



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

กล กายภาพ และชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อจาก
วัสดุประกอบนาโนของไฮยารูโรแนน-เจลาตินที่เสริมแรง
ด้วยผลึกนาโนของอัลฟาไคติน

โดย

พิชญ์ ศุภผล

ถนอม บรรณประเสริฐ

ปริญทร หริรักษาพิทักษ์

ตุลาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อทุนวิจัย
งานสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณวิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุน
อุปกรณ์วิเคราะห์กลสมบัติและกายภาพสมบัติของตัวอย่าง **I-Tissue Lab** คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกและทดสอบ
ชีวสมบัติของตัวอย่าง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัย	กล ภายภาพ และชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อจากวัสดุประกอบนาโนของไฮยาโรโรแนน-เจลลาตินที่เสริมแรงด้วยผลึกนาโนของอัลฟาไคติน
ผู้วิจัย	รศ.ดร.พิชญ์ สุภผล นายถนอม บรรณประเสริฐ นายปรินทร์ ทวีรักษาพิทักษ์
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	ตุลาคม พ.ศ. 2552

บทคัดย่อ

โครงเนื้อเยื่อที่ผลิตจากโพลีเมอร์ธรรมชาติมีกลสมบัติต่ำ ไม่เหมาะกับการซ่อมสร้างเนื้อเยื่อที่ต้องการความแข็งแรง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาโครงเนื้อเยื่อธรรมชาติด้วยวิธีแช่เยือกแข็งและระเหิดวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลลาตินเสริมแรงด้วยผลึกอัลฟาไคติน โดยศึกษาถึงผลของปริมาณผลึกไคตินในสัดส่วน 0, 2, 5, 10, 20, และ 30 % ต่อน้ำหนักโพลีเมอร์ที่มีต่อคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อ พบว่า โครงเนื้อเยื่อมีโครงสร้างภายในเป็นรูพรุนต่อเนื่องขนาดประมาณ 150 ไมโครเมตร การเสริมแรงด้วยผลึกไคตินขนาดเฉลี่ย 250 x 30 นาโนเมตร (กว้างxยาว) ไม่มีผลต่อโครงสร้างฐานและการดูดซึมน้ำของโครงเนื้อเยื่อ ผลึกไคติน 2% ทำให้โครงเนื้อเยื่อมีความแข็งแรงดึงสูงกว่ากลุ่มอื่น 2 เท่า ผลึกไคติน 20-30% เพิ่มความทนทานต่ออุณหภูมิสูงและการย่อยสลาย ขณะที่ผลึกไคติน 10% ให้ผลของการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกที่ดีที่สุด การปรับปรุง กลสมบัติ ภายภาพสมบัติ และชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อจึงต้องเสริมแรงด้วยปริมาณผลึกไคตินที่แตกต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Project Title	Mechanical, physical, and biological properties of scaffolds of α -chitin whiskers reinforced hyaluronan-gelatin nanocomposites
Name of the Investigators	Assoc Prof. Pitt Supaphol, Tanom Bunaprasert, Parintorn Hariraksapitak
Year	October 2009

Abstract

Tissue scaffolds made of natural derived polymer present poor mechanical properties which limit their use in regenerating high strength tissues. This study aims to develop a novel tissue scaffold from α -chitin whiskers reinforced hyaluronan-gelatin nanocomposites by the freeze-drying method. Scaffolds were fabricated with six different weight ratios of α -chitin whiskers to the polymer i.e., 0, 2, 5, 10, 20, 30% in order to study their influences on scaffolds' properties. The as-prepared scaffolds exhibited interconnected porous structure with mean diameter of 150 μ m. The α -chitin whiskers were approximately 250 and 30 nm in length and width respectively. At any weight ratio, presenting of α -chitin whiskers did not affect scaffold's internal structure and water absorption capability. On the contrary, 2% of α -chitin whiskers strengthened scaffolds by increasing tensile strength twice comparing with the others. While 20-30% of α -chitin whiskers improved thermal resistance and biodegradation, scaffolds with 10% of α -chitin whiskers could promote proliferation of SaOS-2 cells the best. To enhance mechanical physical or biological properties, scaffolds must be reinforced with distinct weight ratios of the α -chitin whiskers

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ
(Table of Contents)

	หน้า
หน้าปก	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการรูปประกอบ	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การสำรวจแนวความคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	16
เอกสารอ้างอิง	37



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

(List of Tables)

ตารางที่ 1	ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้เตรียมสารละลายวัสดุประกอบประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคติน	10
ตารางที่ 2	ขนาดของรูพรุนภายในโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟาวัดจากชั้นตัวอย่างตัดตามแนวขวางและแนวตั้ง	21
ตารางที่ 3	กลสมบัติของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา	22
ตารางที่ 4	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) ณ จุดที่น้ำหนักของตัวอย่างลดลง 5, 25 และ 50% และกากที่เหลืออยู่ภายหลังจากเผาที่อุณหภูมิ 550°C	29
ตารางที่ 5	การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เปรียบเทียบระหว่างวัสดุเลี้ยงเซลล์ SaOS-2 สามชนิด	32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

(List of Figures)

ภาพที่ 1	โครงสร้างเคมีของไฮยาโรโรแนน	3
ภาพที่ 2	โครงสร้างเคมีของเจลาติน	4
ภาพที่ 3	กระบวนการสกัดเจลาตินจากคอลลาเจน	5
ภาพที่ 4	โครงสร้างเคมีของไคติน	6
ภาพที่ 5	โครงสร้างของผลึกอัลฟาไคติน	6
ภาพที่ 6	ผลึกไคตินที่สกัดได้ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	16
ภาพที่ 7	อีทีแกรมแสดงการกระจายของความยาวของผลึกไคติน	17
ภาพที่ 8	อีทีแกรมแสดงการกระจายของความกว้างของผลึกไคติน	17
ภาพที่ 9	โครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา	18
ภาพที่ 10-1	โครงสร้างและสัณฐานวิทยาของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟาตัดตามแนวขวาง (1,3,5) และแนวดิ่ง (2,4,6): (1,2) ผลึกไคติน 0% (3,4) ผลึกไคติน 2% (5,6) ผลึกไคติน 5% ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	19
ภาพที่ 10-2	โครงสร้างและสัณฐานวิทยาของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟาตัดตามแนวขวาง (7,9,11) และแนวดิ่ง (8,10,12): (7,8) ผลึกไคติน 10% (9,10) ผลึกไคติน 20% (11,12) ผลึกไคติน 30% ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	20
ภาพที่ 11	อัตราการดูดซึมน้ำที่อุณหภูมิห้องของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา	24
ภาพที่ 12	น้ำหนักที่เหลือของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา ภายหลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และคอลลาจีเนสที่สภาวะต่างๆ นาน 24 ชม.	25
ภาพที่ 13	อินฟราเรดสเปคตรัมของเจลาติน ไฮยาโรโรแนน ผลึกไคติน และวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา	27

ภาพที่ 14	แผนภูมิแสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก (%) ของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา ที่อุณหภูมิ 30-60 ^o ซ ในอัตรา 10 ^o ซ/นาที่ ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (TGA Curve)	29
ภาพที่ 15	แผนภูมิแสดงการเปลี่ยนแปลงความร้อนของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา ที่อุณหภูมิ 25-60 ^o ซ ในอัตรา 10 ^o ซ/นาที่ ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (DSC Curve)	31
ภาพที่ 16	การยึดเกาะของเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 บนโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา 30% หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม. ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	33
ภาพที่ 17	การยึดเกาะของเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 บนโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา 30% หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม. ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	34
ภาพที่ 18	การดูดกลืนคลื่นที่ 570 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 บนโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา	35

บทนำ (Introduction)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เป็นแนวทางในการรักษาความพิการอันเนื่องมาจากการสูญเสียเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ ด้วยการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทนเนื้อเยื่อเก่าที่มีความบกพร่อง [1] ซึ่งมีแนวโน้มที่จะแทนที่การรักษาด้วยวิธีปลูกถ่ายอวัยวะบริจาคหรืออวัยวะเทียมในอนาคต วิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถแก้ไขปัญหาค่าความขาดแคลนอวัยวะบริจาค การปฏิเสธอวัยวะปลูกถ่ายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมถึงการผ่าตัดซ้ำซ้อน จึงได้รับความสนใจและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่มิถุนายน ค.ศ. 1990

การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ตามแนวทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อาศัยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการให้เจริญเติบโตในโครงเนื้อเยื่อ (scaffold) แล้วจึงนำโครงเนื้อเยื่อนั้นไปปลูกถ่ายในตำแหน่งที่ต้องการ หรือใช้วิธีฝังโครงเนื้อเยื่อลงในตำแหน่งที่ต้องการโดยตรง และอาศัยคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อเหนียวและกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อภายในโครงเนื้อเยื่อนั้น [2, 3] โครงเนื้อเยื่อจึงทำหน้าที่เสมือนเป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ตลอดช่วงระยะเวลาของการซ่อมสร้างเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเสื่อมสลาย (degrade) ไปตามกลไกภายในร่างกายด้วยเงื่อนไขที่สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นแทนที่ [4, 5]

โครงเนื้อเยื่อที่ดีจึงควรจำลองสภาพของเมทริกซ์นอกเซลล์ด้วยคุณสมบัติด้านต่างๆที่ใกล้เคียงกัน ทั้งการทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้เซลล์ได้เกาะยึด การชักนำให้เกิดการตอบสนองของชีวกลไกที่เอื้อต่อการสร้างเนื้อเยื่อ มีกลสมบัติที่เพียงพอต่อการรองรับแรงที่เกิดจากน้ำหนักและการทำงานของเนื้อเยื่อ และมีความเข้ากันได้ (compatibility) กับเนื้อเยื่อนั้นๆ ดังนั้นการเลือกชนิดของวัสดุที่ใช้สร้างโครงเนื้อเยื่อจึงต้องมีความจำเพาะและเหมาะสมกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

งานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาถึงความเหมาะสมในคุณสมบัติของโพลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น โพลีไกลโคลิค (Polyglycolic) โพลีแลคติก (Polylactic) โพลีแลคติก-ไกลโคลิค (Polylactic-glycolic) และคุณสมบัติของโพลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น ไคโตซาน (Chitosan) คอลลาเจน (Collagen) เจลลาติน (Gellatin) สำหรับสร้างเป็นโครงเนื้อเยื่อ โพลิเมอร์สังเคราะห์มีจุดเด่นในคุณสมบัติและเคมีที่สามารถควบคุมได้ ทั้งกลสมบัติ มวลโมเลกุล โครงสร้างของกลุ่ม (block structure) อัตราการเสื่อมสลาย และวิธีการเชื่อมประสาน [6, 7] แต่มีจุดด้อยตรงที่พื้นผิววัสดุส่วนใหญ่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ขาดองค์ประกอบที่มีส่วนชักนำการตอบสนองของชีวกลไกของเซลล์ และอาจเหลือสิ่งเป็นพิษตกค้างหลังจากสลายตัว

ในขณะที่โพลิเมอร์ธรรมชาติมีจุดเด่นในความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) และเสื่อมสลายได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable) โดยไม่มีสิ่งเป็นพิษตกค้าง มีความชอบน้ำ (hydrophilic) และโครงสร้างบางอย่างมีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของเมทริกซ์นอกเซลล์ จึงจำลองสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ได้คล้ายคลึงธรรมชาติมากกว่าโพลิเมอร์สังเคราะห์ ส่งผลให้เซลล์มีกิจกรรมและเจริญเติบโตได้ดี [8, 9] แต่โพลิเมอร์ธรรมชาติมีคุณสมบัติที่ต่ำกว่าโพลิเมอร์สังเคราะห์ [6] จึงเป็นตัวเลือกที่ด้อยกว่าหากต้องการโครงเนื้อเยื่อที่มีความแข็งแรงสูง เช่นในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก เป็นต้น

เพื่อให้ได้โครงเนื้อเยื่อซึ่งผลิตจากโพลิเมอร์ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเปรียบพร้อมสมบูรณ์ การปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อจึงเป็นโจทย์ที่ยังต้องการคำตอบ ซึ่งงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาถึงวิธีการปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อในหลากหลายวิธี ได้แก่ ปรับปรุงการเชื่อมประสาน (crosslink) [10-13] การทำเป็นโพลิเมอร์ผสม (polymer blend) [14, 15] และการดัดแปลงโครงสร้างของวัสดุด้วยปฏิกิริยาเคมี [16, 17] เป็นต้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการผลิตโครงเนื้อเยื่อชนิดใหม่จากโพลิเมอร์ธรรมชาติ และศึกษาคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตขึ้น โดยเลือกวัสดุชนิดโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และโปรตีนซึ่งได้แก่ไฮยาลูโรแนนและเจลาตินตามลำดับ สร้างเป็นวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกอัลฟาไคตินที่มีขนาดระดับนาโนเมตร (ผลึกนาโนของอัลฟาไคติน) โครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบที่ผลิตขึ้นนี้คาดว่าจะแสดงคุณสมบัติเด่นของวัสดุที่เป็นองค์ประกอบแต่ละชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งชีวสมบัติที่ดีของไฮยาลูโรแนนและเจลาติน และกลสมบัติจากการเสริมแรงด้วยผลึกไคติน ซึ่งผลการศึกษาคือจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับต่อยอดการพัฒนาโครงเนื้อเยื่อชนิดนี้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

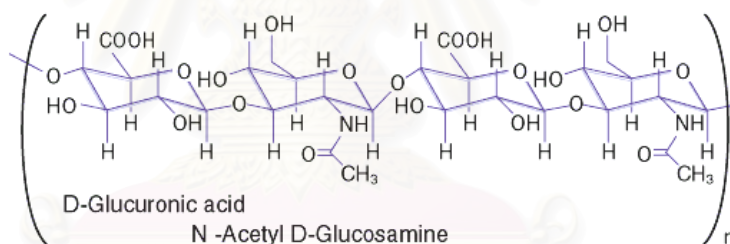
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ ครอบคลุมถึงธรรมชาติและคุณสมบัติของวัสดุตั้งต้น ได้แก่ ไฮยารูโรแนน เจลาติน และโคติน และการผลิตโครงเนื้อเยื่อจากวัสดุทั้งสามชนิด

ธรรมชาติและคุณสมบัติของวัสดุตั้งต้น

1. ไฮยารูโรแนน

ไฮยารูโรแนนเป็นโพลีเมอร์ประเภทโพลีแซคคาไรด์ มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (linear) หน่วยย่อยเป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharide) ซึ่งประกอบด้วย N-acetyl-D-glucosamine เชื่อมต่อกับ D-glucuronic acid ด้วยพันธะ β 1-4 glycosidic โดยแต่ละหน่วยย่อยไดแซคคาไรด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1-3 เกิดเป็นสายโพลีเมอร์มวลโมเลกุลสูง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างเคมีของไฮยารูโรแนน [18]

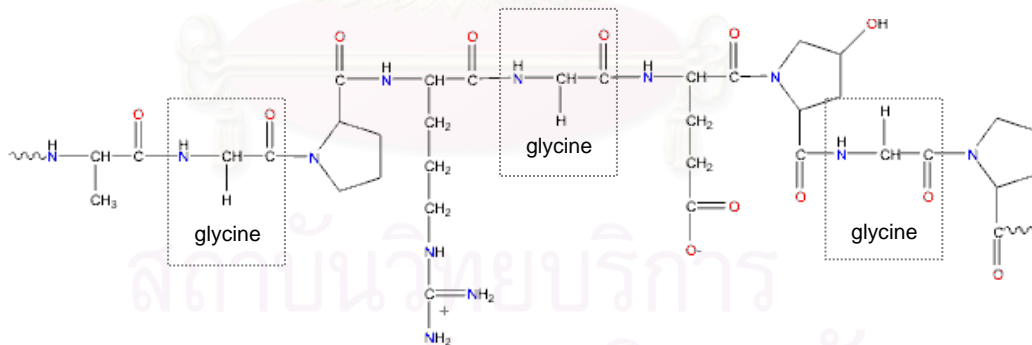
ไฮยารูโรแนนเป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติที่พบได้ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เป็นองค์ประกอบหนึ่งในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue polysaccharide) ซึ่งอาจเรียกเป็นมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) หรือไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) พบได้มากในเมทริกซ์นอกเซลล์โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมต่างๆของเซลล์ ได้แก่ เป็นโครงสร้างพวงเซลล์ ควบคุมการเกาะยึด การเจริญเติบโต การเปลี่ยนชนิด (differentiation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนเชื่อมโยง (binding protein) โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) [19] และชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น ปัจจัยควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth factors) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่นบริเวณข้อต่อกระดูกอีกด้วย [8, 9]

จุดเด่นของไฮยารูโรแนนจึงอยู่ที่ชีวสมบัติ (biological properties) ที่เชื่อมต่อการซ่อมสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ ซึ่งผลทางชีวภาพมีความหลากหลายและเปลี่ยนแปลงไปตามขนาดโมเลกุลของไฮยารู

โรแนน [20] ไฮยารูโรแนนมวลงโมเลกุลสูงมีบทบาทมากในระยะแรกของกระบวนการหายของแผล โดยเป็นส่วนหนึ่งในการสร้างลิมเลือด และยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันเพื่อเอื้อต่อการทำหน้าที่ของเซลล์อักเสบ ขณะที่ไฮยารูโรแนนมวลงต่ำมีบทบาทในระยะถัดไป โดยชักนำการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณแผลของ เซลล์ผนังหลอดเลือด (Endothelium) เพื่อสร้างหลอดเลือดใหม่ ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการส่งผ่าน สัญญาณเพื่อการตอบสนองของชีวกลไก กระตุ้นการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของไฟโบรบลาสต์ และการสร้างเส้นใยคอลลาเจน [20] ไฮยารูโรแนนจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตวัสดุทางการแพทย์ ซึ่งในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ของไฮยารูโรแนนวางจำหน่ายในท้องตลาดมากกว่า 15 บริษัท โดยเป็น ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับกระดูกและกระดูกอ่อน เวชภัณฑ์ยาเวชภัณฑ์เกี่ยวกับสายตา และเครื่องสำอางค์ [16]

2. เจลาติน

เจลาตินเป็นวัสดุประเภทโปรตีน เป็นส่วนผสมของโพลิโกลูตาไมด์หรือโพลีเปปไทด์สาย เดี่ยว (Single stranded polypeptides) และโพลิโกลูตาไมด์หลายสายหรือโพลีเปปไทด์หลายสาย (Multiple stranded polypeptides) แต่ละสายประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 300-4,000 หน่วย ซึ่งมี โกลซีน (glycine) โพรลีน (proline) และ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน (4-hydroxyproline) จำนวนมาก โครงสร้างเคมี โดยทั่วไปเป็น *Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-* โดยมีปริมาณโกลซีนมากถึง 1 ใน 3 และ จัดเรียงตัวที่ทุกๆตำแหน่งที่ 3 บนสายโพลีเปปไทด์ (ภาพที่ 2)

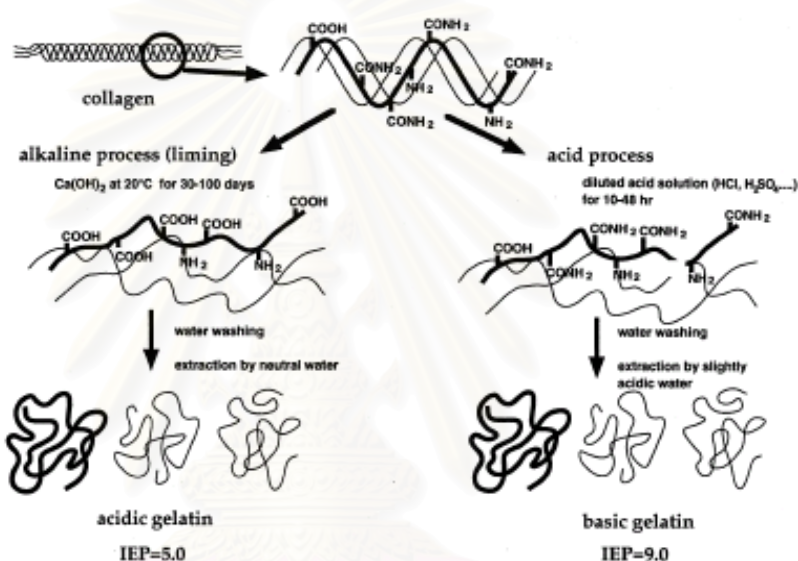


ภาพที่ 2 โครงสร้างเคมีของเจลาติน [21]

โดยทั่วไปเจลาตินเป็นผลผลิตปลายทางของคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) จาก ผิวหนังและกระดูก ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสายโพลีเปปไทด์พันเกลียวสามสาย (triple helix) คุณสมบัติของเจลาตินจึงขึ้นอยู่กับกรรมวิธีที่เลือกใช้ในการผลิต ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 วิธีตามวิธีการจัดการคอลลาเจน [22] (ภาพที่ 3) วิธีที่หนึ่งเป็นการจัดการด้วยเบส (alkaline process, liming) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์กลุ่มเอไมด์ (amide group) ของแอสปาราจีน (asparagines) และกลูตามีน (glutamine) ในคอลลาเจนให้เป็นกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl group) และปรับเปลี่ยนเป็นแอสปาทาเต (aspartate) และกลูตาเมต (glutamate) ในที่สุด

การเปลี่ยนแปลงที่กลุ่มคาร์บอกซิลทำให้เจลาตินชนิดนี้มีประจุโดยรวมเป็นลบ และมีจุดไอโซอิเล็กตริกต่ำ อยู่ที่ค่าประมาณ 3-5 เจลาตินชนิดนี้เรียกเป็นเจลาตินชนิดกรด หรือ ชนิดบี (acidic gelatin, type B)

อีกวิธีหนึ่งเป็นการจัดการคอลลาเจนด้วยกรด (acidic process) กลไกที่เกิดขึ้นจึงตรงกันข้ามกับวิธีที่หนึ่ง ซึ่งจะเกิดการไฮโดรไลซ์ที่กลุ่มเอไมด์น้อยมาก ทำให้เจลาตินชนิดนี้มีประจุโดยรวมเป็นบวก และมีจุดไอโซอิเล็กตริกใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่ค่าประมาณ 7-9 เจลาตินชนิดนี้เรียกเป็นเจลาตินชนิดเบส หรือ ชนิดเอ (basic gelatin, type A)

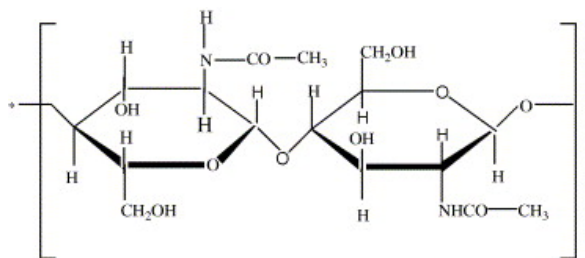


ภาพที่ 3 กระบวนการสกัดเจลาตินจากคอลลาเจน [23]

เจลาตินมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ทำให้เป็นที่นิยมใช้โดยทั่วไปในทางการแพทย์และเภสัชกรรม [23] รวมถึงการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระบบควบคุมการปลดปล่อยยา (drug controlled release) [24-26] และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [11, 27-30]

3. ผลึกไคติน

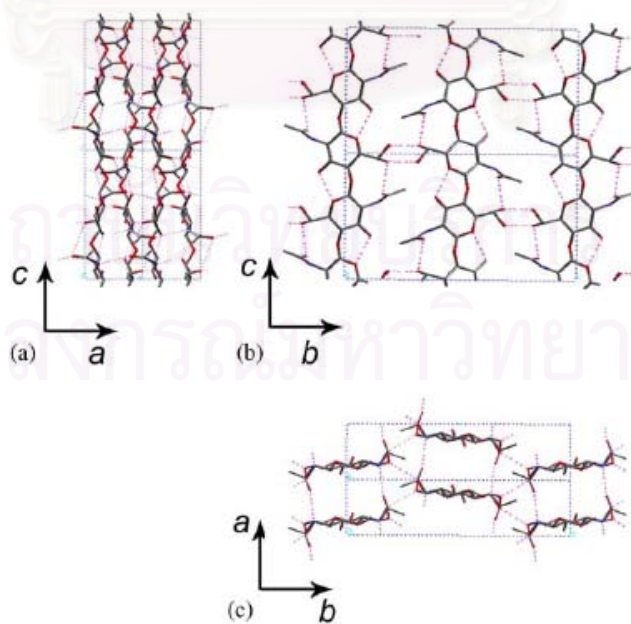
ไคตินเป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติชนิดโพลีแซคคาไรด์เช่นเดียวกับไฮยาลูโรแนน มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเพื่อป้องกันและเสริมความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ผนังเซลล์ของเห็ดราและสาหร่ายบางสายพันธุ์ รวมถึงเปลือกนอกของสัตว์จำพวกกุ้ง ปู และแกนหมึก โครงสร้างของไคตินเป็นโพลีเมอร์ชนิดเส้นตรง มีหน่วยย่อยเป็น N-acetyl-D-glucosamine ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1-4 glycosidic (ภาพที่ 4) โดยทั่วไปมักพบไคตินในรูปของสารประกอบที่ปนอยู่กับสารอื่น เช่น โปรตีน แคลเซียมคาร์บอเนต หรือสารอินทรีย์อื่นๆ



ภาพที่ 4 โครงสร้างเคมีของไคติน [31]

ไคตินมีความเป็นพิษต่ำ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) กับร่างกายมนุษย์ ย่อยสลายได้เองธรรมชาติ (biodegrade) และช่วยเร่งการหายของแผล จึงมีการนำไคตินมาใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์มากมาย เช่น ไหมเย็บแผล วัสดุปิดแผล ตัวควบคุมการปล่อยยา [32] และผิวหนังเทียม รวมถึงใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางค์และสารเติมแต่งในอาหาร

โครงสร้างของผลึกไคติน (Chitin crystal, whisker) (ภาพที่ 5) มีลักษณะเป็นโครงข่ายหนาแน่น เกิดจากสายโซ่โมเลกุลที่ยาวของไคตินเรียงตัวซ้อนทับกันเป็นแผ่น (pleated sheet) ในแลตทิซผลึก (crystal lattice) ของหน่วยเซลล์ และเกิดพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อทั้งภายในและระหว่างสายโซ่โมเลกุล (intramolecular and intermolecular chain) ทำให้มีความแข็งแรงและมีระดับของผลึกสูง (degree of crystallinity) [32] สามารถใช้เป็นสารเติมแต่งเพื่อเสริมแรงให้กับโพลีเมอร์ต่างๆได้ [33-35]



ภาพที่ 5 โครงสร้างของผลึกอัลฟาไคติน (a) แนว ac; (b) แนว bc; (c) แนว ab [32]

การผลิตโครงเนื้อเยื่อจากไฮยาลูโรแนน เจลาติน และโคติน

โครงเนื้อเยื่อที่ดีควรจำลองการทำหน้าที่ของเมทริกซ์นอกเซลล์ได้อย่างไม่บกพร่อง การผลิตโครงเนื้อเยื่อจึงมีเป้าหมายหลักในการสร้างให้เกิดคุณภาพของกลสมบัติ ภายภาพสมบัติ และชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นไปได้ยากที่จะได้มาจากคุณสมบัติของวัสดุชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงลำพัง

ไฮยาลูโรแนนเป็นวัสดุที่มีชีวสมบัติเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากเป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติของเมทริกซ์นอกเซลล์ แต่มีกลสมบัติต่ำ ดูดซึมน้ำสูง ละลายตัวง่าย และคงสภาพอยู่ในเนื้อเยื่อได้เพียงระยะเวลาสั้นๆ จึงยังเป็นปัญหาในการนำไปผลิตเป็นโครงเนื้อเยื่อ งานวิจัยจำนวนมากให้ความสำคัญต่อการดัดแปลงโครงสร้างเคมีและวิธีการเชื่อมประสานไฮยาลูโรแนน เพื่อปรับปรุงกลสมบัติให้ดีขึ้น การศึกษาโดย Luo Y et al. ในปี 2000 [36] ได้ดัดแปลงโครงสร้างของไฮยาลูโรแนนให้เป็นอนุพันธ์ของ adipic dihydrazide และเชื่อมประสานด้วย poly(ethylene glycol)-propiondialdehyde สร้างเป็นเจลที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับควบคุมการปลดปล่อยยา ขณะที่ Liu Y et al. ในปี 2005 [13] ใช้วิธีดัดแปลงโครงสร้างของไฮยาลูโรแนนไปเป็น Thiolated HA และเชื่อมประสานด้วยพันธะ disulfide ทำให้มีความทนทานต่อการเสื่อมสลายได้นานถึง 42 วัน และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ รวมถึงการศึกษาของ Segura T et al. ในปี 2005 [12] ซึ่งสังเคราะห์ biotinylated-hyalurman และเชื่อมประสานด้วย poly(ethylene glycol) diepoxide ได้เป็นไฮโดรเจลที่ใช้เวลาย่อยสลายนานถึง 14 วันด้วยเอนไซม์ hyaluronidase เป็นต้น

ถึงแม้ว่าการดัดแปลงโครงสร้างเคมีของไฮยาลูโรแนนจะให้ผลการศึกษาที่ดี แต่เนื่องจากขั้นตอนยุ่งยาก [12, 13, 36] และไม่มีการศึกษาใดรายงานถึงปริมาณของผลผลิตที่ได้ (yield) การผลิตเป็นสารผสม (blending) ไฮยาลูโรแนนจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจเนื่องจากทำได้ง่าย และน่าจะได้ผลผลิตต่อหน่วยสูงกว่า การศึกษาโดย Park et al. ในปี 2002 [37] ได้สร้างโครงเนื้อเยื่อจากสารผสมคอลลาเจน-ไฮยาลูโรแนนเชื่อมประสานด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) พบว่าโครงเนื้อเยื่อมีความทนทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสสูงถึง 95% เมื่ออ้างอิงจากน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อที่เหลืออยู่ และปราศจากความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่การศึกษาโดย Chang et al. ในปี 2003 [28] ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนเป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ ในโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตจากสารผสมเจลาติน-คอนไดรอิติน (chondroitin)-ไฮยาลูโรแนน เชื่อมประสานด้วย EDC โดยพบว่ามีโครงสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ และคอลลาเจนชนิดที่สอง (type II collagen) โดยที่เซลล์ยังคงสถานะเดิม (phenotype) ผลการศึกษาข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาโดย Liu et al ในปี 2004 [29] ในแผ่นฟิล์มสารผสมไคโตซาน-เจลาติน-ไฮยาลูโรแนน ซึ่งพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมของสารผสมทำให้แผ่นฟิล์มมีความทนทานต่อการย่อยสลาย และส่งเสริมการเกาะยึด การเคลื่อน (migration) และการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast)

การสร้างโครงเนื้อเยื่อจากสารผสมจึงยังคงชีวสมบัติที่ดีของโครงเนื้อเยื่อไว้ได้ ขณะเดียวกันยังเสริมความทนทานต่อการย่อยสลายทางชีวภาพให้ดีขึ้น และเนื่องจากคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตจากสารผสมนั้นแปรไปตามคุณสมบัติของวัสดุตั้งต้น การเพิ่มผลึกไคตินลงในส่วนผสมน่าจะปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อให้ดีขึ้น การศึกษาโดย Paillet & Dufresne ในปี 2001 [33] ถึงคุณสมบัติของนาโนคอมโพสิต ซึ่งเตรียมขึ้นด้วยการผสมสารละลายคอลลอยด์ของผลึกไคตินที่ได้จากการย่อยสลายไคตินจากแกนหมึกด้วยกรด เข้ากับลาเท็กซ์ซึ่งเป็นโคโพลีเมอร์ระหว่าง styrene และ butyl acrylate (poly(S-co-BuA)) พบว่าผลึกไคตินในสัดส่วนน้ำหนักมากกว่าร้อยละ 10 ทำให้ค่าโมดูลัสเฉือน (shear modulus) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature, Tg) ของโพลีเมอร์

การศึกษาโดย Morin & Dufresne ในปี 2002 [34] ให้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยพบว่าผลึกไคตินช่วยเสริมให้ค่าโมดูลัสและเสถียรภาพต่ออุณหภูมิของนาโนคอมโพสิตที่มี Poly(carpolactone) เป็นเมทริกซ์นั้น สูงขึ้นตามสัดส่วนน้ำหนักของผลึกไคตินที่เพิ่มมากขึ้น ผลึกไคตินในสัดส่วนน้ำหนักร้อยละ 2.5 และร้อยละ 10 ทำให้ค่าโมดูลัสเพิ่มขึ้น 0.24 และ 0.61 จิกะปาสคาล ตามลำดับ

ผลการศึกษาโดย Sriupayo J. และคณะในปี 2005 [35] มีส่วนสนับสนุนผลการศึกษาดังกล่าว โดยศึกษาถึงความแข็งแรงดึงของฟิล์มนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและ Poly(vinyl alcohol) ที่เสริมแรงด้วยผลึกไคติน พบว่าความแข็งแรงดึงมีค่าสูงขึ้นจนถึงจุดสูงสุดเมื่อสัดส่วนน้ำหนักของผลึกไคตินมีค่าเพียงร้อยละ 2.96 และยังพบว่าการเสริมแรงช่วยให้ฟิล์มนาโนคอมโพสิตมีความทนทานต่อน้ำมากขึ้น ซึ่งเป็นผลให้การสูญเสียน้ำหนักและอัตราการบวมตัวลดลง มีเสถียรภาพทางมิติมากขึ้น

ผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นถึงความสามารถของผลึกไคตินในการทำหน้าที่เป็นสารเติมแต่ง (filler) ที่เสริมคุณสมบัติของโพลีเมอร์ ซึ่งอาจเป็นผลโดยตรงจากรูปร่างทางเรขาคณิตของผลึก ความแข็งแรงของผลึก และผลจากการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนของผลึกไคตินในเนื้อเมทริกซ์ รวมถึงการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างผลึกเกิดเป็นโครงข่ายที่มีความแข็งแรงสูง ซึ่งสามารถอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติที่เกิดขึ้นได้ด้วย percolation model โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีสัดส่วนน้ำหนักของผลึกไคตินมีค่ามาก [33, 34]

ผลึกไคตินจึงอาจจะเป็นตัวเลือกที่ดีในการเสริมคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตจากสารผสมไฮยาลูโรแนน-เจลาติน การเพิ่มผลึกไคตินทำให้สารผสมกลายเป็นวัสดุประกอบ (composite) งานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะผลิตโครงเนื้อเยื่อจากวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคติน และศึกษาถึงกลสมบัติ กายภาพสมบัติ และชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อที่ได้

วิธีการวิจัย (Procedure)

ขั้นตอนการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัยประกอบด้วย

1. สกัดผลึกไคตินจากผงไคติน
2. เตรียมสารละลายวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคติน
3. ขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อจากสารละลายวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินด้วยการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freezing dry) และการระเหิด (sublimation)
4. ทดสอบกลสมบัติ กายภาพสมบัติ และชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อที่ได้

วิธีการวิจัย

1. สกัดผลึกไคตินจากผงไคติน

- 1.1. เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 N
- 1.2. ต้มผงไคตินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมไว้ ด้วยอัตราส่วน ผงไคติน:กรด เป็น 1 ก. : 30 มล. ที่อุณหภูมิ 120^oซ นาน 6 ชม. โดยปั่นจนตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็ก
- 1.3. แยกสารแขวนลอย (suspension) ของผลึกไคตินที่ลอยตัวอยู่ชั้นบน ออกจากกากไคตินที่ตกตะกอนอยู่ก้นภาชนะ
- 1.4. เจือจางสารแขวนลอย 1.3 ด้วยน้ำกลั่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ นาน 5 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง
- 1.5. บรรจุสารแขวนลอย 1.4 ลงในถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) นำไปแช่ในน้ำสะอาดภายใต้ใต้น้ำไหลนาน 2 ชม. จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นพร้อมกับปั่นจนตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็ก ทั้งวันข้ามคืน
- 1.6. เปลี่ยนน้ำกลั่นในภาชนะวันละครั้งจนกว่าความเป็นกรดของสารแขวนลอยผลึกไคตินมีค่าเป็นกลางเมื่อตรวจด้วยกระดาษลิตมัส จากนั้นเปลี่ยนถ่ายสารแขวนลอยผลึกไคตินลงในภาชนะที่มีฝาปิด
- 1.7. แช่ภาชนะบรรจุสารแขวนลอยผลึกไคตินในเครื่องเย้าอัลตราโซนิก นาน 5 นาที สำหรับสารแขวนลอยทุกๆ 40 มล. นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น
- 1.8. ตรวจสอบลักษณะของผลึกไคตินที่สกัดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM, JEOL JEM-2100) นำภาพที่ได้

ไปหาค่าเฉลี่ยของขนาด และการกระจายตัวของขนาดของผลึกไคตินด้วยโปรแกรม UTHSCSA Image Tool version 3.00 จากจำนวนทั้งหมด 100 ผลึก

- 1.9. หาค่าความเข้มข้นโดยน้ำหนัก (กรัม/มิลลิลิตร) ของสารแขวนลอยผลึกไคติน โดยไปเปิดสารแขวนลอยจำนวน 1 มล. ใส่ไว้ในภาชนะเปิด นำไปวางทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C จนน้ำระเหยออกจนหมด จากนั้นคำนวณหาน้ำหนักของผลึกไคตินที่เหลืออยู่ในภาชนะ

2. เตรียมสารละลายวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคติน

- 2.1. เตรียมสารละลายวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาติน ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่อุณหภูมิ 50°C ดังปริมาณแสดงในตาราง (HA, Gelatin) ปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็กจนได้สารละลายเนื้อเดียว ไม่มีตะกอนและไม่มีฟองอากาศ วางทิ้งไว้จนเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
- 2.2. เติมเกลือ (sodium chloride) ลงในสารละลายวัสดุประกอบ ดังปริมาณแสดงในตาราง (sodium chloride) ปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็กให้เข้ากันจนเกลือละลาย
- 2.3. ในขณะที่ปั่นกวนสารละลาย 2.2 ด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลา เติมสารแขวนลอยผลึกไคตินลงไป ดังปริมาณแสดงในตารางที่ 1 (CW suspension) ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- 2.4. เติมสารเชื่อมประสาน 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide ดังปริมาณแสดงในตาราง (EDC) ปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็กนาน 2 ชม. วางทิ้งไว้จนหมดฟองอากาศ

Sample	HA (gm)	Gel (gm)	NaCl (gm)	CW Suspension (gm)	EDC (gm)	DI water (gm)	Total (gm)
1. HA	0.4	0.4	0.24	0.00	0.192	38.77	40
2. HA+2%CW	0.4	0.4	0.24	1.12	0.192	37.65	40
3. HA+5%CW	0.4	0.4	0.24	2.80	0.192	35.97	40
4. HA+10%CW	0.4	0.4	0.24	5.60	0.192	33.17	40
5. HA+20%CW	0.4	0.4	0.24	11.20	0.192	27.57	40
6. HA+30%CW	0.4	0.4	0.24	16.80	0.192	21.97	40

ตารางที่ 1 ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้เตรียมสารละลายวัสดุประกอบประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคติน

3. **ขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อจากสารละลายวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินด้วยการทำแห้งแบบแช่แข็ง และการระเหิด**

- 3.1. ขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อเป็นแผ่นแบนโดยบรรจุวัสดุประกอบแต่ละกลุ่มปริมาณ 5 ก. ลงในจานเพาะเชื้อก้นแบน กลุ่มละ 1 จาน เอียงจานไปมาโดยรอบ เพื่อให้วัสดุไหลแผ่เป็นแผ่นที่มีความหนาสม่ำเสมอและไม่มีฟองอากาศ
- 3.2. ขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อเป็นก้อนทรงกระบอกโดยบรรจุวัสดุประกอบแต่ละกลุ่มปริมาณ 0.25 ก. ลงในภาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุม โดยไม่ให้มีฟองอากาศ
- 3.3. นำเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -40°C วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) โดยตั้งอุณหภูมิระเหิดที่ -50°C ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย
- 3.4. แกะโครงเนื้อเยื่อที่ได้ออกจากแบบหล่อ เก็บไว้ในภาชนะปิดดูความชื้นตลอดเวลา จนกว่าจะนำไปทดสอบคุณสมบัติ

4. **ทดสอบกลสมบัติ กายภาพสมบัติ และชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อ**

- 4.1. ทดสอบความแข็งแรงดึง (Tensile strength) ค่าโมดูลัสยืดหยุ่น (Modulus of elasticity) และการยืดตัวขณะขาด (Elongation at break) ของโครงเนื้อเยื่อด้วย Universal testing machine (Lloyd UTM model LRX-Plus, UK) โดยตัดแต่งตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อชนิดแผ่นแบนให้มีขนาด $50 \times 5 \times 1$ มม. นำไปตั้งจนขาดในเครื่องทดสอบด้วยน้ำหนัก (Load cell) 10 นิวตัน ระยะเคลื่อนของหัวดึง 10 มม./นาที่ ทดสอบตัวอย่างกลุ่มละ 5 ชิ้น นำค่าที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- 4.2. ทดสอบการดูดซึมน้ำ (Water absorption) โดยเริ่มจากชั่งน้ำหนักโครงเนื้อเยื่อรูปทรงกระบอกในสถานะแห้งสนิท นำไปแช่ในน้ำปราศจากไอออนและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนครบตามเวลาที่กำหนด จากนั้นนำโครงเนื้อเยื่อขึ้นจากน้ำ วางไว้บนแผ่นแก้วที่เอียงทำมุม 45° องศา กับพื้นระนาบนาน 1 นาที เพื่อไล่น้ำส่วนเกินออก แล้วชั่งน้ำหนักในทันที กำหนดเวลาทดสอบที่ 15, 30, 45, 60 นาที 1, 3, และ 6 ชม. ทดสอบตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อกลุ่มละ 5 ชิ้น คำนวณหาอัตราการบวมน้ำจากสมการ

$$\text{อัตราการบวมน้ำ (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักเปียก} - \text{น้ำหนักแห้ง})}{\text{น้ำหนักขณะเปียก}} \times 100$$

นำค่าที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3. ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) ในตัวกลาง 2 ชนิดใน 2 สภาวะ โดย

4.3.1. แช่โครงเนื้อเยื่อรูปทรงกระบอกในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline Solution, PBS) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม.

4.3.2. แช่โครงเนื้อเยื่อรูปทรงกระบอกในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline Solution, PBS) และนำไปแช่ยาที่ความเร็วรอบ 70 รอบ/นาที ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม.

4.3.3. แช่โครงเนื้อเยื่อรูปทรงกระบอกในสารละลายคอลลาจีเนส (Collagenase) ความเข้มข้น 373 นาโนกรัม/มล. [38, 39] นำไปแช่ยาที่ความเร็วรอบ 70 รอบ/นาที ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม.

นำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งนาน 48 ชม. (วิธีเดียวกับ 3.3) ซึ่งน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อในสภาวะแห้งสนิท คำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของน้ำหนักที่เหลืออยู่จากตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อกลุ่มละ 4 ชิ้น

$$\text{น้ำหนักที่เหลือ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังย่อยสลาย} \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนย่อยสลาย}}$$

4.4. ตรวจสอบฐานานวิทยา ความพรุน (porosity) ขนาดของรูพรุน (pore size) และความต่อเนื่องของรูพรุน (interconnectivity) โดยสุ่มเลือกตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อรูปทรงกระบอกกลุ่มละ 1 ชิ้น ตัดกึ่งกลางชิ้นตัวอย่างในแนวระนาบและแนวตั้ง นำไปยัดบนผิวแห่งทองเหลืองทรงกระบอกด้วยกระดาษกาว จากนั้นเคลือบทองที่ผิวตัวอย่างด้วยเครื่อง JEOL JFC-1100 sputtering device นาน 4 นาที แล้วจึงนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (JEOL JSM-5200 Scanning electron microscope, SEM) นำภาพที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Tool (UTHSCSA) version 3.00 เพื่อวัดขนาดของรูพรุน โดยหาค่าเฉลี่ยจากรูพรุนจำนวน 50 ตำแหน่ง/ภาพ/ตัวอย่าง คำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดรูพรุนภายในโครงเนื้อเยื่อทั้งในแนวระนาบและแนวตั้ง

4.5. ตรวจสอบการตอบสนองต่อคลื่นอินฟราเรดของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบ เปรียบเทียบกับไฮยารูโรแนน เจลาติน และผลึกไคติน ด้วย Fourier transformed infrared spectrophotometer (FTIR, Thermo Nicolet Nexus® 670) เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมีของวัสดุประกอบจากวัสดุตั้งต้นแต่ละชนิด โดยสุ่มเลือกตัวอย่าง 1 ชิ้นอย่างอิสระ (random sampling) จากตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ใช้ปริมาณ

ตัวอย่าง 2-5 มก. ผสมกับผงโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) เพื่อบดและอัดเป็นแผ่นตัวอย่างสำหรับตรวจวัด

4.6. ตรวจสอบคุณสมบัติ (Thermal properties) โดยสุ่มเลือกตัวอย่าง 1 ชิ้นอย่างอิสระจากตัวอย่างแต่ละกลุ่ม นำไปหาอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature) ด้วย Differential scanning calorimeter (DSC7, Perkin Elmer) โดยใช้ตัวอย่างปริมาณ 5 มก. อัดในจานอลูมิเนียมแล้วให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 25-80°C ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาที และนำตัวอย่างไปทดสอบหาอุณหภูมิในการสลายตัว (Degradation temperature) และความทนทานต่ออุณหภูมิ (Thermal stability) ด้วย Thermogravimetric Analyzer (TGA7, Perkin Elmer) โดยใช้ตัวอย่างปริมาณ 2 มก. วางบนจานแพลทินัมแล้วเผาที่อุณหภูมิ 30-600°C ด้วยอัตรา 10°C/นาที ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน

4.7. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูก (human osteoblast cytotoxic test) ด้วย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay โดยวิธีอ้อม (indirect technique) เริ่มจากเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก (human osteoblast cell line, SaOS-2) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -minimum essential medium เสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัว (Fetal bovine serum), 1% แอล-กลูตามีน (L-glutamine) และ 1% ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic and antimycotic formulation) ซึ่งประกอบด้วยเพนิซิลลินจีโซเดียม (Penicillin G Sodium) สเตربتโตไมซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate) และ แอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 95% และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C ขยายขอบเขต (passaged) ทุกๆ 3-4 วัน

นำตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อกลุ่มที่ 1 (ไม่มีผลึกโคติน) และกลุ่มที่ 6 (ผลึกโคติน 30%) รูปทรงกระบอกไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (serum-free medium) เสริมด้วย 1% แอล-กลูตามีน และ 1% ยาปฏิชีวนะ ซึ่งประกอบด้วยเพนิซิลลินจีโซเดียม สเตربتโตไมซินซัลเฟต และ แอมโฟเทอริซินบี ปริมาณ 500 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง เป็นเวลา 24 ชม. อาหารเลี้ยงเซลล์นี้ (ซึ่งอาจเรียกว่าเป็น "อาหารปนเปื้อน") จะนำไปทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกมนุษย์

โดยเริ่มจากเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก (SaOS-2) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุมในอัตรา 40,000 เซลล์/หลุม ด้วยอาหารที่มีซีรัม เป็นเวลา 16 ชม. เพื่อให้เซลล์เติบโตและเกาะบนผิวภาชนะเลี้ยง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดปราศจากซีรัม และคงสภาพอดอาหาร (starved) นั้นไว้เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบ

กำหนดเวลาจึงเปลี่ยนอาหารที่ปราศจากซีรัมเป็นอาหารปนเปื้อนที่เตรียมไว้และเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชม. จากนั้นหาจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

วิธีเอ็มทีทีอาศัยการเปลี่ยนเกลือเตตราไซเคเลียมที่มีสีเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานที่มีสีม่วงด้วยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase enzyme) ซึ่งหลังจากไมโตรคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นปริมาณผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เริ่มต้นโดยเปลี่ยนอาหารปนเปื้อนที่ใช้เลี้ยงเซลล์มาแล้ว 24 ชม. ในภาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม เป็นสารละลายเอ็มทีทีที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปอบในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. จากนั้นดูดสารละลายเอ็มทีทีที่ออกและเปลี่ยนเป็นสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) ปริมาณ 1,000 มล. ซึ่งผสมบัฟเฟอร์ไกลซีน (glycine buffer, pH 10) ปริมาณ 100 มล. ต่อ 1 หลุมของภาดเลี้ยงเซลล์ เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน นำภาดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปเขย่าหมุน (Rotary agitation) นาน 10 นาที แล้วจึงนำสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermospectronic Genesis10 UV/Visible Spectrophotometer) คำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่ได้

- 4.8. ทดสอบการเกาะยึด (Attachment) และการเจริญเพิ่มจำนวน (Proliferation) ของเซลล์กระดูก SaOS-2 บนโครงเนื้อเยื่อ เริ่มต้นจากสุ่มเลือกตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อรูปทรงระบอบ จำนวนกลุ่มละ 3 ชิ้น (ยกเว้นตัวอย่างกลุ่มที่ 6, ผลิตภัณฑ์ 30%, จำนวน 5 ชิ้น) นำไปวางในภาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเอทานอล 70% ปริมาณ 1 มล./หลุม เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกำจัดเอทานอลออกแล้วล้างโครงเนื้อเยื่อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ซ้ำ 2 ครั้ง บรรจุเซลล์กระดูก SaOS-2 จำนวน 40,000 เซลล์/ตัวอย่าง ลงบนโครงเนื้อเยื่อโดยตรง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด α -minimum essential medium เสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัว, 1% แอล-กลูตามีน และ 1% ยาปฏิชีวนะ ซึ่งประกอบด้วยเพนนิซิลินจีไซเดียม สเตรปโตไมซินซัลเฟต และ แอมโฟเทอริซินบี ปริมาณ 1.5 มล./หลุม ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 95% และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบกำหนดเวลาที่ 1, 4, 24, 48, และ 72 ชม. แล้วจึงดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างโครงเนื้อเยื่อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง นำโครงเนื้อเยื่อกลุ่มละ 3 ชิ้น ไปหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายในด้วยวิธีเอ็มทีที (วิธีเดียวกับ 4.7) สำหรับ

ตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อกลุ่มที่ 6 ที่เหลืออยู่นั้น ใช้เพื่อสังเกตการเจริญของเซลล์กระดูกบนโครงเนื้อเยื่อโดยตรงหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน 1 และ 7 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด โดยย้อมเซลล์ด้วยการแช่โครงเนื้อเยื่อในสารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ 3 % (3% glutaraldehyde solution) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร/หลุม นาน 30 นาที จากนั้นล้างโครงเนื้อเยื่อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงกำจัดน้ำออกโดยแช่โครงเนื้อเยื่อในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 30, 50, 70, 90, และ 100% ตามลำดับ นาน 2 นาที/ความเข้มข้น วางโครงเนื้อเยื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท นำไปย้อมบนแท่งทองเหลือง และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดเพื่อตรวจสอบสภาพการยึดเกาะของเซลล์ และศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

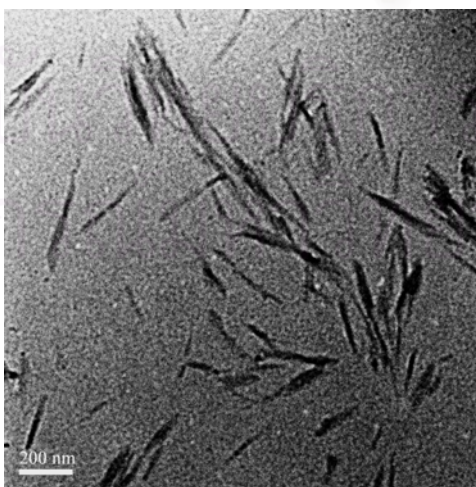
(Result and Discussion)

1. สัณฐานวิทยาและขนาดของผลึกไคติน

ผลึกไคตินที่สกัดได้แสดงคุณสมบัติความเป็นสารแขวนลอยในน้ำ (colloids suspension) เมื่อมองด้วยตาเปล่า ความเป็นคอลลอยด์ของผลึกไคตินเป็นผลจากการผลักรบกวนกันของผลึก โดยภายใต้สภาวะกรดดังเช่นที่ใช้ในกระบวนการสกัดผลึกไคติน จะเกิดกระบวนการรับประจุบวก (protonation) ของกลุ่มอะมิโนในโมเลกุลของไคตินซึ่งประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยชนิด N-acetyl-D-glucosamine ดังสมการ [40]



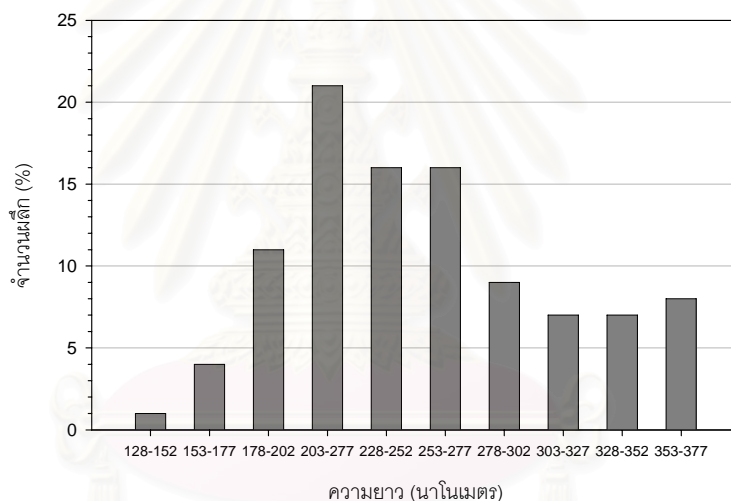
หมู่ฟังก์ชัน NH_3^+ ที่เกิดขึ้น เป็นแหล่งกำเนิดของแรงผลักระหว่างประจุ (electrostatic repulsive force) ซึ่งการศึกษาโดย Revel and Marchessault ในปี 1993 [41] พบว่าเกิดประจุบวกขึ้นภายหลังจากไฮโดรไลซิสด้วยกรดเพียง 15 นาที และโดยที่ผลึกไคตินมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร จึงมีพื้นที่ผิวมากและเป็นผลให้เกิดแรงผลักระหว่างประจุในปริมาณมากตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการรับประจุบวกของกลุ่มอะมิโนอาจจะเกิดขึ้นไม่ทั้งหมด ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนดึงดูดระหว่างผิวผลึกไคตินในบางตำแหน่ง เกิดเป็นกลุ่มผลึกในลักษณะเกาะกลุ่มกันบางส่วน (partial aggregation) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (ภาพที่ 6) จึงแสดงให้เห็นผลึกไคตินรูปร่างเรียวยาวและหัวท้ายแหลม โดยมีทั้งผลึกที่กระจายตัวแยกออกเป็นผลึกเดี่ยว (individual crystallites) และที่เกาะกันเป็นกลุ่มผลึก (crystal bundles)



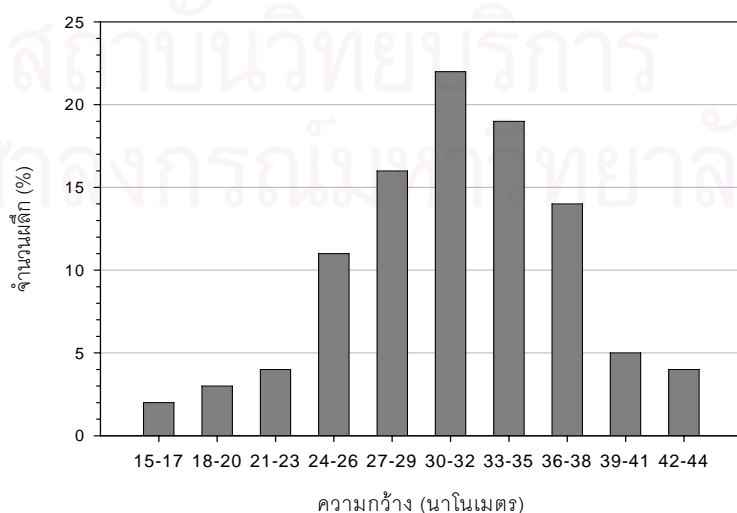
ภาพที่ 6 ผลึกไคตินที่สกัดได้ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

ความเข้มข้นของสารแขวนลอยผลึกไคตินที่วัดได้มีค่าเป็น 1.417% (มวล/ปริมาตร) มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการศึกษาโดย Sriupayo et al. ในปี 2005 (1.48%) [35]

ขนาดของผลึกไคตินที่สกัดได้มีค่าเฉลี่ยความยาวและความกว้างเป็น 255.70 ± 55.77 และ 30.65 ± 5.77 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณค่าอัตราสัดส่วนของความยาวต่อความกว้างโดยเฉลี่ย (aspect ratio, Length/Width) ได้ค่าประมาณ 8 การกระจายตัวของขนาดความยาวและความกว้างของผลึกไคตินแสดงในแผนภูมิฮิสโตแกรม (ภาพที่ 7 และ 8) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ว่า มากกว่าร้อยละ 50 ของผลึกไคตินมีความยาวอยู่ในช่วง 203-277 นาโนเมตร และมีความกว้างอยู่ในช่วง 27-35 นาโนเมตร ขนาดของผลึกไคตินในการทดลองนี้มีค่าอยู่ในช่วงของขนาดของผลึกไคตินจากการศึกษาโดย Nair & Dufresne ในปี 2003 [42] (ยาว 100-600 นาโนเมตร, กว้าง 4-40 นาโนเมตร) และ การศึกษาโดย Lu et al. ในปี 2004 [43] (ยาว 100-650 นาโนเมตร, กว้าง 10-80 นาโนเมตร)



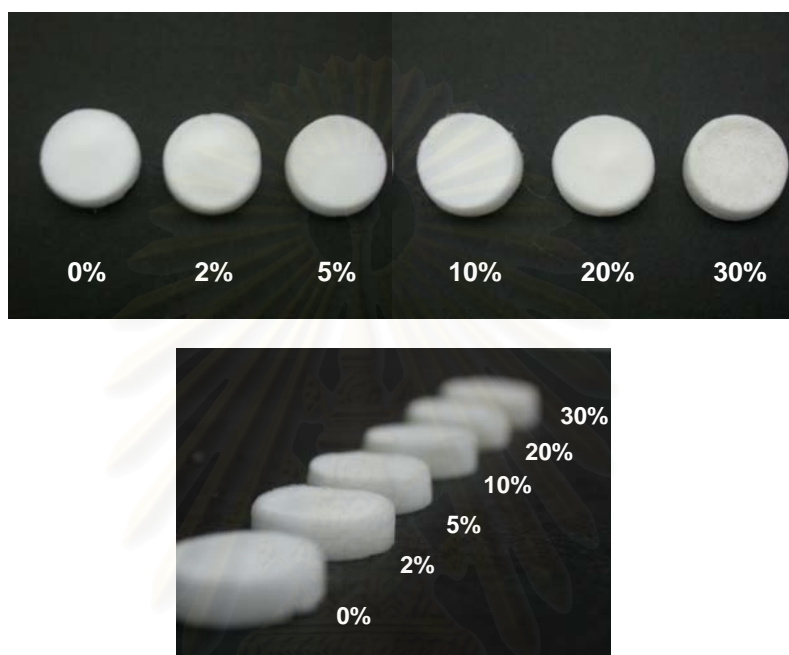
ภาพที่ 7 ฮิสโตแกรมแสดงการกระจายของความยาวของผลึกไคติน



ภาพที่ 8 ฮิสโตแกรมแสดงการกระจายของความกว้างของผลึกไคติน

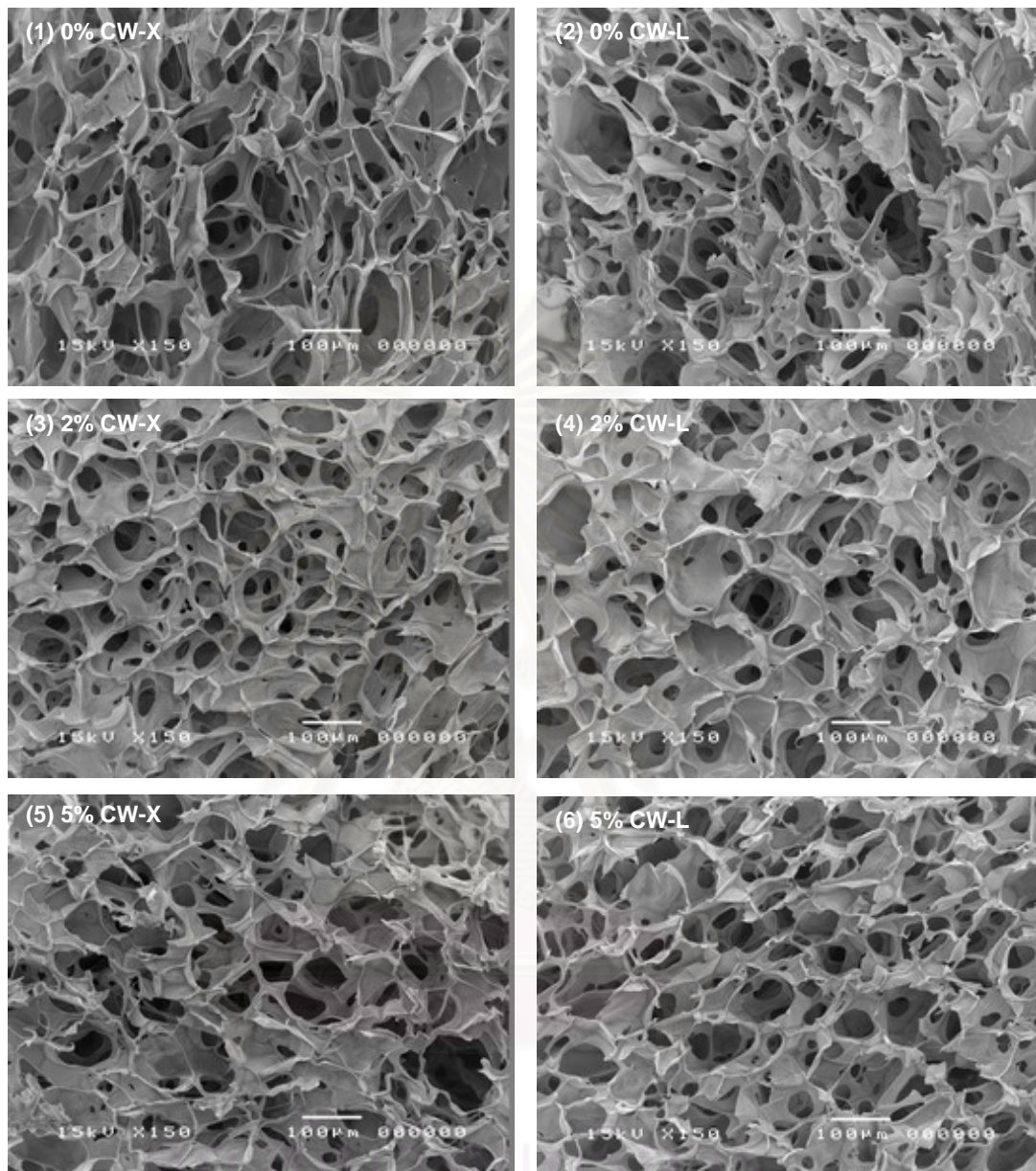
2. โครงสร้างและสัณฐานวิทยาของโครงเนื้อเยื่อ

โครงเนื้อเยื่อที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นก้อนฟองน้ำที่มีรูพรุน น้ำหนักเบา และมีสีเข้มขึ้นตามสัดส่วนที่เพิ่มมากขึ้นของปริมาณผลึกโคติน (ภาพที่ 9)

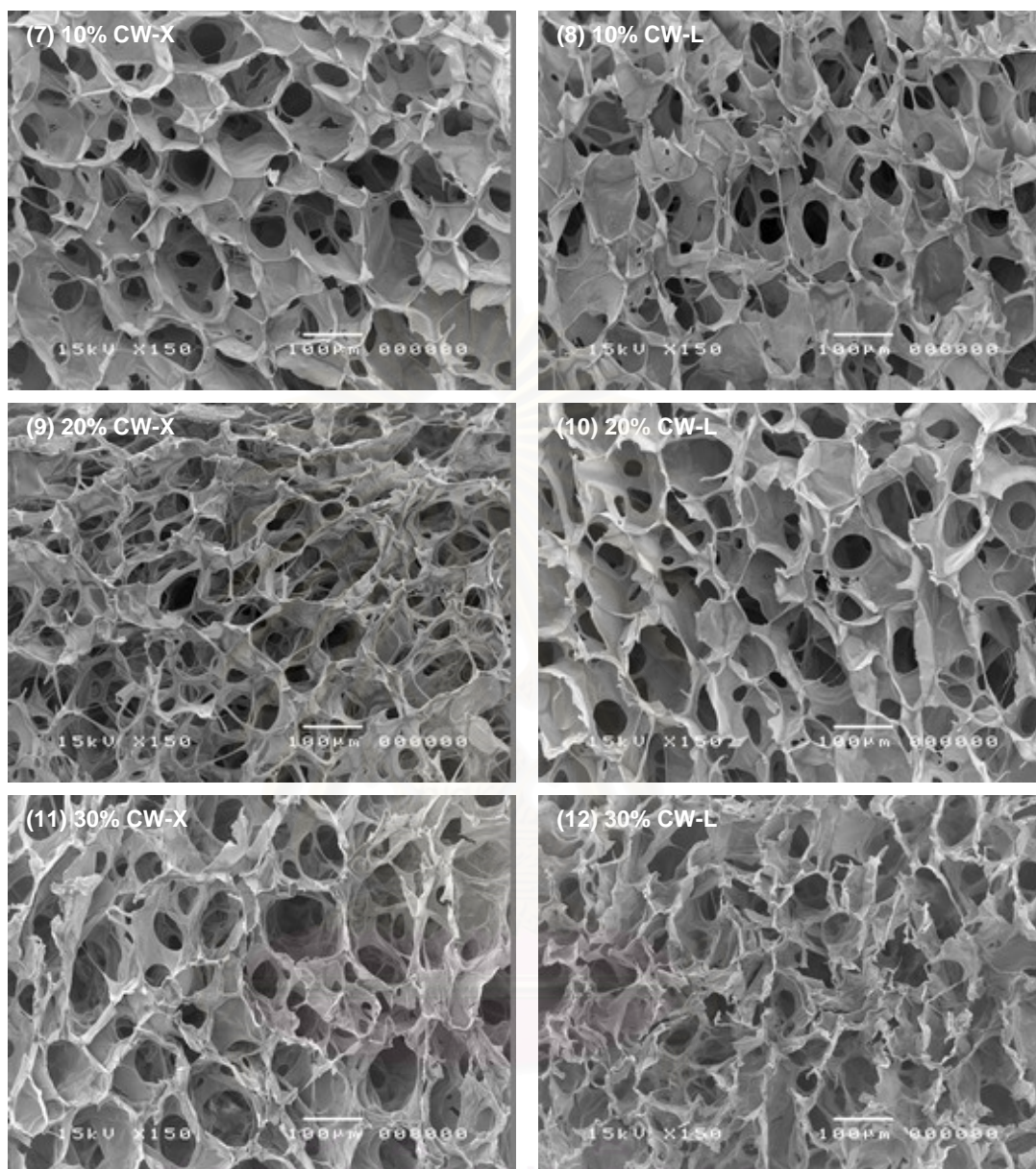


ภาพที่ 9 โครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกโคตินชนิดอัลฟา (ตัวเลขแสดงสัดส่วนน้ำหนักของผลึกโคตินต่อน้ำหนักของวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาติน)

ความพรุนภายในโครงเนื้อเยื่อมีความจำเป็นต่อการส่งผ่านเข้า-ออกของสารอาหาร อากาศ และของเสียจากเซลล์ รวมถึงการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่จำเป็นสำหรับการสร้างเนื้อเยื่อ [44] จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดของโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตได้ (ภาพที่ 10-1,2) โครงสร้างและสัณฐานวิทยาของโครงเนื้อเยื่อในทุกกลุ่มตัวอย่างมีรูพรุนทั่วทั้งชิ้น รูพรุนมีรูปร่างกลมและมีความต่อเนื่องจากชั้นต้นสู่ชั้นที่ลึกกว่า (Interconnectivity) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างสัณฐานวิทยาของชิ้นตัวอย่างที่ตัดตามแนวขวางและตามแนวตั้ง ซึ่งแสดงถึงลักษณะสัณฐานวิทยาที่ดีของโครงเนื้อเยื่อที่เป็นรูปแบบเดียวกันในทุกมิติ [9] แต่จะสังเกตเห็นว่าความสมบูรณ์ของโครงเนื้อเยื่อในกลุ่ม “ผลึกโคติน 30%” ดูด้อยกว่ากลุ่มอื่นเล็กน้อย โดยเฉพาะชิ้นตัวอย่างที่ตัดในแนวตั้งที่ผนังของรูพรุนดูไม่ใคร่ต่อเนื่อง



ภาพที่ 10-1 โครงสร้างและลักษณะวิทยาของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรเนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยเปลือกไคตินชนิดอัลฟาตัดตามแนวขวาง (1,3,5) และแนวตั้ง (2,4,6): (1,2) ผลึกไคติน 0% (3,4) ผลึกไคติน 2% (5,6) ผลึกไคติน 5% ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด



ภาพที่ 10-2 โครงสร้างและสัณฐานวิทยาของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรเจลแนจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟาตัดตามแนวขวาง (7,9,11) และแนวตั้ง (8,10,12): (7,8) ผลึกไคติน 10% (9,10) ผลึกไคติน 20% (11,12) ผลึกไคติน 30% ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ขนาดของรูพรุนของโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตได้แสดงในตารางที่ 2

ตัวอย่าง	ขนาดของรูพรุน (ไมโครเมตร)			
	ชั้นตัวอย่างตัดแนวขวาง		ชั้นตัวอย่างตัดแนวยาว	
	ช่วง (ต่ำสุด-สูงสุด)	ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD)	ช่วง (ต่ำสุด-สูงสุด)	ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD)
ผลึกไคติน 0%	92.34 – 208.76	140.91 \pm 21.82 ^a	112.80 – 231.37	165.76 \pm 27.68 ^{aa}
ผลึกไคติน 2%	114.42 – 181.98	139.38 \pm 16.01 ^b	108.37 – 182.09	145.44 \pm 15.31 ^b
ผลึกไคติน 5%	104.12 – 224.47	153.15 \pm 23.92 ^c	110.59 – 171.08	142.70 \pm 13.84 ^c
ผลึกไคติน 10%	118.01 – 202.32	158.86 \pm 19.08 ^d	104.27 – 205.35	162.76 \pm 23.63 ^d
ผลึกไคติน 20%	113.48 – 200.48	151.44 \pm 19.29 ^e	105.77 – 180.96	143.85 \pm 17.19 ^e
ผลึกไคติน 30%	108.48 – 184.36	155.41 \pm 15.67 ^f	97.22 – 231.27	148.99 \pm 25.09 ^f

ตารางที่ 2 ขนาดของรูพรุนภายในโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟาวัต จากชั้นตัวอย่างตัดตามแนวขวางและแนวตั้ง a,b,c,d,e,f เปรียบเทียบเฉพาะภายในตัวอย่างกลุ่มเดียวกันที่ระดับนัยสำคัญต่ำกว่า 0.05; ทดสอบด้วยสถิติ One Way ANOVA with Tukey HSD, จำนวนข้อมูลเป็น 50.

ขนาดของรูพรุนในทุกกลุ่มตัวอย่างอยู่ในช่วงประมาณ 100-200 ไมโครเมตรทั้งในระนาบนอนและระนาบตั้ง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 150 ไมโครเมตร ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจะพบความเหลื่อมกันของขนาดรูพรุนในทุกกลุ่มตัวอย่าง ขณะเดียวกันสถิติทดสอบแสดงให้เห็นว่ารูพรุนในระนาบนอนมีขนาดไม่แตกต่างจากรูพรุนในระนาบตั้งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกันยกเว้นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณที่เพิ่มขึ้นของผลึกไคตินไม่มีผลต่อขนาดของรูพรุนที่เกิดขึ้นภายในโครงเนื้อเยื่อแต่อย่างใด ด้วยขนาดของรูพรุนที่เล็กกว่า 200 ไมโครเมตร การส่งผ่านของอาหารและอากาศ รวมถึงการเจริญของหลอดเลือดใหม่ภายในโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตขึ้นนี้อาจเป็นไปได้ไปอย่างจำกัด ทำให้เกิดสภาวะออกซิเจนต่ำภายในโครงเนื้อเยื่อซึ่งเหมาะสมกับการเจริญของกระดูกอ่อน (cartilage) มากกว่ากระดูก (bone) [5, 45]

เพื่อให้ได้โครงเนื้อเยื่อที่มีรูพรุนเฉลี่ยขนาดใหญ่กว่า 200 ไมโครเมตร ในขั้นตอนขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อด้วยวิธีแช่เยือกแข็งและการระเหิด จำเป็นต้องลดอัตราการเย็นตัวของสารละลายวัสดุประกอบให้ต่ำกว่าที่กำหนดในการทดลองนี้ ซึ่งการศึกษาโดย Shapiro and Cohen ในปี 1997 [46] ได้อธิบายถึงเหตุผลเกี่ยวกับอัตราการเย็นตัวอย่างรวดเร็ว ว่าเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียความร้อนที่ใช้ในการสร้างผลึกน้ำแข็ง (heat of crystallization) ทำให้เกิดเฉพาะผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กซึ่งจะกลายเป็นรูพรุนขนาดเดียวกันภายหลังจากที่ผลึกน้ำแข็งนั้นระเหิดไป สอดคล้องกับผลการศึกษาโดย Kang et al. ในปี 1999 [47] ในการขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อเจลาตินซึ่งพบว่า อุณหภูมิแช่เยือกแข็งที่ -20°C ทำให้โครงเนื้อเยื่อมี

ขนาดของรูพรุนใหญ่กว่าที่อุณหภูมิ -80°C หรือการแช่เยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว อย่างมีนัยสำคัญ (250, 85 และ 45 ไมโครเมตร ตามลำดับ)

3. กลสมบัติของโครงเนื้อเยื่อ

โครงเนื้อเยื่อที่ดีควรมีความทนทานต่อแรงที่มากระทำ ทั้งในระหว่างกระบวนการซ่อมสร้างเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการและในคลินิก รวมถึงมีความสามารถในการชดเชยกลสมบัติของอวัยวะเพื่อการทำหน้าที่ได้อย่างไม่บกพร่อง ดังเช่นในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเป็นต้น

งานวิจัยนี้ศึกษาการกลสมบัติของโครงเนื้อเยื่อด้วยวิธีการดึงขึ้นตัวอย่างจนขาด ผลการศึกษาแสดงด้วยค่าของความแข็งแรงดึง ค่าโมดูลัสยืดหยุ่น และการยืดตัวขณะขาดในตารางที่ 3

ตัวอย่าง	โมดูลัสยืดหยุ่น (MPa)	การยืดตัวขณะขาด (%)	ความแข็งแรงดึง (MPa)
ผลึกไคติน 0%	00.988 ± 0.099^a	53.476 ± 10.688^a	0.518 ± 0.064^a
ผลึกไคติน 2%	14.096 ± 2.228^b	28.346 ± 6.163^b	1.028 ± 0.089^b
ผลึกไคติน 5%	19.958 ± 3.640^b	06.357 ± 1.418^c	$0.532 \pm 0.153^{a,c}$
ผลึกไคติน 10%	12.456 ± 2.000^b	$11.632 \pm 4.154^{c,d}$	$0.478 \pm 0.190^{a,c}$
ผลึกไคติน 20%	07.103 ± 0.931^c	$16.070 \pm 0.955^{b,d}$	0.465 ± 0.058^a
ผลึกไคติน 30%	11.963 ± 0.472^b	$16.030 \pm 3.396^{b,d}$	0.722 ± 0.081^c

ตารางที่ 3 กลสมบัติของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮดรอกซีอะพาทิต-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา a,b,c,d, เปรียบเทียบเฉพาะภายในกลุ่มตัววัดเดียวกันที่ระดับนัยสำคัญต่ำกว่า 0.05; ทดสอบด้วยสถิติ One Way ANOVA with Dunnett T3, จำนวนตัวอย่างเป็น 5.

เมื่อสัมผัสด้วยมือเปล่า โครงเนื้อเยื่อที่เสริมความแข็งแรงด้วยผลึกไคตินมีความยืดหยุ่นน้อยลงและค่อนข้างแข็งกระด้างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากตารางที่ 3 สถิติทดสอบแสดงให้เห็นถึงค่าโมดูลัสยืดหยุ่นของโครงเนื้อเยื่อที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเสริมความแข็งแรงด้วยผลึกไคตินตั้งแต่ 2 ถึง 30% แต่ปริมาณผลึกไคตินที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อโมดูลัสยืดหยุ่นอย่างไม่แตกต่างกัน เว้นแต่กลุ่มผลึกไคติน 20% ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากลุ่ม 10 และ 30% เล็กน้อย ภาพรวมของค่าโมดูลัสยืดหยุ่นสอดคล้องกับค่าของการยืดตัวขณะขาด โดยพบว่ากลุ่มควบคุมมีการยืดตัวสูงสุดและแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่การยืดตัวขณะขาดของกลุ่มทดลองนั้นมีความคาบเกี่ยวกันและปราศจากแนวโน้มไปตามสัดส่วนปริมาณผลึกไคตินที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้แตกต่างจากค่าความแข็งแรงดึง โครงเนื้อเยื่อที่เสริมแรงด้วยผลึกไคติน 2% มีค่าความแข็งแรงดึงสูงสุดและแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่กลุ่มทดลองอื่นให้ค่าความแข็งแรงดึงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ

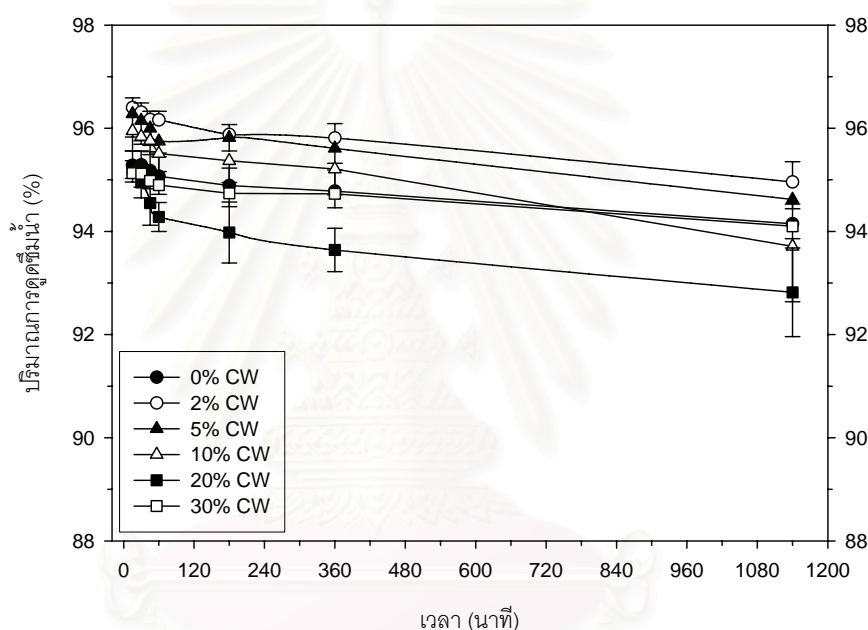
Sriupayo et al. ในปี 2005 [35] ซึ่งพบว่าผลึกไคตินปริมาณ 2.96% ให้ค่าความแข็งแรงสูงสุดในแผ่นฟิล์มวัสดุประกอบไคโตซาน ในขณะที่ ปริมาณ 7.4, 14.8, 22.2 และ 29.6% นั้นทำให้ค่าความแข็งแรงดิ่งลดต่ำลงและแตกต่างกันเองอย่างไม่มีนัยสำคัญ หากเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองในกลุ่มผลึกไคติน 2% กับกลสมบัติโดยเฉลี่ยของกระดูก จะพบว่าค่าโมดูลัสยืดหยุ่นของโครงเนื้อเยื่อต่ำกว่าของกระดูกถึงประมาณ 1,000 เท่า (16.4 จิกะปาสคาล) ขณะที่ความแข็งแรงดิ่งมีค่าต่ำกว่าถึง 100 เท่า (117.4 เมกะปาสคาล) [48] แสดงให้เห็นถึงจุดด้อยในกลสมบัติของโครงเนื้อเยื่อที่ผลิตจากโพลีเมอร์ธรรมชาติ [6]

ผลการทดลองถึงกลสมบัตินี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมแรงด้วยผลึกไคตินเพียง 2% ให้ผลที่ชัดเจนในการลดความยืดหยุ่น และเพิ่มความแข็งแรงดิ่งของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินอย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มสัดส่วนของปริมาณผลึกไคตินให้สูงขึ้นถึง 30% ไม่ช่วยให้กลสมบัติของโครงเนื้อเยื่อดีขึ้นแต่อย่างใด ถึงแม้ว่าค่าของกลสมบัติที่วัดได้นั้นเป็นผลร่วมกันจากสองปัจจัยภายในโครงเนื้อเยื่อ ซึ่งได้แก่กลสมบัติของตัวเนื้อวัสดุประกอบเองและความพูนภายในชั้นตัวอย่าง แต่จากการศึกษาถึงสัญญาณวิทยาและความพูนของโครงเนื้อเยื่อที่ไม่พบความแตกต่างกันในทุกกลุ่มควบคุม ค่าของกลสมบัติที่วัดได้จึงน่าจะสะท้อนมาจากกลสมบัติของวัสดุประกอบโดยตรง และใช้เป็นตัวแทนของกลสมบัติโครงเนื้อเยื่อได้ อย่างไรก็ตามอาจพบความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองบ้างสำหรับค่าโมดูลัสยืดหยุ่นในกลุ่มผลึกไคติน 20% และค่าการยืดตัวขณะขาดในกลุ่มผลึกไคติน 5% ซึ่งแสดงค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม

4. การดูดซึมน้ำและการย่อยสลายทางชีวภาพ

ภาพที่ 11 แสดงอัตราการดูดซึมน้ำของโครงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่เวลา 15 นาทีจนถึง 24 ชั่วโมง พบว่าทุกกลุ่มตัวอย่างมีการดูดซึมน้ำค่อนข้างใกล้เคียงกันใน 60 นาทีแรก โดยเป็นสัดส่วนมากกว่า 95% ของน้ำหนักทั้งหมดของโครงเนื้อเยื่อที่ดูดซึมน้ำเอาไว้ซึ่งเป็นค่าที่สูงมาก เทียบได้กับการดูดซึมน้ำของวัสดุประเภทซิมซับพิเศษ (superabsorbent) [49] ซึ่งปริมาณการดูดซึมน้ำในการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Park et al. ในปี 2002 [37] ในโครงเนื้อเยื่อรูปฟองน้ำชนิดคอลลาเจนผสมไฮยาลูโรแนน การดูดซึมน้ำในปริมาณมากเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวจากความเข้ากันได้ดีกับน้ำ (hydrophilicity) ของวัสดุประเภทไฮโดรเจลเช่น ไฮยาลูโรแนน เจลาติน หรืออัลจินต [7] ซึ่งเป็นประโยชน์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจากการเป็นสภาพแวดล้อมชุ่มน้ำที่ช่วยปกป้องเซลล์และสารผลิตจากเซลล์เช่น ดีเอ็นเอ หรือ เปปไทด์ (peptide) รวมถึงเป็นเส้นทางลำเลียงแลกเปลี่ยนสารอาหารและผลผลิตต่างๆเข้าและออกจากเซลล์ [31]

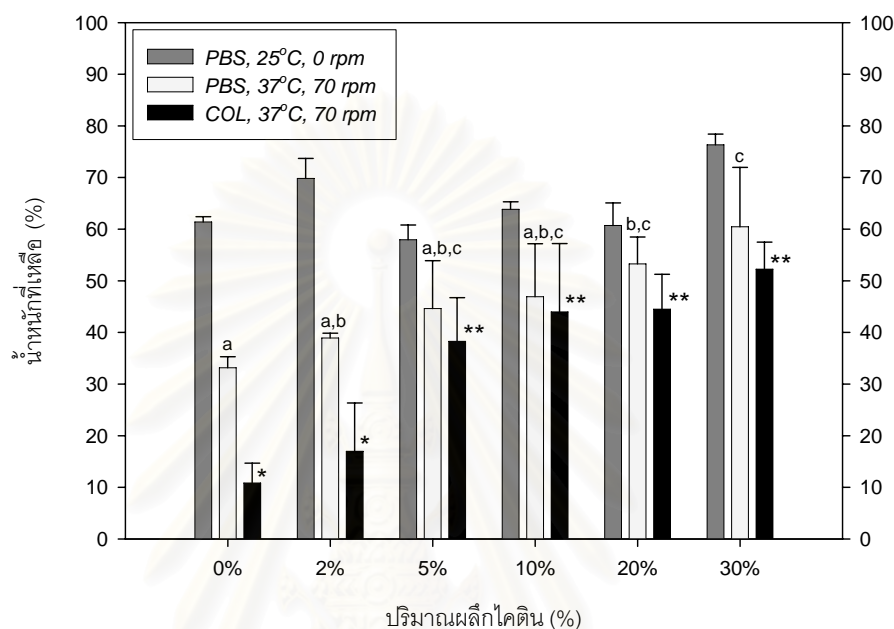
จากผลการทดลอง (ภาพที่ 11) ที่แสดงถึงการดูดซึมน้ำในปริมาณใกล้เคียงกันของโครงเนื้อเยื่อในทุกกลุ่มตัวอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใน 60 นาทีแรก รวมถึงการลดลงของปริมาณการดูดซึมน้ำที่มีแนวโน้มในลักษณะเดียวกันเมื่อเวลาผ่านไป การเสริมแรงด้วยผลึกไคตินจึงมีผลกระทบต่อ การดูดซึมน้ำของโครงเนื้อเยื่อน้อยมาก อาจเป็นเพราะสัณฐานวิทยาของโครงเนื้อเยื่อที่มีรูพรุนต่อเนื่องตลอดทั่วทั้งชิ้นในตัวอย่างทุกกลุ่มนั้น ช่วยให้เกิดพฤติกรรมแคปิลลารี (capillary reaction) ดูดน้ำผ่านรูพรุนจนเต็มโครงเนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว [49] ทำให้โครงเนื้อเยื่อมีการดูดซึมน้ำในปริมาณมากด้วยอัตราเร็วสูง ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณการดูดซึมน้ำอยู่ที่จุดสูงสุดภายในเวลา 15 นาทีแรก



ภาพที่ 11 อัตราการดูดซึมน้ำที่อุณหภูมิห้องของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา

การดูดซึมน้ำในปริมาณสูงทำให้โครงเนื้อเยื่อมีจุดด้อยในเรื่องของกลสมบัติ [31] และอาจย่อยสลายได้โดยง่าย การย่อยสลายของไฮโดรเจลเกิดขึ้นได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) การละลาย (dissolution) และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (enzymatic cleavage) [7] การทดลองนี้ศึกษาการย่อยสลายของโครงเนื้อเยื่อที่เวลา 24 ชม. ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ในสภาวะนิ่ง และ อุณหภูมิ 37°C ภายใต้การเขย่าด้วยความเร็วรอบ 70 รอบ/นาที เพื่อสังเกตการย่อยสลายจากกระบวนการไฮโดรไลซิสซึ่งอาจเกิดร่วมกับการละลาย และศึกษาการย่อยสลายในเอ็นไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ที่ความเข้มข้น 373 นาโนกรัม/มล. ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่พบในน้ำไขข้อ (synovial fluid) ของผู้ป่วยโรคไขข้อกระดูกอักเสบ (osteoarthritis) [38, 39] โดยศึกษาที่

อุณหภูมิ 37°C ภายใต้การเขย่าด้วยความเร็วรอบ 70 รอบ/นาที ผลการศึกษาแสดงโดยน้ำหนัที่ลดลงของโครงเนื้อเยื่อในสภาวะที่แห้งสนิท (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 12 น้ำหนักที่เหลือของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกโคตินชนิดอัลฟา ภายใต้การแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และคอลลาเจเนสที่สภาวะต่าง ๆ นาน 24 ชม. a,b,c,* เปรียบเทียบที่ระดับนัยสำคัญต่ำกว่า 0.05; ทดสอบด้วยสถิติ One Way ANOVA with Tukey HSD, จำนวนตัวอย่างเป็น 4.

๑-

จากภาพที่ 12 การแช่โครงเนื้อเยื่อในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียง 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องทำให้น้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อลดลงเหลือ 58-76% ของน้ำหนักเริ่มต้น โดยไม่พบแนวโน้มที่สัมพันธ์กับปริมาณโคตินที่เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมของการดูดซึมน้ำของโครงเนื้อเยื่อ การย่อยสลายโครงเนื้อเยื่อโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสและ/หรือการละลายโดยปราศจากเอ็นไซม์จึงเริ่มต้นตั้งแต่วันที่ 24 ชั่วโมงแรก

ผลดังกล่าวแตกต่างจากการทดลองย่อยสลายโครงเนื้อเยื่อในสภาพเลียนแบบสภาวะร่างกายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสร่วมกับการเขย่าที่ความเร็วรอบ 70 รอบ/นาที อุณหภูมิที่สูงขึ้นและการขยับเคลื่อน ทำให้น้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกโคตินเท่ากัน ทั้งนี้อาจเกิดการย่อยสลายโมเลกุลไฮยาลูโรแนนด้วยความร้อน (Thermal degradation) [50] ร่วมด้วย ทำให้น้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อลดลงเหลือ 33-60% ของน้ำหนักเริ่มต้น การเสริมแรงด้วยปริมาณผลึกโคติน 20-30% เป็นผลให้โครงเนื้อเยื่อทนต่อการย่อยสลายในสภาวะนี้ได้

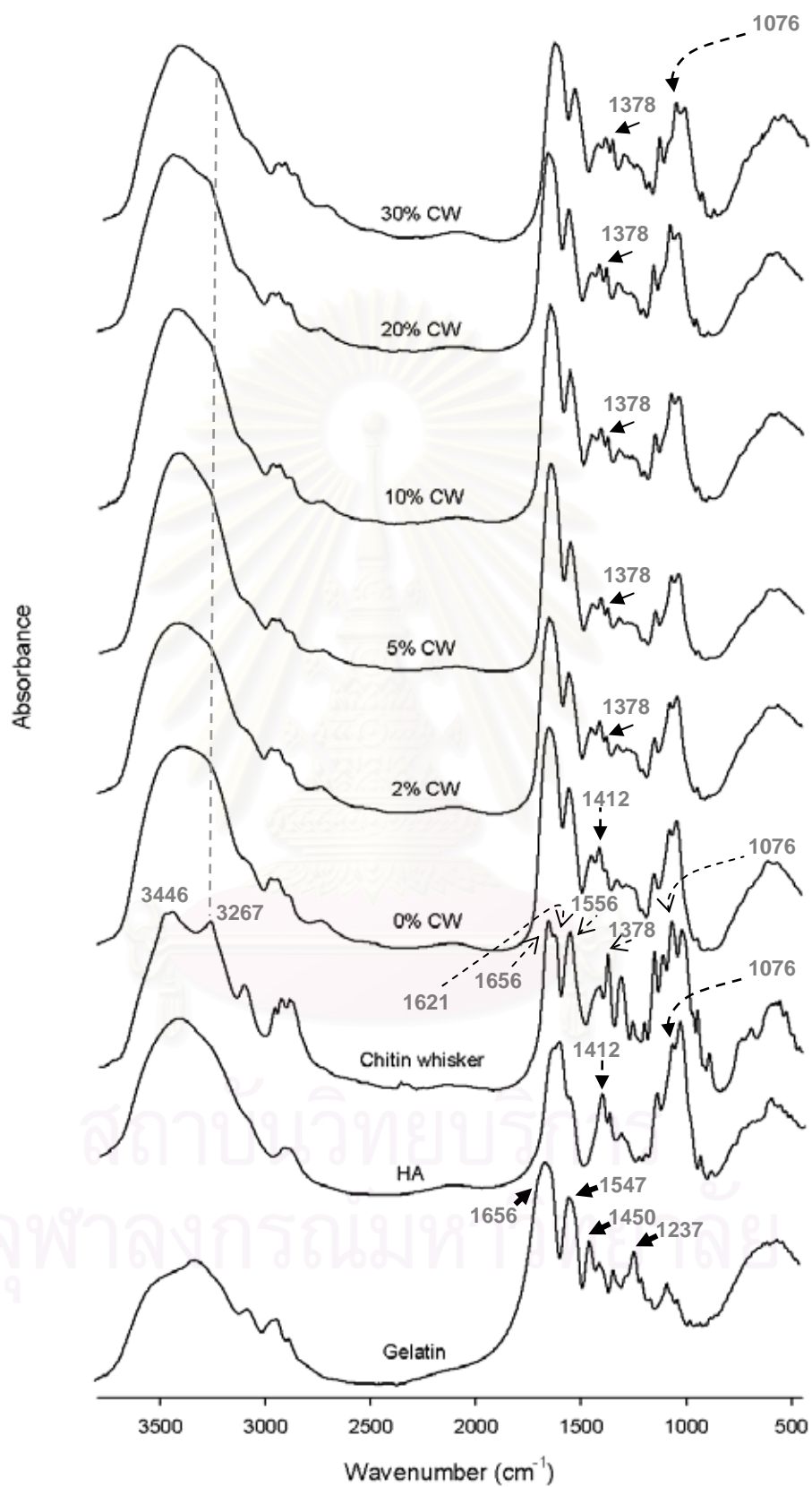
มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ถึงแม้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักที่เหลืออยู่จะแสดงให้เห็นแนวโน้มที่ลดลงของการย่อยสลายเมื่อปริมาณผลึกไคตินเพิ่มขึ้น แต่สถิติทดสอบบ่งชี้ว่าปริมาณผลึกไคติน 5-30% ให้ผลในระดับที่ต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญ

เช่นเดียวกับการย่อยสลายในเอนไซม์คอลลาจีเนสในสภาวะเลียนแบบร่างกายมนุษย์ น้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อที่เหลืออยู่ลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่สภาวะเดียวกัน ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่เอนไซม์คอลลาจีเนสไปตัดพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน “ไกลซีน” ในโครงสร้างของโมเลกุลเจลาติน [37] ประกอบกับการย่อยสลายไฮยาลูโรแนนด้วยความร้อน และการยับยั้งเคลื่อนของโครงเนื้อเยื่อภายในสารละลายตัวกลาง ทำให้โครงเนื้อเยื่อมีน้ำหนักเหลือเพียง 11-52% ของน้ำหนักเริ่มต้น อย่างไรก็ตาม การเสริมแรงผลึกไคตินในสัดส่วนไม่ต่ำกว่า 5% ของน้ำหนักวัสดุประกอบ ทำให้โครงเนื้อเยื่อมีความต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นเพราะเกิดการเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลผลึกไคตินกับวัสดุประกอบ ทำให้เอนไซม์คอลลาจีเนสเข้าถึงตำแหน่งตัดพันธะได้ยากขึ้น [51]

5. การดูดกลืนคลื่นอินฟราเรด

จากภาพแสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของเจลาติน ไฮยาลูโรแนน ผลึกไคติน และวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา (ภาพที่ 13) เจลาตินมีการการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่คลื่นความถี่ 1656, 1547, 1450 และ 1237 cm^{-1} ซึ่งเป็นการตอบสนองของกลุ่มพันธะเอไมด์ (amide bond, CO-NH) ที่ปรากฏอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน [37, 52, 53] ในขณะที่ไฮยาลูโรแนนซึ่งโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรด กลูคูโรนิก (Glucuronic) และอะซีทิลกลูโคซามีน (Acetylglucosamine) มีการดูดกลืนที่คลื่นความถี่ 1412 และ 1076 cm^{-1} แสดงถึงการปรากฏอยู่ของกลุ่มเกลือคาร์บอกซิล (carboxylate salt; symmetric stretching) และกลุ่มพันธะเอสเทอร์ (ester bond, CO-OH) ตามลำดับ อินฟราเรดสเปกตรัมของไฮยาลูโรแนนมีลักษณะคล้ายกับของผลึกไคตินเนื่องจากทั้งสองชนิดเป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ แต่ผลึกไคตินแสดงการดูดกลืนที่ชัดเจนและแคบกว่า (sharp) ในหลายช่วงความถี่ เนื่องจากโครงสร้างมีความเป็นผลึก [32] โดยเฉพาะที่ตำแหน่งความถี่ 1076 (พันธะเอสเทอร์), 1378 (กลุ่มเกลือคาร์บอกซิล) 3267 และ 3446 cm^{-1} (กลุ่มไฮดรอกซิล, OH) [53]

ผลึกไคตินที่สกัดได้ยังแสดงสเปกตรัมของพันธะเอไมด์หนึ่ง (amide I) ซึ่งแยกออกเป็นสองความถี่คือ 1621 และ 1656 cm^{-1} และสเปกตรัมของพันธะเอไมด์สอง (amide II) ที่ความถี่ 1556 cm^{-1} [52, 54] ความถี่ 1621 cm^{-1} นั้นเป็นลักษณะที่พบได้เฉพาะในผลึกไคตินชนิดอัลฟาเท่านั้น ขณะที่ความถี่ 1656 cm^{-1} นั้นเกิดจากการเหยียดออก (stretch) ของพันธะไฮโดรเจนระหว่างกลุ่มคาร์บอนิล (CO) กับ



ภาพที่ 13 อินฟราเรดสเปกตรัมของเจลาติน ไฮยาลูโรแนน ผลึกไคติน และวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา

กลุ่มเอมีน (NH) ของสายโซ่ข้างเคียง (intra-sheet chain) ซึ่งเป็นตำแหน่งความถี่เดียวกับที่พบในพันธะเอไมต์ในโมเลกุลโปรตีน [32]

เมื่อผสมไฮยาลูโรแนนเข้ากับเจลาตินและเชื่อมประสานด้วยตัวเชื่อมประสาน EDC (crosslink agent) วัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินที่ได้ (ผลึกไคติน 0%) แสดงการดูดกลืนอินฟราเรดที่คลื่นความถี่ 1650, 1550, 1412 และ 1076 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงทั้งพันธะเอไมต์และเอสเทอร์บนโครงสร้างของวัสดุประกอบ ตัวเชื่อมประสาน EDC ทำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมต์ระหว่างกลุ่มคาร์บอกซิลในเจลาตินและ/หรือในกรดกลูโคนิกของไฮยาลูโรแนนกับกลุ่มอะมิโนในเจลาติน และพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลุ่มคาร์บอกซิลดังกล่าวกับกลุ่มไฮดรอกซิลในสายเจลาตินและ/หรือในสายไฮยาลูโรแนน [55] ทั้งนี้ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นกับผลึกไคตินได้ด้วยเช่นกัน อินฟราเรดสเปกตรัมของวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินที่เสริมแรงด้วยผลึกไคตินมีการดูดกลืนคลื่นความถี่ 1378 และ 1076 cm^{-1} ด้วยความเข้มที่สูงขึ้น (higher intensity) ตามปริมาณผลึกไคตินที่เพิ่มขึ้น และพบตำแหน่งบ่าของการดูดกลืน (absorption shoulder) ที่ตำแหน่งความถี่ 3267 cm^{-1} ซึ่งมีขอบเขตชัดเจนมากขึ้นตามปริมาณผลึกไคตินที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน

อินฟราเรดสเปกตรัมจึงแสดงให้เห็นถึงการผสม (Blending) เข้าด้วยกันระหว่างวัสดุทั้งสามชนิดในโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา

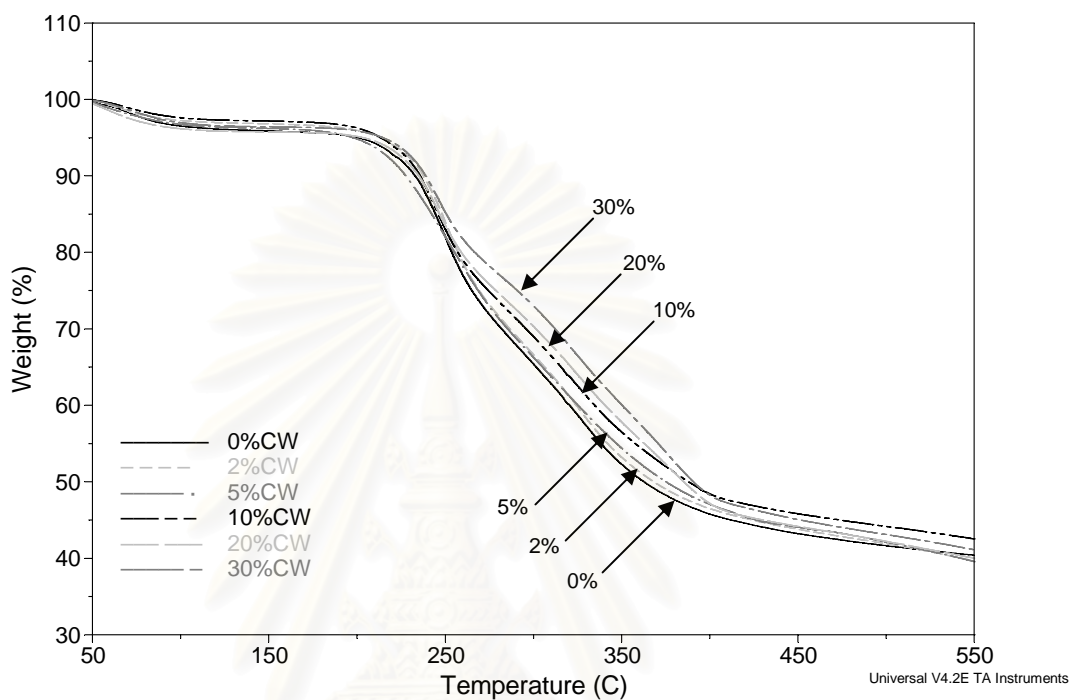
6. คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อ

การทดสอบคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา ทำโดยศึกษาเสถียรภาพของวัสดุในอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งเกิดการย่อยสลายภายใต้ก๊าซไนโตรเจน แสดงผลเป็นแผนภูมิของน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปดังภาพที่ 14

จากแผนภูมิ (ภาพที่ 14) การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตามอุณหภูมิของทุกกลุ่มตัวอย่างมีรูปแบบเดียวกัน น้ำหนักของตัวอย่างทุกกลุ่มลดลงน้อยกว่า 5% ในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 200°C โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึง 210-230°C น้ำหนักของตัวอย่างกลับลดลงอย่างรวดเร็วโดยมีอัตราการลดลงสูงสุดที่อุณหภูมิ 245-250°C ซึ่งแสดงผลจากจุดสูงสุดบนแผนภูมิแสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตามเวลา (derivative curve)

การลดลงของน้ำหนักในช่วงอุณหภูมิ 260-360°C มีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกไคตินแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด หากเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเดียวกันภายในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว ตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกไคตินสูงมีน้ำหนักคงเหลืออยู่มากกว่าน้ำหนักของตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกไคตินต่ำกว่า เสถียรภาพของโครงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิสูงจึงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณผลึกไค

ดิน ซึ่งอาจแสดงผลในเชิงปริมาณได้ โดยการวิเคราะห์หาค่าของอุณหภูมิที่ต้องใช้ในการลดน้ำหนักของ ตัวอย่างลงค่าหนึ่งๆ และหาปริมาณกากของวัสดุที่เหลืออยู่ (residue) ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 14 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก (%) ของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาติน เสริมแรงด้วยเปลือกไคตินชนิดอัลฟา ที่อุณหภูมิ 30-600 องศาเซลเซียส ในอัตราเพิ่มอุณหภูมิ 10°ซ/นาที ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (TGA Curve)

ตัวอย่าง	T-5% (°C)	T-25% (°C)	T-50% (°C)	กากที่ 550°ซ (น้ำหนัก %)
เปลือกไคติน 0%	200.64	264.86	362.57	40.41
เปลือกไคติน 2%	212.61	269.02	368.00	39.64
เปลือกไคติน 5%	194.44	268.43	374.95	39.56
เปลือกไคติน 10%	213.28	274.18	387.80	42.54
เปลือกไคติน 20%	203.27	278.48	385.04	40.00
เปลือกไคติน 30%	214.43	290.66	390.45	41.11

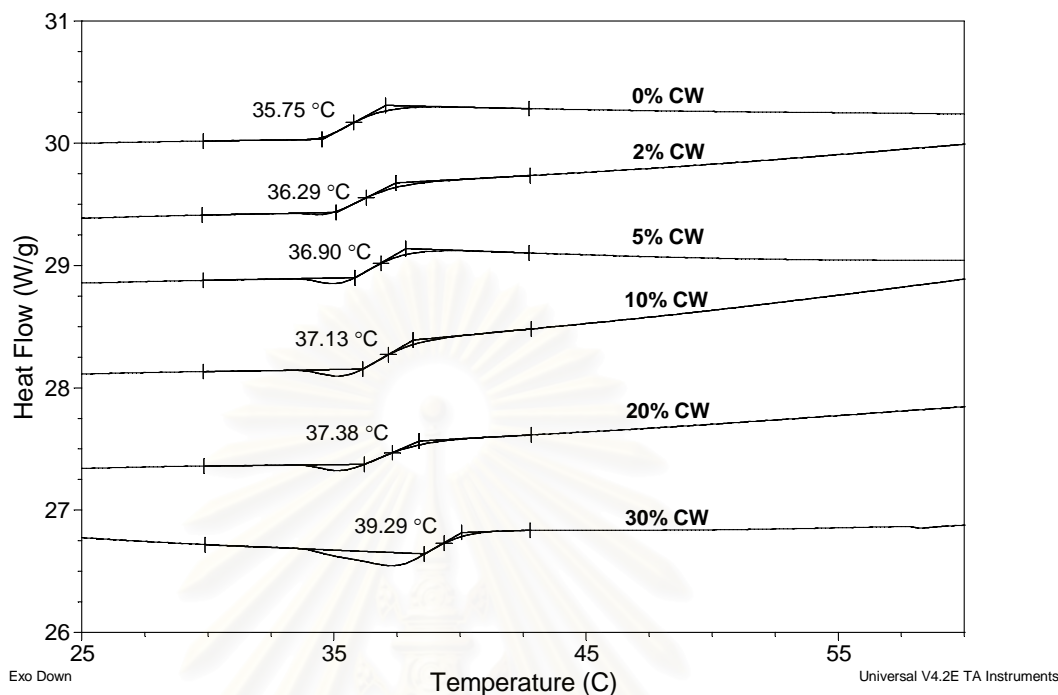
ตารางที่ 4 อุณหภูมิ (°ซ) ณ จุดที่น้ำหนักของตัวอย่างลดลง 5, 25 และ 50% (T-5%, T-25% และ T-50% ตามลำดับ) และน้ำหนักเศษซากตัวอย่างที่เหลืออยู่ภายหลังจากที่อุณหภูมิ 550°ซ

การลดลงของน้ำหนักในช่วงอุณหภูมิ 260-360 °ซ มีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกไคตินแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด หากเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเดียวกันภายในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว ตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกไคตินสูงมีน้ำหนักคงเหลืออยู่มากกว่าน้ำหนักของตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกไคตินต่ำกว่า เสถียรภาพของโครงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิสูงจึงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณผลึกไคติน ซึ่งอาจแสดงผลในเชิงปริมาณได้ โดยการวิเคราะห์หาค่าของอุณหภูมิที่ต้องใช้ในการลดน้ำหนักของตัวอย่างลงค่าหนึ่งๆ และหาปริมาณกากของวัสดุที่เหลืออยู่ (residue) ดังแสดงในตารางที่ 4

จากตารางที่ 3 T-5% ซึ่งแสดงถึงการลดลงของน้ำหนักตัวอย่างในระยะแรก (5%) เกิดขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 200°ซ สังเกตได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเผาแต่ละกลุ่มตัวอย่างแตกต่างกันไม่มากนัก และเป็นไปอย่างไม่มีแนวโน้ม ขณะที่ T-25% และ T-50% ซึ่งหมายถึงการลดลงของน้ำหนักตัวอย่าง 25 และ 50% ตามลำดับ พบว่าตัวอย่างที่มีปริมาณผลึกไคตินสูงต้องใช้อุณหภูมิในการเผาสูงขึ้นตามไปด้วย ผลึกไคตินปริมาณ 10-30% โดยน้ำหนักของวัสดุประกอบช่วยสร้างเสถียรภาพต่อความร้อนได้ดีกว่าผลึกไคตินปริมาณ 2 หรือ 5% อย่างเห็นได้ชัด การเสริมแรงด้วยผลึกไคตินจึงมีผลให้เสถียรภาพต่อความร้อนของวัสดุประกอบเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามจากการที่กากวัสดุจากการเผาที่อุณหภูมิ 550°ซ เหลืออยู่ในปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าผลดังกล่าวอาจจำกัดอยู่ในบางช่วงอุณหภูมิเท่านั้น (260-360°ซ) ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิในการใช้งานโครงเนื้อเยื่อ (37°ซ)

ที่อุณหภูมิ 37°ซ โครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพทางกายภาพ เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วของวัสดุประกอบ ซึ่งจากการทดสอบด้วย Differential scanning calorimeter ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน พบว่าอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วมีค่า 35.75°ซ (ภาพที่ 15) และมีค่าสูงขึ้นเมื่อปริมาณผลึกไคตินมีสัดส่วนมากขึ้น ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับผลจากการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตามอุณหภูมิข้างต้น การที่โครงเนื้อเยื่อที่มีผลึกไคติน 5-30% มีอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วสูงกว่าหรือเท่ากับ 37°ซ อาจเป็นสาเหตุให้ความทนทานต่อการย่อยสลายทางชีวภาพดีกว่าโครงเนื้อเยื่อที่มีผลึกไคติน 2-5% (ภาพที่ 12)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 15 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงความร้อนของโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา ที่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส ในอัตราเพิ่มอุณหภูมิ 10°ซ/นาที ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (DSC Curve)

7. ความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูก

การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีเอ็มทีที อาศัยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรของสารละลายฟอร์มาซานในโดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อ กับสารละลายฟอร์มาซานที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งถือเป็นค่าควบคุม (control) เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แปรผันตามปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง จึงแสดงถึงแนวโน้มความเป็นพิษของวัสดุ

งานวิจัยนี้เลือกทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 ในโครงเนื้อเยื่อที่ปราศจากผลึกไคติน และในโครงเนื้อเยื่อที่มีผลึกไคติน 30% ซึ่งเป็นตัวแทนสำหรับพิสูจน์ความเป็นพิษอันเนื่องมาจากปริมาณผลึกไคตินบนสมมติฐานที่ว่า หากไม่พบความเป็นพิษในโครงเนื้อเยื่อที่มีผลึกไคติน 30% แล้วโครงเนื้อเยื่อในกลุ่มอื่นซึ่งมีผลึกไคตินน้อยกว่าย่อมปราศจากความเป็นพิษด้วย ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5

ตัวอย่าง	การดูดกลืนแสง (570 นาโนเมตร)		
	กรดแล็กติก	ผลึกไคติน 0%	ผลึกไคติน 30%
1	0.575	0.524	0.465
2	0.508	0.536	0.410
3	0.537	0.487	0.409
4	0.540	0.569	0.428
ค่าเฉลี่ย	$0.540 \pm 0.027^*$	$0.529 \pm 0.034^*$	0.428 ± 0.026

ตารางที่ 5 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เปรียบเทียบระหว่าง
 วัสดุแล็กติก SaOS-2 สามชนิด * นัยสำคัญต่ำกว่า 0.05; ทดสอบด้วยสถิติ One
 Way ANOVA with Tukey HSD, จำนวนตัวอย่างเป็น 4.

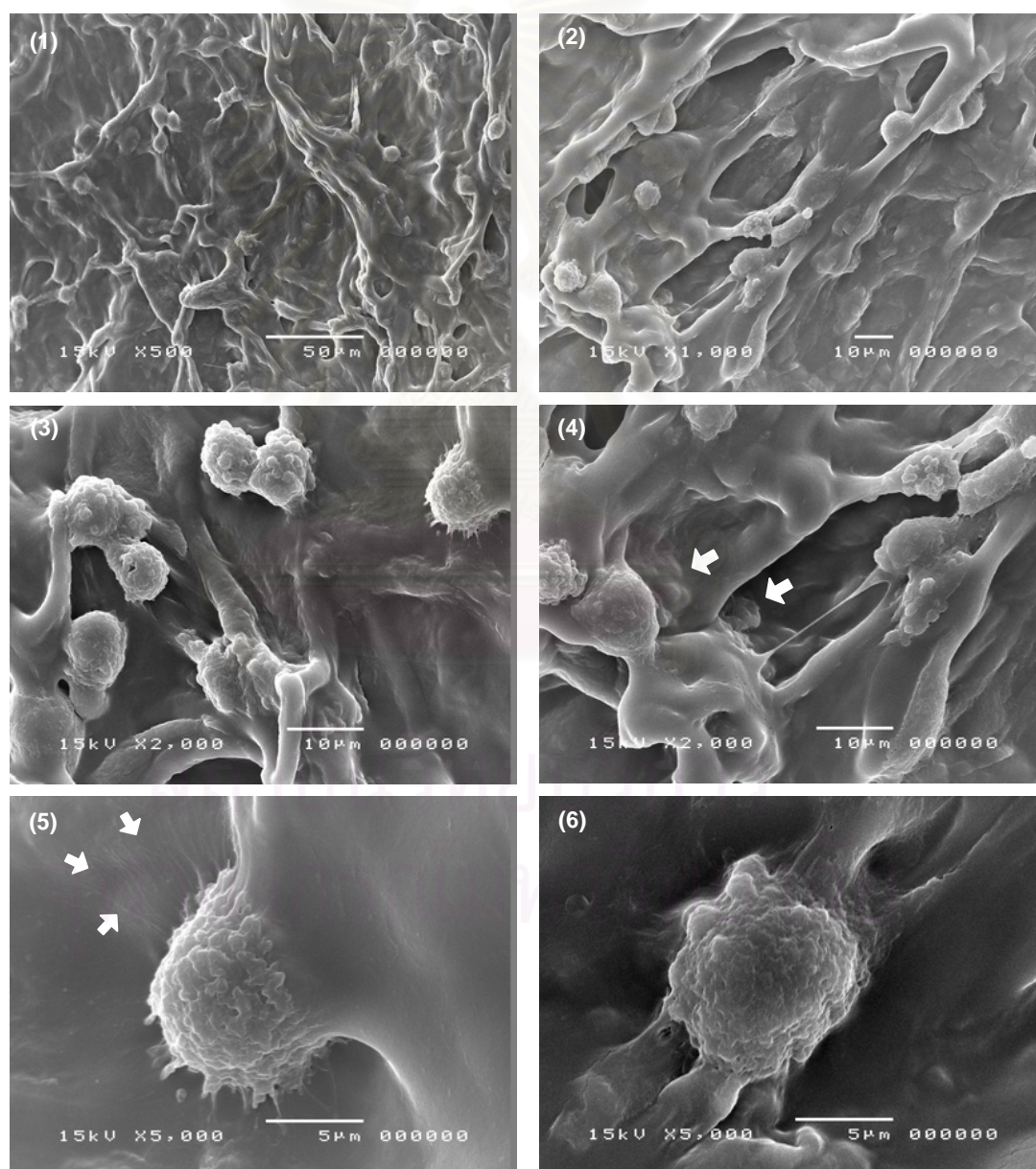
จากตารางที่ 4 สถิติทดสอบแสดงให้เห็นว่า ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงในกลุ่มโครงเนื้อเยื่อที่ปราศจากผลึกไคติน (ผลึกไคติน 0%) ไม่แตกต่างจากกรดแล็กติกอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ค่าจากโครงเนื้อเยื่อที่เสริมแรงด้วยผลึกไคติน 30% ต่ำกว่าทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกอันเนื่องมาจากผลึกไคตินที่สูงถึง 30% ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบการเกาะยึดและการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูก SaOS-2 ในโครงเนื้อเยื่อทุกกลุ่ม เพื่อยืนยันและขยายผลของปริมาณผลึกไคตินที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกในรายละเอียด

8. การเกาะยึดและการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูก

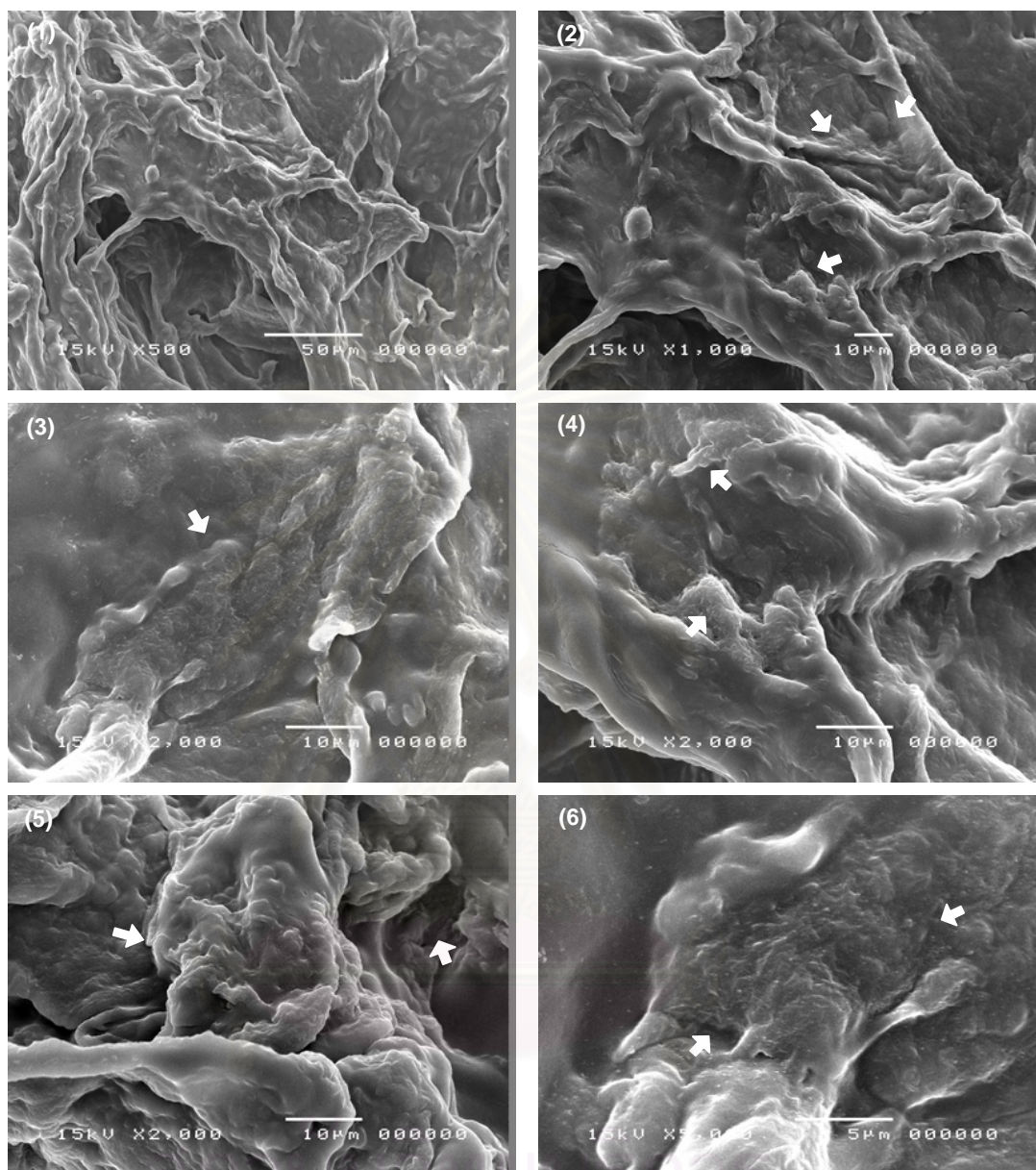
การยึดเกาะของเซลล์กระดูกบนโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮดรอกซีอะพาทิตเสริมแรงด้วยผลึกไคติน 30% ภายหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 และ 7 วัน แสดงด้วยภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยายต่างๆในภาพที่ 16 และ 17 ตามลำดับ

ที่เวลา 1 วัน พบว่าเซลล์กระดูกมีรูปร่างกลม มีการกระจายตัวเกาะอยู่บนผิวโครงเนื้อเยื่อโดยทั่วไป (ภาพที่ 16(1)) เซลล์ส่วนใหญ่ถูกทับถมอยู่ใต้โครงเนื้อเยื่อเนื่องจากการยุบตัวของโครงเนื้อเยื่อในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง สังเกตได้จากการพบเซลล์ในชั้นล่างร่วมกับพบรอยนูนของเซลล์บนพื้นผิวโครงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 16(4), ลูกศร) แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถเข้าถึงตำแหน่งต่างๆภายในโครงเนื้อเยื่อโดยผ่านทางรูพรุนภายในได้ นอกจากนี้ยังพบแขนงไซโตพลาสซึม (cytoplasmic process, filopodia) ที่ยืดยาวออกไปรอบตัวเซลล์ (ภาพที่ 16(5), ลูกศร) บ่งชี้ถึงการตอบสนองของชั้นต้นของเซลล์กระดูกต่อพื้นผิววัสดุอันประกอบด้วยการเกาะ (attachment) การยึดติด (adhesion) และการเหยียดตัว (spreading) ซึ่งคุณภาพในการตอบสนองนี้ส่งผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) และการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของเซลล์ (differentiation) [56] ที่จะเกิดขึ้นต่อไป

ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 7 วัน รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัด เซลล์มีรูปร่างแบนและฝังตัวกลมกลืนไปกับผิวเนื้อเยื่อจนสังเกตเห็นได้ยาก (ภาพที่ 17, ลูกศร) แสดงถึงการปรับตัวของเซลล์ให้มีการยึดติดและเหยียดตัวแผ่ขยายไปบนพื้นผิวโครงเนื้อเยื่อ [8] ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคติน 30% มีความเข้ากันได้และส่งเสริมการเจริญของเซลล์กระดูกในเบื้องต้น ถึงแม้ว่าผลจากการทดสอบความเป็นพิษจะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม

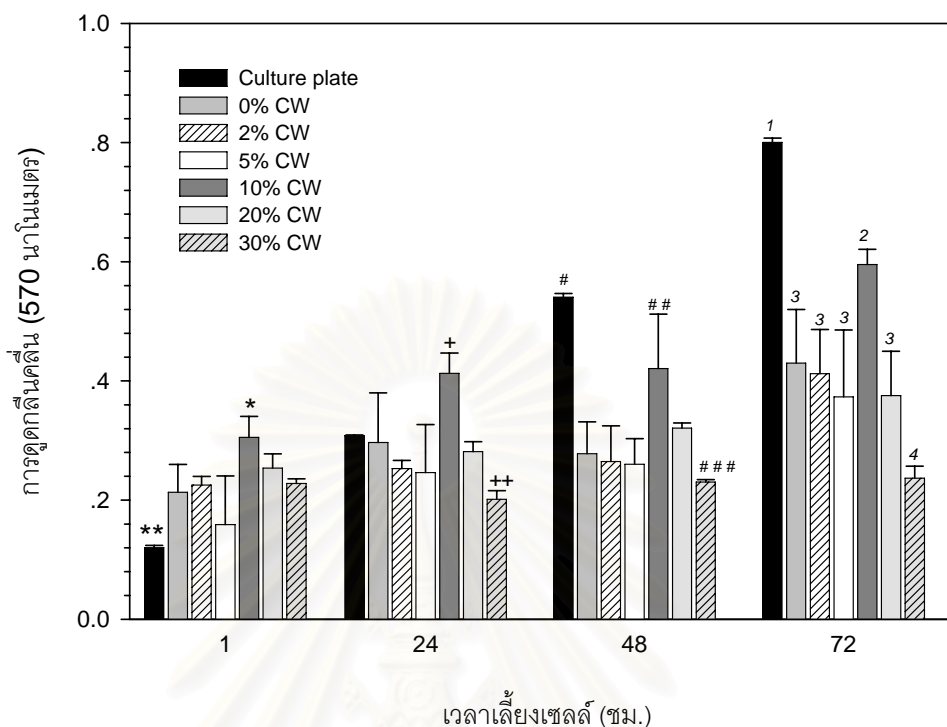


ภาพที่ 16 การยึดเกาะของเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 บนโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา 30% หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม. ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด



ภาพที่ 17 การยึดเกาะของเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 บนโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา 30% หลังเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

เพื่อศึกษาถึงผลของปริมาณผลึกไคตินที่มีต่อการเจริญของเซลล์กระดูก งานวิจัยนี้ทดสอบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกเปรียบเทียบในโครงเนื้อเยื่อทุกกลุ่มที่เวลา 1, 24, 48, และ 72 ชม. ผลการทดสอบแสดงด้วยปริมาณการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเช่นเดียวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 การดูดกลืนคลีนที่ 570 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกชนิด SaOS-2 บนโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบไฮยาลูโรแนน-เจลาตินเสริมแรงด้วยผลึกไคตินชนิดอัลฟา *+, #, 1 นัยสำคัญต่ำกว่า 0.05; ทดสอบด้วยสถิติ One Way ANOVA with Tukey HSD เฉพาะที่เวลาเดียวกัน จำนวนตัวอย่างเป็น 4.

จากผลการทดลอง ในช่วงแรกจำนวนของเซลล์กระดูกในโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบทุกกลุ่มมีมากกว่าในภาคเลี้ยงเซลล์ แต่เมื่อเวลาผ่านไปอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกในภาคเลี้ยงเซลล์เพิ่มมากขึ้นกว่าในโครงเนื้อเยื่อวัสดุประกอบอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เวลา 48 และ 72 ชม. อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณไฮยาลูโรแนนที่ผสมในสัดส่วน 50% โดยน้ำหนักนั้นมากเกินไป ทำให้การยึดเกาะและการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์โดนจำกัด [20] การศึกษาโดย Liu et al. ในปี 2004 [29] พบว่า ความเข้มข้นของไฮยาลูโรแนนเพียง 0.1% สามารถส่งเสริมการยึดเกาะ การยับยั้งเคลื่อน (migration) และการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นฟิล์มไฮยาลูโรแนน-เจลาติน-ไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ 0.5 หรือ 1% แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปริมาณไฮยาลูโรแนนในสิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์ที่มีต่อการตอบสนองของเซลล์ในเชิงบวก

อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดลองพบแนวโน้มของการเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกในโครงเนื้อเยื่อทุกกลุ่มเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างโครงเนื้อเยื่อแต่ละกลุ่ม โครงเนื้อเยื่อที่มีปริมาณผลึกไคติน 10% มีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกมากกว่าโครงเนื้อเยื่อในกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงเวลาขณะที่กลุ่มอื่นๆแสดงผลที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นหากคำนึงถึงชีวสมบัติของโครง

เนื้อเยื่อ การเสริมแรงวัสดุประกอบไฮยาโรโรแนน-เจลาตินด้วยผลึกไคตินนั้นจำเป็นต้องกำหนดสัดส่วนของผลึกไคตินไว้ที่ประมาณ 10% เพื่อที่จะปรับปรุงชีวสมบัติของโครงเนื้อเยื่อให้มีความเข้ากันได้ และส่งเสริมการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกได้ดีที่สุด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

(References)

1. Hollander AP, Hatton PV. Biopolymer Methods in Tissue Engineering. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2004.
2. Rezwan K, Chen QZ, Blanker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413-3431.
3. Griffith LG. Polymeric Biomaterials. *Acta Materialia* 2000;48:263-277.
4. Kofron MD, Li X, Laurencin CT. Protein-and-gene-based tissue engineering in bone repair. *Current opinion in Biotechnology* 2004;15:399-405.
5. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474-5491.
6. Mathew HWT. Polymer for tissue engineering scaffold. In: Dumitriu S, editor. Polymeric Biomaterials. New York: Marcel Dekker Inc; 2002. p. 168.
7. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold desing variables and applications. *Biomaterials* 2003;24:4337-4351.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4 ed. New York: Garland Science; 2002.
9. Mikos AG, Lu L, Temenoff JS, Tessmar JK. Synthetic bioresorbable polymer scaffolds. In: Schoen FJ, Lemons JE, editors. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. 2 ed. California: Elsevier Inc; 2004. p. 735-749.
10. Lee KY, Rowley JA, Eiselt P, Moy EM, Bouhadir KH, Mooney DJ. Controlling mechanical and swelling properties of Alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules* 2000;33:4291-4294.
11. Shu XZ, Liu Y, Palumbo F, Prestwich GD. Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: A covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials* 2003;24:3825-3834.
12. Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: A strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* 2005(26):359-371.

13. Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. *Biomaterials* 2005;26:4737-4746.
14. Liu LS, Thompson AY, Heidarani MA, Poser JW, Spiro RC. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 1999;20:1097-1108.
15. Wong M, Siegrist M, Wang X, Hunziker E. Development of mechanically stable alginate/chondrocyte constructs: Effects of guluronic acid content and matrix synthesis. *Journal of Orthopaedic Research* 2001;19(493-499).
16. Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruyssen KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: Synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release* 1998;53:93-103.
17. Shu XZ, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, D PG. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(1339-1348).
18. Prestwich GD. Biomaterials form chemically-modified hyaluronan. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html> 2001.
19. Kikuchi T, Yamada H, Fujikawa K. Effects of high molecular weight hyaluronan on the distribution and movement of proteoglycan around chondrocytes cultured in alginate beads. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9:351-356.
20. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006;85:699-715.
21. Chaplin M. Water structure and science. <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygel.html> 2007.
22. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Controlled Release* 2005;109:256-274.
23. Tabata Y, Nagano A, Muniruzzaman M, Ikada Y. In vitro sorption and desorption of basic fibroblast growth factor from biodegradable hydrogels. *Biomaterials* 1998;19:1781-1789.
24. Brown KE, Leong K, Huang C-H, Dalal R, Dalal R, Green GD, et al. Gelatin/chondroitin 6-sulfate microspheres for the delivery of therapeutic proteins to the joint. *Arthritis & Rheumatism* 1998;41(12):2185-2195.
25. Vadnelli MA, Rivasi F, Guerra P, Forni F, Arletti R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Int J Pharm* 2001;215:175-184.

26. Vandervoort J, Ludwig A. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:251-261.
27. Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS. Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *J Biomedical Materials Research* 1999;48:631-639.
28. Chang CH, Liu HC, Lin CC, Chou CH, Lin FH. Chondroitin-hyaluronan-tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4853-4858.
29. Liu H, Yin Y, Yao K, Ma D, Cui L, Cao Y. Influence of the concentrations of hyaluronic acid on the properties and biocompatibility of Cs-Gel-HA membranes. *Biomaterials* 2004;25:3523-3530.
30. Lee SB, Kim YH, Chong MS, Hong SH, Lee YM. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials* 2005;26:1961-1968.
31. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002;43:3-12.
32. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 2006;31:603-632.
33. Paillet M, Dufresne A. Chitin whisker reinforced thermoplastic nanocomposites. *Macromolecules* 2001;34(6527-6530).
34. Morin A, Dufresne A. Nanocomposites of chitin whiskers from Riftia tubes and poly(caprolactone). *Macromolecules* 2002;35:2190-2199.
35. Sriupayo J, Supaphol P, Blackwell J, Rujiravanit R. Preparation and characterization of α -chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment. *Carbohydrate Polymers* 2005;62:130-136.
36. Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2000;69:169-184.
37. Park S-N, Park J-C, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 2002;23:1205-1212.

38. Maeda S, Sawai T, Uzuki M, Takahashi Y, Omoto H, Seki M, et al. Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1995;54:970-975.
39. Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol)fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 2005;101:111-125.
40. Li J, Revol J-F, Naranjo E, Marchessault RH. Effect of electrostatic interaction on phase separation behaviour of chitin crystallite suspensions. *International Journal of Biological Macromolecules* 1996;18:177-187.
41. Revol JF, Marchessault RH. In vitro chiral nematic ordering chitin crystallites. *International Journal of Biological Macromolecules* 1993;15:329-335.
42. Nair KG, Dufresne A. Crab shell chitin whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules* 2003;4:657-665.
43. Lu Y, Weng L, Zhang L. Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whisker. *Biomacromolecules* 2004;5:1046-1051.
44. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529-2543.
45. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137-146.
46. Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 1997;18:583-590.
47. Kang H-W, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20:1339-1344.
48. Currey J. Incompatible mechanical properties in compact bone. *Journal of Theoretical Biology* 2004;231:569-580.
49. Park H, Park K. Hydrogels in Bioapplications. In: Ottenbrite RM, Huang SJ, Park K, editors. Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications; 1994; Washington DC; 1994. p. 1-10.
50. Lapcik LJ, Lapcik L, Smedt SD, Demeester J, Chabreck P. Hyaluronan: Preparation, structure properties and applications. *Chemical reviews* 1998;98(8):2663-2684.

51. Vizarova K, Bakos D, Rehakova M, Perikova M, Panakova E, Koller J. Modification of layered atelocollagen: enzymatic degradation and cytotoxicity evaluation. *Biomaterials* 1995;16:1217-1221.
52. Magoshi J, Mizuide M, Magoshi Y. Physical properties and structure of silk. VI. Conformational changes in silk fibroin induced by immersion in water at 2 to 130⁰C. *Journal of Polymer Sciences and Polymer Physics* 1979;17:515-520.
53. Coates J. Interpretation of infrared spectra, A practical approach. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2000. p. 10815-10837.
54. Nair KG, Dufresne A. Crab shell chitin whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. 3. Effect of chemical modification of chitin whiskers. *Biomacromolecules* 2003;4:1835-1842.
55. Tomihata K, Ikada Y. Cross-linking of hyaluronic and with water-soluble carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997;37:243-251.
56. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-681.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย