเอเคลือบด้วยไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์

Effect of Hydrothermal Treatment on Cytotoxicity of Titanium Nitride-hydroxyapatite Coated PEEK

วนัสนันท์ บุรณพานิช¹, กุลภพ สุทธิอาจ², เพ็ญพิชชา วนจันทร์รักษ์³, พิริยะ ยาวีราช²
¹นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
²ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
³ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Vanasanan Buranapanich¹, Kullapop Suttia², Phenphichar Wanachantararak³, Piriya Yavirach²
¹Graduate student, Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University
²Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University
³The Dental Research Center, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม. ทันตสาร 2563; 41(3) : 135-178
CM Dent J 2020; 41(3) : 135-178

Received: 18 October, 2019

Revised: 18 May, 2020

Accepted: 16 September, 2020

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: ศึกษาผลของกระบวนการไฮโดรเทอร์มอลต่อค่าความเป็นพิษและลักษณะพื้นผิวของฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวพอลิเอเธอร์อีเทอร์คีโตน (พีอีเอเค)

วัสดุและวิธีการ: เตรียมชิ้นตัวอย่างพีอีเอเค พีอีเอเคที่เคลือบฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และพีอีเอเคที่เคลือบฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับทำไฮโดรเทอร์มอล อย่างละ 12 ชิ้น ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (L-929) แบบสัมผัสทางอ้อมที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง 7 วัน 14 วัน และ 35 วัน ด้วยวิธีเอ็มทีที และศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ รวมทั้งศึกษาลักษณะ

Abstract

Purposes: To study the effect of hydrothermal treatment on cytotoxicity of Titanium Nitride - Hydroxyapatite (TiN-HA) coated on Polyetheretherketone (PEEK)

Materials and Methods: Twelve pieces of PEEK, TiN-HA coated PEEK and TiN-HA coated PEEK with hydrothermal treatment were prepared. The toxicity tests on L929 cell were done by indirect contact method at 24 hours, 7 days, 14 days and 35 days. MTT assay was performed to evaluate cell viability. Cellular morphology was evaluated using a phase-contrast microscope. The surface

Corresponding Author:

พิริยะ ยาวีราช

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร., ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Piriya Yavirach

Assistant Professor; Dr., Department of Prosthodontics,
Faculty of Dentistry, Chiang Mai University,
Chiang Mai 50200, Thailand.

E-mail: Piriyaavdx-18@hotmail.com

พื้นผิวของชั้นเคลือบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

ผลการศึกษา : พบว่าพีอีเค รวมทั้งพีอีเคที่มีไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ทั้งก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยพบว่าในวัสดุชนิดเดียวกัน ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสทางอ้อมลักษณะของเซลล์มีการยืดตัว และอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น และจากการศึกษาลักษณะของชั้นเคลือบพบว่าความหยาบผิวเกิดจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ในชั้นเคลือบ

สรุป : การทำไฮโดรเทอร์มอลในพีอีเคที่เคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และความหยาบผิวเกิดจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ในชั้นเคลือบ

คำสำคัญ : พีอีเค, ไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์, เซลล์ไฟโบรบลาสต์, เอ็มทีที, แมกนีตรอนสปัตเตอริง

morphology of coated films was also assessed by scanning electron microscopy and atomic force microscopy.

Results: PEEK, and TiN-HA coated PEEK did not have cytotoxicity effect on fibroblast cells both prior- and after- hydrothermal treatment groups. The cell viability in the same material condition was increased when duration increased and fibroblasts showed an elongated morphology and a good congruence. Additionally, coated hydroxyapatite increased material surface roughness.

Conclusion: Hydrothermal treatment of TiN-HA coated films were not cytotoxic to fibroblasts and surface roughness was performed by hydroxyapatite in the coated layer.

Keywords: PEEK, Titanium Nitride-Hydroxyapatite, Fibroblast, MTT, Magnetron sputtering

บทนำ

พอลิเอเธอร์อีเทอร์คีโตน (polyetheretherketone) หรือพีอีเค (PEEK) $(-C_6H_4-OC_6H_4-O-C_6H_4-CO)_n$ ⁽¹⁾ เป็นพอลิเมอริกกลุ่มเทอร์โมพลาสติกที่มีโครงสร้างแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline thermoplastic polymer) ประกอบด้วยสายโซ่หลักอะโรมาติก (aromatic backbone) เชื่อมต่อกันด้วยหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ชนิดอีเทอร์ (ether) และคีโตน (ketone) ในทางการแพทย์นำวัสดุชนิดนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อสร้างสิ่งฝัง (implant) ในร่างกายมนุษย์ เช่น ข้อสะโพกเทียม (hip prostheses) ข้อเข่าเทียม (knee prostheses) วัสดุยึดตรึงกระดูกสันหลัง (spinal implant) เป็นต้น^(2,3) พีอีเค สามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ (biocompatibility) มีความต้านทานต่อสารเคมี มีคุณสมบัติทางกลที่ดีและสามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติของวัสดุ⁽⁴⁾ นอกจากนี้พีอีเคยังมีค่าโมดูลัสความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับกระดูกทึบของมนุษย์⁽⁵⁾ ทำให้ลักษณะการกระจายแรงระหว่างกระดูกและวัสดุฝังที่สร้างจากพีอีเคมีความใกล้เคียงกัน ช่วยให้แรงเครียดสะสมบริเวณผิวรอยต่อมีค่าลด

ลง ส่งผลให้โอกาสการสลายตัวของกระดูกโดยรอบมีค่าลดลง^(4,6) แต่ด้วยคุณสมบัติเฉื่อยทางชีวภาพของวัสดุ⁽⁷⁾ ทำให้พีอีเคไม่สามารถเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกได้ จึงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาคุณสมบัติทางชีวภาพของพีอีเคด้วยวิธีการต่าง ๆ การปรับปรุงคุณสมบัติบริเวณพื้นผิวจัดเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงคุณสมบัติของพีอีเคโดยไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติของวัสดุทั้งชิ้น สามารถทำได้โดย (1) การปรับปรุงผิววัสดุโดยตรง (direct surface modification) เป็นวิธีเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพื้นผิวโดยไม่มีการพอกพูนของวัสดุชนิดใหม่ เช่น การปรับปรุงผิววัสดุด้วยวิธีทางเคมีแบบเปียก (wet chemical treatment) การปรับปรุงผิววัสดุด้วยพลาสมา (plasma surface treatment) การปรับปรุงผิววัสดุด้วยเลเซอร์ (laser surface treatment) และการปรับปรุงผิววัสดุด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือโอโซน (ultraviolet/ozon surface treatment) (2) การเคลือบผิววัสดุ (deposition techniques) ด้วยวัสดุชีวกัมมันต์ (bioactive materials) ทำได้หลายวิธีเช่นเดียวกัน ประกอบด้วย การพ่นเคลือบด้วยเปลวพลาสมา (plasma spray) การพ่นเคลือบด้วยเปลวพลาสมา

แบบสุญญากาศ (vacuum plasma spray) การเคลือบด้วยวิธีอาร์เอฟแมกนีตรอนสปัตเตอริง (radio-frequency (RF) magnetron sputtering) การเคลือบแบบไอออนเพลดิงด้วยลวดอาร์ค (arc ion plating) การเคลือบด้วยลำอิเล็กตรอน (electron beam deposition) และการเคลือบด้วยวิธีทางเคมี (chemical deposition)⁽⁸⁾ เป็นต้น

วัสดุชีวภัณฑ์ที่นิยมนำมาเคลือบผิวเพื่อประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และทันตกรรม คือ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) เนื่องจากมีส่วนประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกับกระดูกของสิ่งมีชีวิต และมีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญของกระดูกได้ดี⁽⁹⁾ แต่มีความแข็งแรงต่ำ เปราะ และมักพบการหลุดออก (debond) ของชั้นไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เคลือบผิววัสดุเมื่อได้รับแรงกระทำเป็นระยะเวลาอันยาวนานภายใต้สภาวะแวดล้อมของร่างกาย เนื่องจากชั้นฟิล์มไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เคลือบมีค่าการยึดเกาะระหว่างผิวตัว (interfacial adhesion)⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีวัสดุชีวภัณฑ์อื่นที่นำมาใช้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ ไททาเนียม เนื่องจากมีความต้านทานต่อการกัดกร่อน มีคุณสมบัติทางกลและคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดี⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตาม ไททาเนียมมีข้อด้อยสำคัญที่ส่งผลต่อการนำไปใช้งาน ได้แก่ ความแข็ง (hardness) และความต้านทานต่อการสึก (wear resistance) ต่ำ⁽¹¹⁾ ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาไททาเนียมไนไตรด์ (TiN) สำหรับใช้เคลือบผิววัสดุทางการแพทย์ เนื่องจากไททาเนียมไนไตรด์มีความแข็งแรงสูง สามารถต้านทานต่อการสึกและการกัดกร่อนได้ดี รวมทั้งมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีอีกด้วย^(12,13) อย่างไรก็ตามชั้นออกไซด์ของไททาเนียมไนไตรด์ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติทางชีวภาพนั้นเกิดซ้ำ⁽¹⁴⁾ ผู้วิจัยจึงสร้างฟิล์มเชิงประกอบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ เพื่อนำข้อดีของวัสดุชีวภัณฑ์ทั้งสองมาใช้และชดเชยข้อด้อยซึ่งกันและกัน

การพ่นเคลือบด้วยพลาสมาเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมในวัสดุทางการแพทย์ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าชั้นเคลือบ (coating layer) มีค่าแรงยึดเกาะกับพีอีอีเคต่ำ เนื่องจากอุณหภูมิจากกระบวนการเคลือบสูงกว่าอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) ของพีอีอีเคซึ่งมีค่าประมาณ 340 องศาเซลเซียส ทำให้พีอีอีเคเกิดการระเหย (evaporation) จึงขัดขวางการยึดเกาะระหว่างชั้นเคลือบและพีอีอีเค⁽¹⁵⁾ ในขณะที่การเคลือบด้วยวิธีอาร์เอฟแมกนีตรอนสปัตเตอริง (RF-magnetron sputtering technique) ช่วยเพิ่มแรงยึดเกาะระหว่าง

ชั้นเคลือบและพีอีอีเคได้ นอกจากนี้ยังให้ฟิล์มที่มีคุณภาพดี มีอัตราการพอกพูน (deposition rate) สูง และเมื่อนำไปให้ความร้อนแบบซินเตอร์ (sintering) พบว่าช่วยเพิ่มการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (crystalline HA) อีกด้วย^(4,12) อย่างไรก็ตามไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ได้จากวิธีสปัตเตอริงมักอยู่ในรูปอสัณฐาน (amorphous deposited HA film) ซึ่งมีเสถียรภาพและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่อยู่ในรูปผลึก⁽¹⁶⁾ โดยไฮดรอกซีอะพาไทต์รูปอสัณฐานสามารถเปลี่ยนเป็นผลึกได้เมื่อได้รับอุณหภูมิสูงกว่า 600 องศาเซลเซียส⁽¹⁷⁾ ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติของพีอีอีเค Yang และคณะพบว่าการทำไฮโดรเทอร์มอลที่อุณหภูมิ 100 150 และ 200 องศาเซลเซียส สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ลดการเจือปนของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตในรูปแบบต่าง ๆ (phase impurity) ที่ส่งผลต่อการตอบสนองทางชีวภาพ และลดการเกิดตำหนิ (defects) ได้อีกด้วย โดยอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสทำให้เกิดผลึกมากที่สุด มีการเจือปนของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตอื่นนอกเหนือจากไฮดรอกซีอะพาไทต์น้อยที่สุด⁽¹⁸⁾ แต่อุณหภูมินี้มีค่าสูงกว่าอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature) ของพีอีอีเค ซึ่งมีค่าประมาณ 143 องศาเซลเซียส จึงส่งผลต่อคุณสมบัติทางกลของพีอีอีเคได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงพิจารณาใช้การให้ความร้อนด้วยกระบวนการไฮโดรเทอร์มอลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยคาดหวังให้เกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์มากขึ้น และลดการเจือปนของสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตในรูปแบบต่าง ๆ ที่ไม่ใช่ไฮดรอกซีอะพาไทต์ การทำไฮโดรเทอร์มอลยังช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไททาเนียมไนไตรด์ ซึ่งส่งผลดีต่อการชักนำเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconductive)⁽¹³⁾ รวมทั้งอาจส่งผลต่อความหยาบผิวซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการตอบสนองของเซลล์⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ Huang และคณะพบว่าชั้นเคลือบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีรูพรุนและผ่านการให้ความร้อนมีการตอบสนองของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ดีกว่าชั้นเคลือบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ไม่มีรูพรุน⁽²⁰⁾ ซึ่งขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 50-150 ไมโครเมตร⁽²¹⁾ ถึง 300 ไมโครเมตร⁽²²⁾ เช่นเดียวกับ Hing และคณะ พบว่ารูพรุนขนาด 100 ไมโครเมตรช่วยให้เนื้อเยื่อกระดูกสามารถแทรกตัวผ่านรูพรุนและเจริญต่อไปได้⁽²³⁾

จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมา พบว่ายังไม่มี การ

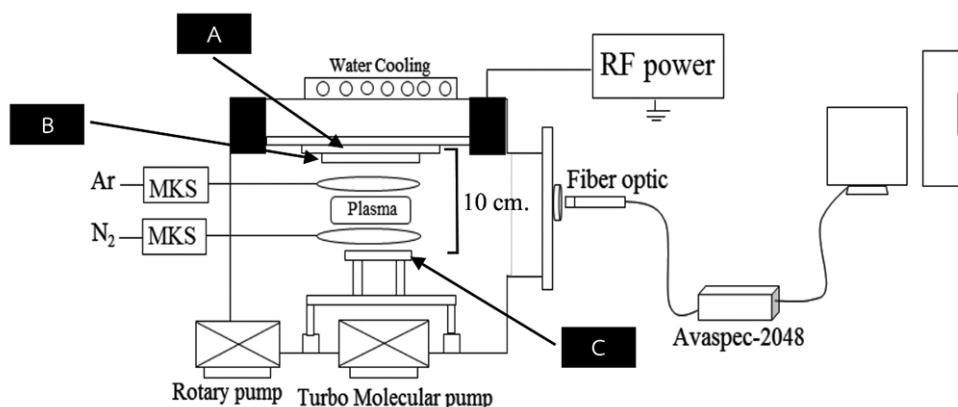
ศึกษาเกี่ยวกับการประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพของฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์จากการสเปกโตรสโกปีร่วมกับการทำไฮโดรเทอร์มอล การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของชั้นเคลือบดังกล่าวเลือกใช้การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture test) ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)⁽²⁴⁾ โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) หรือเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast)⁽²⁵⁾ การศึกษานี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาความเป็นพิษของฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เคลือบบนพื้นผิวฟิออีเคก่อนและหลังการทำไฮโดรเทอร์มอล มีสมมติฐานว่า ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนและหลังการทำไฮโดรเทอร์มอลมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และกระบวนการไฮโดรเทอร์มอลไม่เปลี่ยนแปลงค่าความหยาบผิวของชั้นเคลือบ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชั้นฟิออีเคและเคลือบผิวด้วยวิธีแมกนีตรอนสปัตเตอริง (Magnetron sputtering method)

เตรียมวัสดุฟิออีเครูปวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร จำนวน 36 ชิ้น แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) ฟิออีเคที่ไม่ปรับสภาพพื้นผิวจำนวน 12 ชิ้น และ 2) ฟิออีเคเข้ากระบวนการเคลือบผิวไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์จำนวน 24 ชิ้น ชัดเรียบผิวหน้าตัดด้วยเครื่องขัด

กระดาษทราย (Grinding/Polishing Machine, MoPao 160E, MEGA Advance, China) ร่วมกับน้ำปราศจากอ็อกซิเจนและกระดาษทรายความละเอียด 400 600 800 และ 1200 กริต ตามลำดับ ทำความสะอาดชิ้นงานทดลองโดยแช่ในเอทานอลและอะซิโตนร่วมกับเครื่องอัลตราโซนิค (Transsonic T700, Elma, Singen, Germany) นานครั้งละ 10 นาที ตามลำดับ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและเก็บในภาชนะแห้งที่ปิดสนิท (25 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเข้ากระบวนการเคลือบผิวไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ตามการศึกษาของ Nupangtha และ Boonyawan⁽²⁶⁾ โดยเตรียมเครื่องเคลือบในสุญญากาศระบบอาร์เอฟ แมกนีตรอน สปัตเตอริง (RF magnetron sputtering) ใช้แผ่นโลหะไททาเนียมบริสุทธิ์ (ร้อยละ 99.99) เส้นผ่านศูนย์กลาง 75 มิลลิเมตร หนา 3.5 มิลลิเมตร ทำหน้าที่เป็นคาโธด (รูปที่ 1A) ร่วมกับแผ่นไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ทำหน้าที่เป็นสารเคลือบเป้าร่วม (co-axis target) (รูปที่ 1B) จากนั้นวางฟิออีเคลงในห้องเคลือบโดยกำหนดระยะห่างระหว่างเป้าสารเคลือบ (คาโธด) กับวัสดุรองรับ (ฟิออีเค) (รูปที่ 1C) ที่ 10 เซนติเมตร ใช้ก๊าซผสมระหว่างไนโตรเจนและอาร์กอนเป็นก๊าซไอออไนซ์และก๊าซสปัตเตอริงตามลำดับ คงอัตราการจ่ายก๊าซอาร์กอนให้มีค่าคงที่ 55 sccm และปรับสัดส่วนของก๊าซไนโตรเจนที่ 1 sccm จากนั้นปรับความดันภายในห้องเคลือบให้อยู่ระหว่าง 3×10^{-3} ถึง 7×10^{-3} ทอร์ และปรับกำลังอาร์เอฟ (RF) รอบละ 200 วัตต์ เริ่มกระบวนการสปัตเตอ-



รูปที่ 1 โดอะแกรมของเครื่องเคลือบสุญญากาศติดตั้งระบบเครื่องวิเคราะห์ที่ส่วนประกอบทางเคมี⁽²⁶⁾
 A: แผ่นไททาเนียมบริสุทธิ์ (คาโธด), B: แผ่นไฮดรอกซีอะพาไทต์ (สารเคลือบเป้าร่วม), C: ฟิออีเค (วัสดุรองรับ)

Figure 1 A schematic diagram of sputtering system with the optical spectroscopy (OES) system⁽²⁶⁾;
 A: Pure titanium disk (Cathode), B: HA co-axis target, C: PEEK (substrate)

ริงนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้ฟิล์มที่ได้เย็นตัวลงในห้องเคลือบภายใต้ก๊าซไนโตรเจน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างที่เตรียมได้ในตู้ควบคุมความชื้น (desiccator cabinet) เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

กระบวนการไฮโดรเทอร์มอล (Hydrothermal treatment)

แบ่งพีอีเคที่มีฟิล์มไททานเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ทำไฮโดรเทอร์มอลและไม่ทำไฮโดรเทอร์มอล กลุ่มละ 12 ชิ้น นำกลุ่มที่ทำไฮโดรเทอร์มอลวางลงในก้นของภาชนะ (teflon container) ซึ่งบรรจุน้ำปราศจากไอออน (deionized water) แล้วนำเข้าตู้อบลมร้อน (hot air oven) กำหนดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้เย็นตัวลงในตู้ควบคุมความชื้น 24 ชั่วโมง แล้วเก็บในตู้ควบคุมความชื้นเพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป การทำไฮโดรเทอร์มอลในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการเกิดผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งมีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่ารูปอสัณฐาน⁽¹⁶⁾

การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ใช้เซลล์สร้างเส้นใย (L929, Murine fibroblast cell line) ของหนูเป็นเซลล์ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)) ตามคู่มือของระบบมาตรฐาน 10993 Part 5 Cytotoxic test (ISO 10993-5:2009)⁽²⁷⁾ เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ (Dulbecco’s Modified Eagle Medium, DMEM) (Gibco® BRL, New York, USA) ร่วมกับซีรัมของลูกวัวร้อยละ 10 (10% Fetal bovine serum, Gibco® BRL) เพนนิซิลลิน/สเตรปโตมัยซินซัลเฟต และแอมโฟเทอริซินบี ร้อยละ 1 (1% Penicillin / Streptomycin sulfate and Amphotericin B; Gibco® BRL) เซลล์ถูกเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ระดับความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 95 เปลี่ยนอาหารทุก 1-2 วัน หรือเมื่อมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้เซลล์เต็มจานเลี้ยงเซลล์ ทำการแบ่งเซลล์เพื่อใช้ในการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างและสารที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยวิธีสัมผัสแบบอ้อม แบ่งขึ้นทดสอบออกเป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1 ทำการปลอดเชื้อขึ้นทดสอบด้วยการอบก๊าซ (ethylene oxide sterilization) จากนั้นเตรียมสารสกัดจากขึ้นทดสอบ (material extracts) โดยการแช่ขึ้นทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ แล้วนำไปไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของขนาดขึ้นทดสอบต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์คือ 3 ตารางเซนติเมตรต่อมิลลิลิตร⁽²⁸⁾ โดยมีระยะเวลาการแช่ขึ้นตัวอย่างแตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 7 วัน 14 วัน และ 35 วัน

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งกลุ่มทดสอบความเป็นพิษ

Table 1 Sample test groups

Group	Material extracts
Control	Blank (DMEM)
Negative control	Plastic coverslips (Thermanox®; Nunc, Rochester, NY)
Positive control	ZDEC polyurethane (Goodfellow, Huntington, England)
Experimental group 1 (n=12)	PEEK (Suzhou Industrial Park Jinlaida trading Co.,Ltd.,China)
Experimental group 2 (n=12)	As-deposited PEEK
Experimental group 3 (n=12)	Hydrothermally treated PEEK; HT

PEEK: Bared PEEK, As-deposited PEEK: TiN-HA coated films on PEEK, Hydrothermally treated PEEK: Hydrothermally treated TiN-HA coated films on PEEK

การทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity assay)

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด L929 โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณมากพอ ย่อยเซลล์ และนับเซลล์ที่มีความหนาแน่น 2.5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในภาดหลุม 96 หลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscopy) เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการ

แช่ขึ้นทดสอบในระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 24 ชั่วโมง 7 วัน 14 วัน และ 35 วัน ในปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยมีหลุมควบคุม (blank) เป็นอาหารดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ หลุมควบคุมลบ (negative control) เป็นอาหารที่แช่แผ่นกระจกปิดสไลด์ (Thermanox[®] Plastic coverslips; Nunc, Rochester, NY) และหลุมควบคุมแบบบวก (positive control) เป็นอาหารที่แช่แผ่นแซดดีอีซี พอลิยูรีเทน (ZDEC polyurethane; Goodfellow, Huntington, England) โดยทำการทดลองจำนวน 3 หลุมต่อกลุ่มขึ้นทดสอบ นำมาเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมสารละลายเอ็มทีที (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole, MTT) (Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และเติมอาหารชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่มีองค์ประกอบของฟีนอลเรด (phenol red) (DMEM, Gibco[®] BRL) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ในทุกหลุมนำไปไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารที่มีสารละลายเอ็มทีทีออก และเติมไดเมทิลซัลโฟไซด์หรือดีเอ็มเอสโอ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA) ต่อเอทานอล (ethanol) (Sigma, St. Louis, MO, USA) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ปล่อยให้เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาอ่านค่าระดับความทึบแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลต (microplate reader) เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของฟิล์มไททานเนียมไดออกไซด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ด้วยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มีค่าเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการแช่ขึ้นตัวอย่างต่อค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม คูณด้วย 100 สารที่มีพิษต่อเซลล์จะมีค่าร้อยละความมีชีวิตน้อยกว่า 70⁽²⁷⁾

การวิเคราะห์ลักษณะของชั้นเคลือบ

ตรวจสอบลักษณะชั้นเคลือบที่เกิดขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) (JSM-IT300LV; JEOL) ด้วยศักย์เร่งอิเล็กตรอนปรับเปลี่ยน 20 kV เพื่อวิเคราะห์พื้นผิวของชั้นเคลือบร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope; AFM) วิเคราะห์ความหยาบพื้นผิว

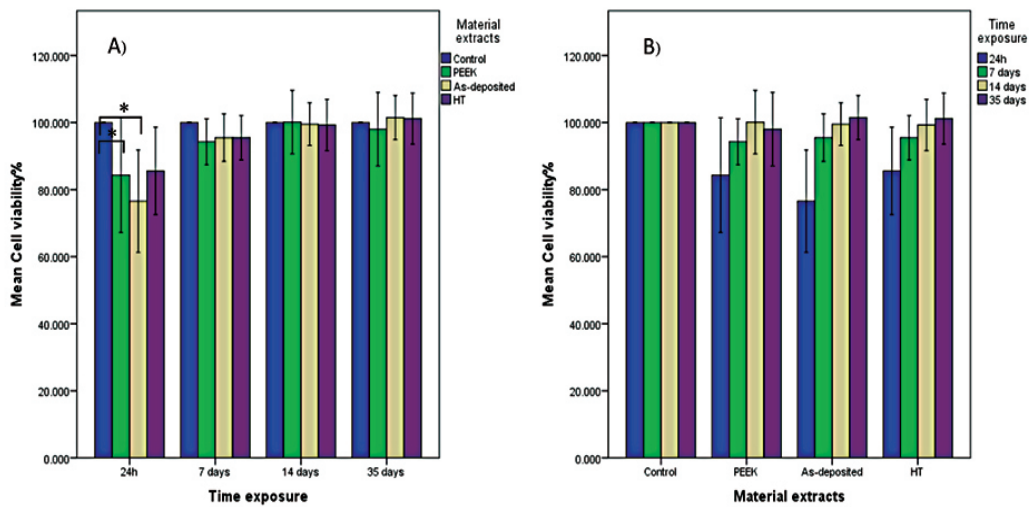
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดสอบนำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติทดสอบความแปรปรวนแบบสองทาง (two-way ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส เวอร์ชัน 24 (SPSS version 24)

ผลการศึกษา

การทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์

ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แสดงดังตารางที่ 2 และแผนภูมิที่ 1 โดยเมื่อพิจารณาตามช่วงเวลาพบว่าในกลุ่ม 24 ชั่วโมง สารสกัดจากฟิอ็อคและฟิอ็อคที่มีฟิล์มไททานเนียมไดออกไซด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนทำไฮโดรเทอร์มอลมีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 84.320 และ 76.550 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (blank) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่าร้อยละความมีชีวิตรอดของกลุ่มฟิอ็อคที่มีฟิล์มไททานเนียมไดออกไซด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์หลังทำไฮโดรเทอร์มอลมีค่าร้อยละ 85.575 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และในกลุ่ม 35 วัน พบว่ากลุ่มฟิอ็อคที่เคลือบไททานเนียมไดออกไซด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลมีค่าร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบในช่วงเวลาเดียวกันไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังแสดงในแผนภูมิ 1A และเมื่อพิจารณาชนิดของสารสกัดจากวัสดุ พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ในกลุ่มทดลองฟิอ็อคที่มีฟิล์มไททานเนียมไดออกไซด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนและหลังทำไฮโดรเทอร์มอลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ (แผนภูมิ 1B) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดจากกลุ่มทดลองทั้งสามไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพิจารณาจากค่าร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่าร้อยละ 70 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1B



แผนภูมิที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์จากการทดสอบความเป็นพิษ โดยแบ่งตาม (A) ระยะเวลาที่สัมผัสวัสดุ และ (B) ชนิดของสารสกัด Control: กลุ่มควบคุม (Blank), PEEK: พียอเคที่ยังไม่ได้รับสภาพพื้นผิว, As-deposited: พียอเคที่เคลือบด้วยฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และ HT: พียอเคที่เคลือบด้วยฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ร่วมกับทำไฮโดรเทอร์มอล

Diagram 1 Mean and standard deviation of optical density (OD) from cytotoxicity assay according to A) Time exposure to materials, B) Types of material extracts. Control: Blank, PEEK: PEEK disks, As-deposited : TiN-HA coated film on PEEK HT : Hydrothermally treated TiN-HA coated film on PEEK

เมื่อพิจารณาลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ที่กำลังขยาย 40 เท่า กลุ่มควบคุมแบบบวกเกิดการตายของเซลล์จำนวนมาก พบเซลล์หลากหลายรูปร่างเกิดการหดตัว เรียงตัวกระจายกันอยู่อย่างหลวม ๆ (รูปที่ 2c) ในขณะที่สารสกัดจากกลุ่มอื่นพบเซลล์ที่มีชีวิตรอดมากกว่า โดยเซลล์มีลักษณะยึดตัวออก รูปร่างค่อนข้างเรียวยาว และอยู่รวมกันหนาแน่นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบบวก (รูปที่. 2a, 2b, 2d, 2e และ 2f) (รูปที่ 2)

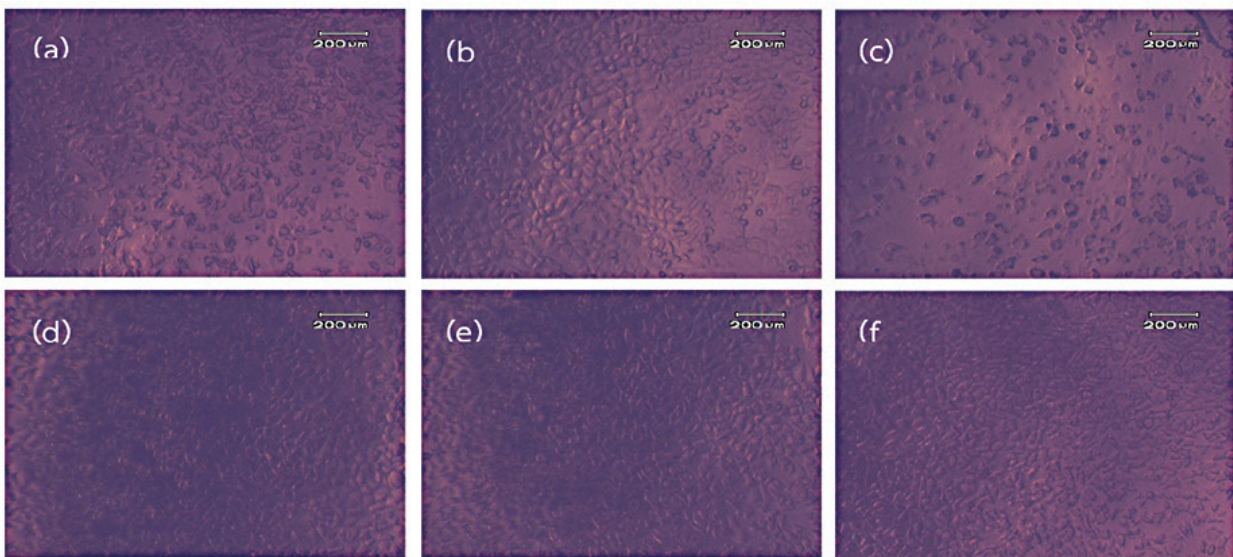
ลักษณะพื้นผิวของชั้นเคลือบ

จากการวิเคราะห์พื้นผิวชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนและหลังการทำไฮโดรเทอร์มอลด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าพื้นผิวของชั้นเคลือบมีลักษณะขรุขระ พบรอยแตก (microcracks) บางบริเวณ และไม่พบรูพรุนบริเวณชั้นเคลือบ ดังแสดงในรูปที่ 3 และเมื่อวิเคราะห์ความหยาบผิวด้วย กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) พบว่าก่อนทำไฮโดรเทอร์มอล พื้นผิวค่อนข้างเรียบ เกิดลักษณะกลุ่มก้อนคล้ายเกาะ

(island-like morphology) ที่มีความสูงประมาณ 700 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4A ในขณะที่หลังทำไฮโดรเทอร์มอลมีลักษณะขรุขระกว่า พบกลุ่มก้อนที่มีความสูง 1 ไมครอน ดังแสดงในรูปที่ 4B และเมื่อพิจารณาค่าความหยาบพื้นผิวเฉลี่ย (Ra) พบว่าชั้นเคลือบมีความหยาบผิวเพิ่มขึ้นจาก 171 นาโนเมตร เป็น 256 นาโนเมตรเมื่อผ่านการทำไฮโดรเทอร์มอล

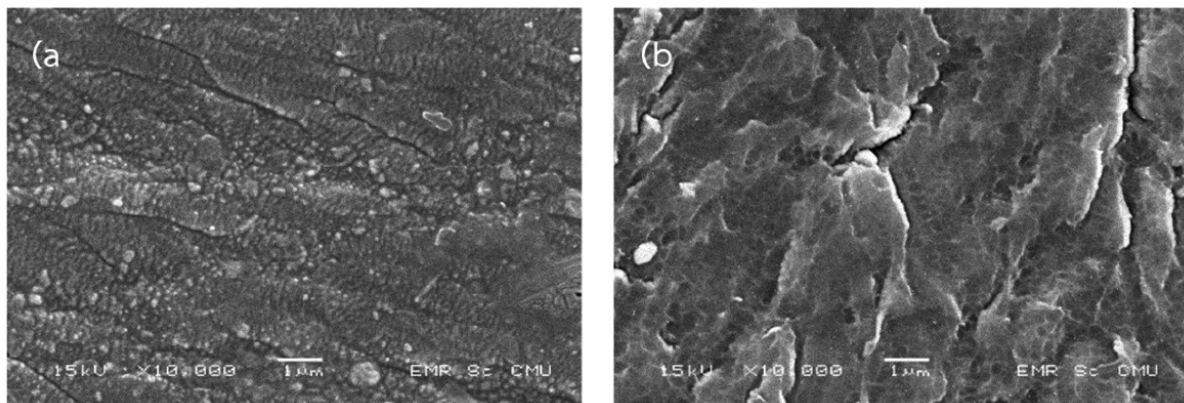
บทวิจารณ์

ความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ (biocompatibility) เป็นคุณสมบัติสำคัญของวัสดุทางการแพทย์ที่นำมาใช้ในร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะวัสดุปลูกฝังที่สัมผัสกับเนื้อเยื่อโดยตรง จึงจำเป็นต้องทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสารสกัดหรือชิ้นวัสดุ (solid specimens) ซึ่งอาจมีภาระละลายของสาร (elutable substance) การสลายตัว หรือการสึกกร่อนของวัสดุ (degradation or corrosion products) ที่อาจส่งผลต่อเนื้อเยื่อโดยรอบได้⁽²⁹⁾ การศึกษานี้ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) เพื่อทดสอบความเป็นพิษในการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพ เนื่องจาก (1) ได้ผลการประเมินรวดเร็ว (2) เป็นวิธีที่มาตรฐาน (3) ได้ข้อมูลเชิงปริมาณและสามารถ



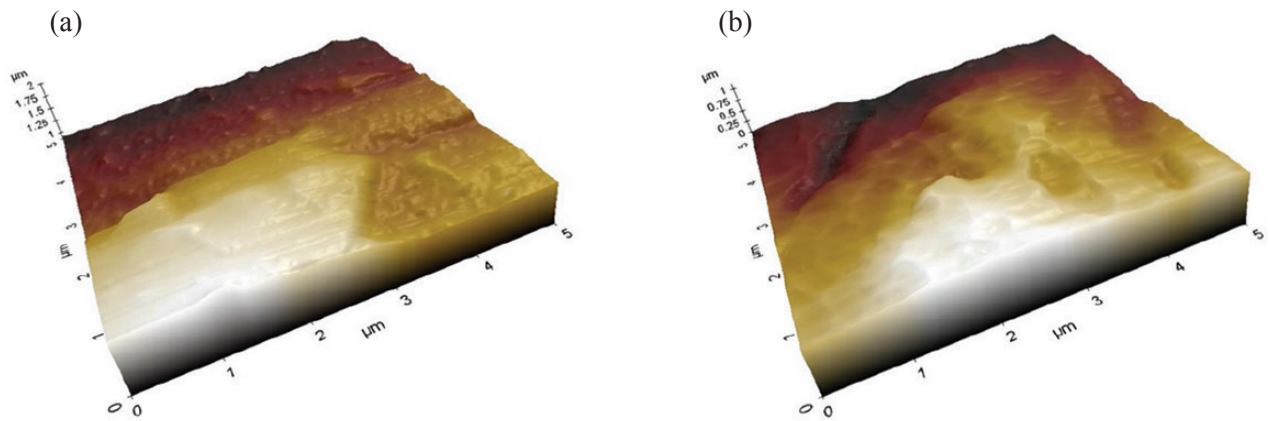
รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูความเปลี่ยนแปลงต่างเฟส กำลังขยาย 40 เท่า ตามชนิดสารสกัด (a) กลุ่มควบคุม, (b) กลุ่มควบคุมแบบลบ, (c) กลุ่มควบคุมแบบบวก, (d) พียออีเค, (e) พียออีเคที่มีฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนไฮโดรเทอร์มอล และ (f) พียออีเคที่มีฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์หลังไฮโดรเทอร์มอล

Figure 2 Cell morphology under phase contrast microscope (40x) after stimulation by material extracts. (a) control, (b) negative control, (c) positive control, (d) PEEK, (e) TiN-HA coated film on PEEK or as-deposited and (f) hydrothermally treated TiN-HA coated film on PEEK.



รูปที่ 3 (a) ลักษณะพื้นผิวของฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (b) หลังทำไฮโดรเทอร์มอลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Figure 3 (a) SEM images of the surface of TiN-HA coatings. (b) represent the hydrothermally treated sample at 100°C for 12 hours.



รูปที่ 4 (a) ลักษณะพื้นผิวของฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (b) หลังทำไฮโดรเทอร์มอลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

Figure 4 (a) AFM images of TiN-HA coating., (b) represent the hydrothermally treated sample at 100°C for 12 hours.

เปรียบเทียบได้ และ (4) มีความไว (sensitivity) สูงและช่วยคัดกรองวัสดุที่มีพิษก่อนนำไปทดลองในขั้นต่อไป⁽³⁰⁾

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของฟิอ็อคและชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู พบว่าสารสกัดจากวัสดุดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่าร้อยละ 70 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไฮโดรเทอร์มอล คือ กระบวนการที่วัสดุได้รับอุณหภูมิสูงขึ้นร่วมกับไอน้ำอิ่มตัว (saturated steam) ทำให้เกิดพลังงานและสามารถเปลี่ยนไฮดรอกซีอะพาไทต์รูปอสัณฐานเป็นรูปผลึกได้⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ยังส่งเสริมให้ไททาเนียมและไททาเนียมไนไตรด์ในชั้นเคลือบเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เกิดเป็นชั้นออกไซด์ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ และกระบวนการเกิดการยึดติดของรากเทียมกับกระดูก⁽³¹⁾ อีกทั้งยังช่วยกำจัดไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในขั้นตอนต่างๆ (hydrocarbon contamination) ซึ่งส่งผลเสียต่อการตอบสนองของเซลล์อีกด้วย⁽¹³⁾ ดังนั้นไฮโดรเทอร์มอลจึงจัดเป็นกระบวนการที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

โดยพบว่าในกลุ่มฟิอ็อคที่เคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ทั้งก่อนและหลังทำไฮโดรเทอร์มอล ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงเวลา อย่างไรก็ตามค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เห็นได้จากสารสกัดจากชั้น

เคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ทั้งก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลในกลุ่ม 35 วัน มีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มช่วงเวลาอื่น (แผนภูมิที่ 1A) อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของระยะเวลาที่วัสดุแช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ละลายออกจากระดับชั้นเคลือบเข้าสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากชั้นเคลือบประกอบไปด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ทั้งในรูปอสัณฐานและรูปผลึก ซึ่งโดยปกติไฮดรอกซีอะพาไทต์ในรูปอสัณฐานสามารถละลายได้รวดเร็วกว่าในรูปผลึก⁽³²⁾ เกิดเป็นแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบอินทรีย์หลักของเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue) และมีคุณสมบัติชีวกัมมันต์ (bioactive property) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกและจับกับโปรตีนในกระดูก (bone morphogenetic proteins; BMP) ชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ (osteoinductive)⁽³³⁾ นอกจากนี้ยังเกิดเป็นแคลเซียมไอออนและฟอสฟอรัสไอออนถูกนำมาใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้อีกด้วย⁽³⁴⁾ Weng และคณะพบว่าคุณสมบัติชีวกัมมันต์ของไฮดรอกซีอะพาไทต์ขึ้นกับการละลายของแคลเซียมและฟอสฟอรัสไอออน⁽³⁵⁾ Porter และคณะเชื่อว่าเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมและฟอสฟอรัสบริเวณพื้นผิวของวัสดุหรือในเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix; ECM) เพิ่มขึ้นจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างอะพาไทต์ชีวภาพ (biological apatite) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของกระดูก และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกที่พื้นผิวของวัสดุ⁽³⁶⁾ สอดคล้องกับ

การศึกษาของ Sun และคณะที่กล่าวว่า การละลายของไฮดรอกซีอะพาไทต์บางส่วนจากชั้นเคลือบจำเป็นสำหรับการกระตุ้นการเจริญของกระดูกในระยะแรก (early stage of bone healing) และทำให้วัสดุฝังเกิดการยึดติด (fixation) กับกระดูกโดยรอบได้ดีกว่า⁽³⁷⁾ ในขณะที่ไฮดรอกซีอะพาไทต์ในรูปผลึกเป็นปัจจัยสำคัญต่อการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoconduction) ในกระบวนการหายของแผลบริเวณรอยต่อระหว่างรากเทียมและกระดูก (osseous implant healing period)⁽³⁸⁾ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาวัสดุแต่ละกลุ่ม พบว่าค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงเวลา เป็นเพราะฟิล์มไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ของทั้งสองกรณีต่างประกอบด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์ในรูปอสัณฐาน ซึ่งสามารถละลายได้บางส่วน ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จึงไม่แตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ทดสอบความเป็นพิษ

เมื่อพิจารณารูปร่างและการกระจายตัวของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูความเปลี่ยนแปลงเฟสพรูปร่างเซลล์แบบหลายเหลี่ยม (polygonal shape) อยู่กันอย่างหนาแน่นในกลุ่มควบคุม (blank) และกลุ่มควบคุมแบบลบ ทั้งนี้เนื่องจากในกลุ่มควบคุมเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติและในกลุ่มควบคุมแบบลบเป็นการนำสารดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ที่แช่แผ่นกระจกปิดสไลด์ ซึ่งเป็นวัสดุที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เกาะหลวมเพาะเลี้ยงได้ดี มีการยึดตัว อยู่กันอย่างหนาแน่น ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุมแบบบวก เซลล์มีการหดตัว มีรูปร่างแตกต่างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั่วไป กระจายตัวกันอย่างหลวมๆ เนื่องจากแผ่นแซดดีอีซี พอลิยูรีเทน เป็นวัสดุที่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ สารสกัดที่ได้จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถเกาะพื้นผิวด้านเซลล์ได้และทำให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ต่ำมาก และเมื่อพิจารณาในกลุ่มพีอีเคและชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลพบว่าคล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมแบบลบ สอดคล้องกับค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ดังกล่าวข้างต้น

นอกจากส่วนประกอบทางเคมีของวัสดุฝังที่ส่งผลต่อการเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะแรกเริ่มดังกล่าวไปแล้ว ข้างต้น ความหยาบผิว (surface roughness) ก็มีบทบาทสำคัญเช่นกัน⁽⁴⁾ ซึ่งภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด

ส่องกราดพบว่าชั้นเคลือบทั้งก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลมีความขรุขระ และพบมีรอยแตกในบางบริเวณ ซึ่งรอยแตกดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้จากสองสาเหตุ คือ จากขั้นตอนการปลดปล่อยความเค้น (stress) ภายในชั้นเคลือบระหว่างการเย็นตัวสู่อุณหภูมิห้อง⁽³⁹⁾ หรืออาจเกิดขณะได้รับความร้อนจากการทำไฮโดรเทอร์มอล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกและความเค้นสะสมของชั้นเคลือบ และส่งผลต่อลักษณะพื้นผิวของชั้นเคลือบ⁽⁴⁰⁾ ซึ่ง Porter และคณะ พบว่าการมีตำหนิ (defects) จะส่งผลให้วัสดุมีอัตราการละลายตัวเพิ่มขึ้น⁽³⁶⁾ ดังนั้นจึงสอดคล้องกับสาเหตุของผลการศึกษาที่พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นด้วย

Paital และคณะ⁽⁴¹⁾ พบว่าเมื่อความหยาบผิวของวัสดุฝังเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การเกาะ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดได้ดีกว่าพื้นผิวเรียบ เนื่องจากพื้นผิวหยาบจะช่วยเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างชั้นเคลือบและของเหลวในร่างกาย (coating and body fluid interface)⁽³⁷⁾ ซึ่งเซลล์ออสติโอบลาสต์ (osteoblast) และเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchymal cell) สามารถเกาะกับพื้นผิวที่มีความหยาบระดับไมครอน (micron-scaled roughness) นี้ได้โดยตรง⁽⁴²⁾ โดยอาศัยการเกาะของโปรตีนซีรัม (serum protein) บริเวณพื้นผิววัสดุฝัง เช่น ไวโทรเนคติน (vitronectin) ไฟโบรเนคติน (fibronectin) และลามินิน (laminin) ร่วมกับการทำงานของอินทิกรินรีเซปเตอร์ (integrin receptor)⁽⁴³⁾ จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมพบว่าชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์ไฮดรอกซีอะพาไทต์หลังไฮโดรเทอร์มอลมีความหยาบผิวมากกว่าก่อนไฮโดรเทอร์มอล อาจเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์และการจัดเรียงตัวใหม่ของโครงสร้างผลึก⁽⁴⁴⁾ ดังนั้นจึงคาดว่าชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ผ่านการทำไฮโดรเทอร์มอลส่งผลดีต่อการเกาะของเซลล์มากกว่า อย่างไรก็ตาม Shi และคณะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวไททาเนียมไนไตรด์ในระดับไมโคร (micro-scaled) เมื่อทำไฮโดรเทอร์มอลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส⁽¹³⁾ ดังนั้นความหยาบผิวที่เปลี่ยนแปลงไปอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ Albrektson และคณะพบว่าความหยาบผิวที่เหมาะสมที่สุดของวัสดุฝังต่อการเกาะของเซลล์และการสร้างกระดูกคือ 1-2 ไมครอน⁽⁴⁵⁾ ผลการศึกษาพบว่าความหยาบผิวที่ได้มีค่าต่ำกว่า แต่ผู้วิจัยคาดว่าหากมีการศึกษาถึง

เงื่อนไขของการทำไฮโดรเทอร์มอลที่เหมาะสม ความหนาของผิวที่สามารถเข้าใกล้ช่วงระยะ 1-2 ไมครอนนี้ได้ และอาจจะส่งผลดีต่อการตอบสนองของเซลล์

Karageogiou และคณะพบว่าการศึกษาที่มีความพรุนสูงและรูพรุนขนาดใหญ่ช่วยเพิ่มการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกและการยึดติดของวัสดุฝังกับกระดูก (osseointegration)⁽⁴⁶⁾ ดังนั้นการไม่พบรูพรุนในชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์อาจส่งผลต่อการตอบสนองของเซลล์ด้วยเช่นกัน ดังนั้นจากการศึกษาข้างต้นจึงยอมรับสมมติฐานว่าชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ทั้งก่อนและหลังไฮโดรเทอร์มอลไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์จากการทดสอบด้วยวิธีเอ็มทีที การทำไฮโดรเทอร์มอลไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนาของผิว เนื่องจากหลังทำไฮโดรเทอร์มอลพบว่าความหนาของผิวของชั้นเคลือบเกิดจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ อย่างไรก็ตามชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์และสภาวะการทำไฮโดรเทอร์มอลต้องมีการศึกษาเพื่อสร้างชั้นเคลือบที่เหมาะสมต่อไป นอกจากนี้การนำวัสดุทางการแพทย์มาใช้จริงจำเป็นต้องผ่านการทดสอบในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากกลไกการตอบสนองต่อสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นสิ่งที่ซับซ้อน^(47,48)

บทสรุป

การศึกษาความเป็นพิษของชั้นเคลือบไททาเนียมไนไตรด์-ไฮดรอกซีอะพาไทต์ภายหลังการทำไฮโดรเทอร์มอลด้วยวิธีเอ็มทีที พบว่าชั้นเคลือบไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และในกลุ่ม 35 วันพบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่มทดลองสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวชั้นเคลือบพบว่าความหนาของผิวเกิดจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ในชั้นเคลือบ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับผู้เข้ารับการศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัยประจำบ้านเพื่อวุฒิมัธยมศึกษา จากมหาวิทยาลัยทันตแพทย์แห่งประเทศไทย ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สิริวดี ชมเดช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้อนุเคราะห์เซลล์ไลน์ L-929 เพื่อนำมาใช้ศึกษาในงานวิจัย ขอขอบคุณศูนย์วิจัยฟิสิกส์ของล้าอนุภาคและพลาสมา

ภาควิชาฟิสิกส์-วัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย และขอขอบคุณ ดร.ธนพัฒน์ ศาสตร์ระจิก ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับภาวะวิเคราะห์ทางสถิติในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Skirbutis G, Dzingutė A, Masiliūnaitė V, Šulcaitė G, Žilinskas JJS. A review of PEEK polymer's properties and its use in prosthodontics. *Stomatologija* 2017; 19(1): 19-23.
2. Kurtz SM, Devine JN. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials* 2007; 28(32): 4845-4869.
3. Toth JM, Wang M, Estes BT, Scifert JL, Seim HB, Turner AS. Polyetheretherketone as a biomaterial for spinal applications. *Biomaterials* 2006; 27(3): 324-334.
4. Rabiei A, Sandukas S. Processing and evaluation of bioactive coatings on polymeric implants. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101(9): 2621-2629.
5. Murphy W, Black J, Hastings G. Handbook of biomaterial properties. 2nd ed. New York: Springer; 2016.
6. Ma R, Tang T. Current strategies to improve the bioactivity of PEEK. *Int J Mol Sci* 2014; 15(4): 5426-5445.
7. Wang H, Xu M, Zhang W, Kwok DTK, Jiang J, Wu Z, et al. Mechanical and biological characteristics of diamond-like carbon coated poly aryl-ether-ether-ketone. *Biomaterials* 2010; 31(32): 8181-8187.
8. Almasi D, Iqbal N, Sadeghi M, Sudin I, Abdul Kadir MR, Kamarul T. Preparation Methods for Improving PEEK's Bioactivity for Orthopedic and Dental Application: A Review. *Int J Biomater* 2016; article ID 8202653, 12 pages.

9. Hench. LL. An introduction to bioceramics. 2nd ed. London: Imperial College Press; 2013.
10. Tang SM, Cheang P, AbuBakar MS, Khor KA, Liao K. Tension–tension fatigue behavior of hydroxyapatite reinforced polyetheretherketone composites. *Int J Fatigue* 2004; 26(1): 49-57.
11. Sawase T, Yoshida K, Taira Y, Kamada K, Atsuta M, Baba K. Abrasion resistance of titanium nitride coatings formed on titanium by ion-beam-assisted deposition. *J Oral Rehabil* 2005; 32(2): 151-157.
12. Boonyawan D, Waruriya P, Suttiat K. Characterization of titanium nitride–hydroxyapatite on PEEK for dental implants by co-axis target magnetron sputtering. *Surf Coat Technol* 2016; 306: 164-170.
13. Shi X, Xu L, Le TB, Zhou G, Zheng C, Tsuru K, et al. Partial oxidation of TiN coating by hydrothermal treatment and ozone treatment to improve its osteoconductivity. *Mater Sci Eng C* 2016; 59: 542-548.
14. Piscanec S, Ciacchi LC, Vesselli E, et al. Bioactivity of TiN-coated titanium implants. *Acta Mater* 2004; 52(5): 1237-1245.
15. Ha S-W, Mayer J, Koch B, Wintermantel E. Plasma-sprayed hydroxylapatite coating on carbon fibre reinforced thermoplastic composite materials. *J Mater Sci Mater Med* 1994; 5(6): 481-484.
16. Faghihi-Sani M-A, Arbabi A, Mehdinezhad-Roshan A. Crystallization of hydroxyapatite during hydrothermal treatment on amorphous calcium phosphate layer coated by PEO technique. *Ceram Int* 2013; 39(2): 1793-1798.
17. Wang BC, Chang E, Lee TM, Yang CY. Changes in phases and crystallinity of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings under heat treatment: A quantitative study. *J Biomed Mater Res* 1995; 29(12): 1483-1492.
18. Yang CW, Lui TS, Chang E. Low temperature crystallization and structural modification of plasma-sprayed hydroxyapatite coating with hydrothermal treatment. *Adv Mat Res* 2007; 15: 147-152.
19. Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process: an alternative to plasma spraying. *Bio-materials* 2005; 26(3): 327-337.
20. Huang Y, Song L, Liu X, et al. Hydroxyapatite coatings deposited by liquid precursor plasma spraying: controlled dense and porous microstructures and osteoblastic cell responses. *Bio-fabrication* 2010; 2(4): 045003.
21. Wang H, Zhi W, Lu X, et al. Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures. *Acta Biomaterialia* 2013; 9(9): 8413-8421.
22. Chang BS, Lee iCKfC-K, Hong KS, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 2000; 21(12): 1291-1298.
23. Hing KA. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *Int J Appl Ceram Technol* 2005; 2(3): 184-199.
24. Han CM, Lee EJ, Kim HE, et al. The electron beam deposition of titanium on polyetheretherketone (PEEK) and the resulting enhanced biological properties. *Biomaterials* 2010; 31(13): 3465-3470.
25. Hunter A, Archer CW, Walker PS, Blunn GW. Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterials* 1995; 16(4): 287-295.

26. Nupangtha W, Boonyawan D. Fabrication and Physical Properties of Titanium Nitride/Hydroxyapatite Composites on Polyether Ether Ketone by RF Magnetron Sputtering Technique. *Journal of Physics: Conference Series* 2017; 901(1): 012131.
27. Thai industrial standard: TISI. Biologic evaluation of medical device (Part 5: Test for in vitro cytotoxicity ISO 10993-5). 3rd ed. Rajathevee Bangkok; 2009: 5.
28. Thai industrial standard: TISI. Biologic evaluation of medical device (Part 12: Sample preparation and reference materials ISO 10993-12). 3rd ed. Rajathevee Bangkok; 2007: 7.
29. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials—histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Investig* 1997; 1(1): 5-11.
30. Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Arciola CR, et al. Established Cell Lines and Primary Cultures in Testing Medical Devices In Vitro. *Toxicol In Vitro* 1999; 13(4): 801-810.
31. Shi X, Xu L, Munar ML, Ishikawa K. Hydrothermal treatment for TiN as abrasion resistant dental implant coating and its fibroblast response. *Mater Sci Eng C* 2015; 49: 1-6.
32. Chou L, Marek B, Wagner WR. Effects of hydroxylapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro. *Biomaterials* 1999; 20(10): 977-985.
33. Jarcho M, Kay JF, Gumaer KI, Doremus RH, Drobeck HP. Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioeng* 1977; 1(2): 79-92.
34. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* 2000; 21(12): 1283-1290.
35. Weng J, Liu Q, Wolke JGC, Zhang X, de Groot K. Formation and characteristics of the apatite layer on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid. *Biomaterials* 1997; 18(15): 1027-1035.
36. Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials* 2003; 24(25): 4609-4620.
37. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2001; 58(5): 570-592.
38. Nakasato Y, Takebe J. Analysis of Thin Hydroxyapatite Layers Formed on Anodic Oxide Titanium after Hydrothermal Treatment in Rat Bone Marrow Cell Culture. *Prosthodontic Research & Practice* 2005; 4(1): 32-41.
39. Massaro C, Baker MA, Cosentino F, Ramires PA, Klose S, Milella E. Surface and biological evaluation of hydroxyapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(6): 651-657.
40. van Dijk K, Schaeken HG, Wolke JGC, Jansen JA. Influence of annealing temperature on RF magnetron sputtered calcium phosphate coatings. *Biomaterials* 1996; 17(4): 405-410.
41. Paital SR, Dahotre NB. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Mater Sci Eng R Rep* 2009; 66(1): 1-70.
42. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. *Acta Biomater* 2014; 10(8): 3363-3371.

43. Ponche A, Bigerelle M, Anselme K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects. *Proc Inst Mech Eng H* 2010; 224(12): 1471-1486.
44. Zhu X, Son DW, Ong JL, Kim KH. Characterization of hydrothermally treated anodic oxides containing Ca and P on titanium. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14(7): 629-634.
45. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004; 17(5): 536-543.
46. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005 Sep; 26(27): 5474-5491.
47. Ducheyne P, Radin S, King L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *J Biomed Mater Res* 1993; 27(1): 25-34.
48. Radin SR, Ducheyne P. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation. *J Biomed Mater Res* 1993; 27(1): 35-45.