

การพัฒนาฝีมือช่างชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมู

นายอิสราวุธ ประเสริฐสังข์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2954-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF ACELLULAR DERMIS FROM PORCINE SKIN

Mr. Isarawut Prasertsung

A Thesis Submitted in Partial of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

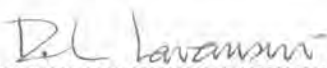
ISBN 974-14-2954-1

Copyright of Chulalongkorn University

492109

Thesis Title DEVELOPMENT OF ACELLULAR DERMIS FROM PORCINE SKIN
By Mr. Isarawut Prasertsung
Field of Study Chemical Engineering
Thesis Advisor Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.
Thesis Co-advisor Tanom Bunaprasert, M.D.


Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


..... Dean of the Faculty of Engineering
(Professor Direk Lavansiri, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Chirakorn Muangnapoh, Dr. Ing.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Tanom Bunaprasert, M.D.)

..... Member
(Sorada Kanokpanont, Ph.D.)

..... Member
(Rattapan Rangkupan, Ph.D.)

อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ : การพัฒนาผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมู.
(DEVELOPMENT OF ACELLULAR DERMIS FROM PORCINE SKIN) อ. ที่ปรึกษา :
รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : นพ. ถนอม บรรณประเสริฐ, 80 หน้า.
ISBN 974-14-2954-1.

ผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์ (acellular dermis) เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ธรรมชาติที่ได้มีการนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผล การผลิตผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากผิวหนังมนุษย์ มีข้อจำกัดในด้านวัตถุดิบ ซึ่งต้องนำมาจากผิวหนังศพ แหล่งวัตถุดิบจากสัตว์จึงเป็นทางเลือกของวัตถุดิบสำหรับผลิตผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์ ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการใหม่สำหรับผลิตผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมู หนังหมูที่ได้รับจากโรงฆ่าสัตว์จะถูกกำจัดขนด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ แล้วนำหนังหมูที่ได้มาทำการลอกผิวหนังชั้นนอกออกโดยใช้กลีเซอรอลความเข้มข้น 85% หลังจากนั้นนำหนังหมูที่ขจัดผิวหนังชั้นนอกออกหมดแล้วไปขจัดไขมันด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม/เมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากผ่านกระบวนการกำจัดไขมันแล้ว นำหนังหมูที่ได้เข้าสู่กระบวนการการขจัดเซลล์ ซึ่งประยุกต์ใช้อุปกรณ์อัลตราซาวด์แรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์ โดยศึกษาอิทธิพลของชนิดของเอนไซม์และสภาวะในการอัลตราซาวด์แรงดันแบบเป็นช่วงต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ จากผลการทดลองเชิงปริมาณด้วยเทคนิคการวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA assay) และเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคการย้อม (H&E) พบว่า การประยุกต์ใช้อุปกรณ์อัลตราซาวด์แรงดันในกระบวนการการขจัดเซลล์ สามารถลดเวลาที่ใช้สำหรับหนังหมูในเอนไซม์ให้สั้นลงได้ เนื่องจากการแช่เอนไซม์ภายใต้การอัลตราซาวด์แรงดันจะช่วยทำให้เอนไซม์มีโอกาสเข้าไปในผิวหนังหมูได้มากขึ้น ดังนั้นเซลล์จึงถูกกำจัดออกมาได้ง่ายและเร็วขึ้น เมื่อประกอบกับการเปลี่ยนสารละลายเอนไซม์ระหว่างการผลิตส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดเซลล์เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากสามารถกำจัดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดจากเซลล์ที่ถูกสกัดออกมา จากผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชี้ให้เห็นว่า การอัลตราซาวด์แรงดันซึ่งช่วยให้เวลาของการผลิตสั้นลงสามารถป้องกันการเกิดการเสื่อมสภาพของโครงสร้างหนังหมูได้ ผลจากการศึกษาอิทธิพลของชนิดของเอนไซม์พบว่า ไคเปส (dispase II) สามารถกำจัดเซลล์ได้ดีกว่าทริปซิน (trypsin) อย่างไรก็ตามจากการทดลองปลูกถ่ายลงในหนูทดลองพบว่า เซลล์ผิวหนังสามารถเคลื่อนที่เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้จากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีการสร้างระบบหลอดเลือด และคอลลาเจนขึ้นมาใหม่ ผลการทดลองแสดงถึงความเป็นไปได้อย่างยิ่งในการประยุกต์ใช้วิธีการอัลตราซาวด์แรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับเอนไซม์เพื่อผลิตผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....*อิศราวุธ ประเสริฐสังข์*
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล*
ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*ถนอม บรรณประเสริฐ*

4670610021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: ACELLULAR DERMIS/ XENOGENEIC SCAFFOLD/ DECELLULARIZATION/ PORCINE SKIN

ISARAWUT PRASERTSUNG : DEVELOPMENT OF ACELLULAR DERMIS FROM PORCINE SKIN, THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : TANOM BUNAPRASERT, M.D., 80 pp. ISBN 974-14-2954-1.

Acellular dermis (ADM) is a natural scaffold used for dermal replacement. The production of ADM from human skin is limited due to an availability of cadaver skin. Xenogeneic sources such as porcine skin is an alternative for ADM production. In this work, a new method for producing ADM from porcine skin was developed. Fresh porcine skin from local slaughterhouse was dehaired by sodium sulphide following by epidermis removal using 85% glycerol. After fat removal by chloroform/methanol (2/1 v/v) solvent for 2 hr, the process of cell removal was performed using enzymatic treatment incorporated with a periodic pressurized technique. The effects of enzyme type (trypsin and dispase II) and periodic pressurized conditions on the efficiency of cell removal were investigated. When periodic pressure was applied, enzymatic treatment time could be shorten since enzyme solution was able to penetrate into tight dermis. As a result, cells could be easily removed from porcine skin as noticed quantitatively by DNA assay and qualitatively by H&E staining. When enzyme refreshment was introduced into the decellularized process, the percentage of cell removal was further enhanced. This ensured that no inhibition of removed cells to enzyme-substrate interaction. Moreover, short-time enzymatic treatment with periodic pressurized technique could prevent the disruption of dermal structure, as observed by SEM. Dispase II can be used to remove cell better than trypsin in the periodic pressurized technique. However, *in vivo* study indicated that numerous fibroblast from the host tissue infiltrated into ADM prepared using both trypsin and dispase II. Neo-collagen and neo-capillaries were produced. This result elucidated that the use of periodic pressurized technique with enzymatic treatment has a high potential to be a new method to produce ADM for skin tissue engineering.

Department..... Chemical Engineering..... Student's Signature *Isarawut Prasertsung*
 Field of Study..... Chemical Engineering..... Advisor's Signature..... *[Signature]*
 Academic Year... 2006..... Co-advisor's Signature..... *Tanom Bunaprasert*

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express his sincere gratitude to Associate Professor Dr. Siriporn Damrongsakkul, who supervised, suggested and encouraged him throughout this work, to Doctor Tanom Bunaprasert and Dr. Sorada Kanokpanont for their guidance and valuable suggestions. The author is also grateful to Associate Professor Dr. Chirakarn Muangnapoh and Dr. Rattapol Rangkupan for serving as the chairman and the members of the thesis committee, respectively, whose comments were constructive and especially helpful.

The author would like to thank Doctor Voranuch Thanakit at the Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her help in histological analysis and her worth suggestions.

The author would like to Kawin Slaughterhouse, Nakornpathom, Thailand for his help in the supply of fresh porcine skin.

The author would like to thank the staffs of Analytical Instrument Center and Laboratory, Faculty of Phamaceutical Science, Chulalongkorn University for the kind support in the use of spectrofluorometer.

The author would like to thank the staffs of Analytical Instrument Center and Laboratory, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University for their helps with experiments. He would like to extend his grateful thanks to all members of Polymer Engineering Research Group at the Department of Chemical Engineering as well as all members of Animal Laboratory at the Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Finally, his greatest thank should go to his family especially his parents, who always support, undoubtedly believe and understand him.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI)	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
1.1 Background.....	1
1.2 Objectives.....	3
1.3 Scope of work.....	3
II. THEORY	4
2.1 Skin.....	4
2.2 Porcine skin.....	6
2.3 Wound.....	7
2.3.1 Type of wound.....	7
2.3.2 Wound healing process.....	10
2.3.2.1 Epidermal healing.....	11
2.3.2.2 Repair of the dermal extracellular matrix.....	11
2.3.2.3 Wound contraction.....	12
2.3.2.4 Wound angiogenesis.....	13
2.4 Cell-extracellular matrix interaction.....	13
2.4.1 Composition of ECM	14
2.4.1.1 Collagen.....	14
2.4.1.2 Fibronectin.....	15
2.4.1.3 Elastin.....	15
2.5 Skin substitute	16

	PAGE
2.6 Acellular dermis	17
2.6.1 History and roles of acellular dermis.....	17
2.6.2 Characteristics of acellular dermis	19
2.7 Decellularized process of tissue and organ	20
2.7.1 Physical method.....	20
2.7.2 Chemical method.....	21
2.7.3 Enzymatic method	22
2.8 Cell-dissociating enzymes	23
2.8.1 Collagenase.....	23
2.8.2 Trypsin.....	24
2.8.3 Neutral protease.....	25
III. LITERATURE REVIEW	27
IV. EXPERIMENTAL WORK	35
4.1 Materials and Reagents.....	37
4.2 Equipments	38
4.3 Experimental procedures	39
4.3.1 Preparation of acellular dermis from porcine skin	39
4.3.1.1 Dehair and de-epidermis process.....	39
4.3.1.2 Fat removal process	39
4.3.1.3 Cell removal process	40
4.3.2 ADM characterization	42
4.3.2.1 Fat determination.....	42
4.3.2.2 DNA assay.....	43
4.3.2.3 Histological examination.....	44
4.3.2.4 Scanning electron microscopy (SEM).....	44
4.3.2.5 FT-Raman spectroscopy	44
4.3.3 Animal study	45
4.3.3.1 Subcutaneous implantation.....	45
4.3.3.2 Observation of cell infiltration	45
4.3.4 Statistical analysis	46

	PAGE
V. RESULTS AND DISCUSSION	47
5.1 Fat removal.....	47
5.1.1 Effects of freeze thaw on fat removal.....	47
5.1.2 Effects of type of solvent on fat removal.....	48
5.1.3 Effects of treatment time on fat removal.....	48
5.2 Cell removal.....	49
5.2.1 Effects of enzyme refreshment on cell removal.....	49
5.2.2 Influence of periodic pressurized technique on cell removal.....	50
5.2.3 Comparison of the type of enzyme.....	52
5.3 Morphology observation.....	52
5.4 Fourier transforms raman (FT-Raman) spectrophotometric analysis.....	53
5.5 Animal study.....	54
5.5.1 Cell infiltration into ADM.....	54
VI. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	68
6.1 Conclusions.....	68
6.2 Recommendations.....	68
REFERENCES	70
APPENDICES	74
A. Activities of trypsin and dispase II.....	75
B. Standard curve of DNA assay.....	78
VITAE	80

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
3.1	Commonly used decellularization methods.....33
4.1	Fat removal treatment of de-epidermis porcine skin.....40
4.2	Cell removal treatment of de-fat skin.....41
A-1	The absorbance of enzyme solutions at the wavelength of 440 nm.....75
A-2	The activity of enzyme solutions.....76
A-3	The activity per gram of enzymes.....76
A-4	The total activity of enzyme.....77
B-1	Fluorescence count of L929 mouse fibroblasts at the excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively.....78

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Anatomy of skin.....	5
2.2 Anatomy of porcine skin.....	7
2.3 Wound depth diagram.....	8
2.4 Peptide bond cleavage specificity of trypsin.....	25
4.1 Schematic diagram of experimental procedures.....	36
4.2 Periodic pressurized apparatus	38
4.3 Treatment pattern of periodic pressurization.....	42
4.4 Schematic diagram of sectional direction on implanted ADM samples prior to cell infiltrated observation	46
5.1 Percentage of fat removal of porcine skin; FR1 = hexane treatment for 12 hr FR2 = 5 freeze thaw cycles and hexane treatment for 12 hr FR3 = 10 freeze thaw cycles and hexane treatment for 12 hr FR4 = 15 freeze thaw cycles and hexane treatment for 12 hr FR5 = 10 freeze thaw cycles and chloroform/methanol treatment for 12 hr.....	56
5.2 Percentage of fat removal of porcine skin by chloroform/methanol treatment; FR5 = 10 freeze thaw cycles and chloroform/methanol treatment for 12 hr FR6 = 10 freeze thaw cycles and chloroform/methanol treatment for 3 hr FR7 = 10 freeze thaw cycles and chloroform/methanol treatment for 2 hr FR8 = 10 freeze thaw cycles and chloroform/methanol treatment for 1 hr FR9 = 10 freeze thaw cycles and chloroform/methanol treatment for 20 min.....	57
5.3 Percentage of cell removal from porcine skin determined by DNA assay. CR1 = trypsin, continuous stirring, treatment time 24 hr CR2 = trypsin, enzyme refreshment 6 hr, continuous stirring, treatment time 24 hr CR3 = trypsin, enzyme refreshment 6 hr, 24 pressurized periods, treatment	

FIGURE	PAGE
time 12 hr	
CR4 = trypsin, enzyme refreshment 1.5 hr, 36 pressurized periods, treatment time 3 hr	
CR5 = trypsin, enzyme refreshment 45 min, 36 pressurized periods, treatment time 3 hr	
CR6 = dispase II, enzyme refreshment 1.5 hr, 36 pressurized periods, treatment time 3 hr	
* represented a significant difference at $P < 0.01$, ** represented a significant difference at $P < 0.05$	58
5.4 Relative activity of trypsin as a function of time at room temperature and pH 7.4.....	59
5.5 Histological photographs of fresh porcine skin and ADM samples stained with H&E (400 x magnification): (a) fresh porcine skin, (b) CR4, (c) CR5, (d) CR6 (arrows indicated fibroblast cells).....	60
5.6 SEM micrographs of fresh porcine skin and ADM samples from different treatments: (a) fresh porcine skin, (b) CR1, (c) CR2, (d) CR3, (e) CR4, (f) CR5, and (g) CR6.....	61
5.7 FT-Raman spectra of porcine skin; (a) fresh porcine skin, (b) de-fat skin, (c) ADM from CR4 treatment, (d) ADM from CR5 treatment, and (e) ADM from CR6 treatment.....	62
5.8 Acellular porcine dermis; (a) top surface, (b) bottom surface.....	63
5.9 Photographs of retrieved ADM samples produced from CR5 (trypsin model) and CR6 (dispase II model) treatment at 1-, 2- and 4-week postoperatively: (a) CR5 after 1-week, (b) CR5 after 2-week, (c) CR5 after 4-week, (d) CR6 after 1-week, (e) CR6 after 2- week, and (f) CR6 after 4-week.....	64
5.10 SEM micrographs of CR5 (trypsin model) implanted samples retrieved at 1-, 2- and 4-week postoperatively: C1 represents region at the sample edge, C2 is at the depth of 0.25 cm from the edge, and C3 is at the center of implanted samples.....	65

FIGURE	PAGE
5.11 SEM micrographs of CR6 (dispase II model) implanted samples retrieved at 1-, 2- and 4-week postoperatively: C1 represents region at the sample edge, C2 is at the depth of 0.25 cm from the edge, and C3 is at the center of implanted samples.....	66
5.12 Histological photographs of CR5 (trypsin model) and CR6 (dispase II model) implanted ADM at 2- and 4-week postoperatively (100 x magnification): (a) CR5 at 2-week, (b) CR6 at 2-week, (c) CR5 at 4-week, (d) CR6 at 4-week. Dash line represented an interface between host tissue (rat) and implanted sample.....	67
B-1 Standard curve of DNA assay using L929 mouse fibroblasts.....	78