

การเตรียมไฮโดรเจลจากไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก เพื่อใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ



นางสาวอนงค์นาฏ ดวงภักดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF HYDROGELS FROM THAI SILK FIBROIN/GELATIN/HYALURONIC ACID
FOR THE USE AS SCAFFOLDS

Miss Anongnart Duangpakdee



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment 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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

อนงค์นาฏ ดวงภักดี : การเตรียมไฮโดรเจลจากไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก เพื่อใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ (PREPARATION OF HYDROGELS FROM THAI SILK FIBROIN/GELATIN/HYALURONIC ACID FOR THE USE AS SCAFFOLDS) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, 163 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมไฮโดรเจลจากไฟโบรอินไหมไทย (SF) เจลาติน (G) และกรดไฮยาลูรอนิก (HA) เพื่อใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเตรียมไฮโดรเจลในสัดส่วนผสมโดยน้ำหนัก SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและเชื่อมขวางด้วยการแช่ในสารละลาย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากผลการศึกษาพบว่า EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ สามารถเชื่อมขวางไฮโดรเจลทั้งสามชนิดได้สำเร็จ ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยมีร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลที่หายไปประมาณ 4-5 ส่วนปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ในไฮโดรเจลผสมภายหลังการเชื่อมขวางมีค่าใกล้เคียงกับก่อนการเชื่อมขวาง แสดงให้เห็นว่า EDC สามารถเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกไว้ได้เกือบทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลพบว่า ไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบมีรูพรุนเฉลี่ยขนาดใหญ่กว่า ไฮโดรเจลที่มีโปรตีนเพียงอย่างเดียว สำหรับโครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลที่ผ่านการเชื่อมขวางมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งคาดว่าเกิดจากสองสาเหตุหลัก คือ จากการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในกระบวนการเชื่อมขวางและผลของปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย EDC เมื่อแช่ไฮโดรเจลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ไฮโดรเจลที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิก 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละการดูดซับน้ำสูงที่สุดประมาณ 5200 (52 เท่า) ผลทดสอบความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า ไฮโดรเจลที่มีสัดส่วนของโปรตีน 100 เปอร์เซ็นต์ จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV เร็วกว่าไฮโดรเจลที่มีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ แต่ไฮโดรเจลผสมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิก 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะเกิดการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำเร็วกว่าไฮโดรเจลชนิดอื่น ผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนูชนิด NIH/3T3 พบว่า เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบของกรดไฮยาลูรอนิกได้ค่อนข้างดีกว่ากรณีไฮโดรเจลที่เป็นสารโปรตีนแต่เพียงอย่างเดียว เนื่องจากสมบัติอุ้มน้ำสูงของกรดไฮยาลูรอนิก อย่างไรก็ตามโมเลกุลที่เป็นประจุลบของกรดไฮยาลูรอนิกส่งผลให้เซลล์ที่เกาะและเติบโตบนไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบมีลักษณะค่อนข้างกลม จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีสมบัติเบื้องต้นเหมาะสมสำหรับการพัฒนาต่อยอดเป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

5670452421 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: SILK FIBROIN, GELATIN, HYALURONIC ACID, CROSSLINKING, CARBODIIMIDE

ANONGNART DUANGPAKDEE: PREPARATION OF HYDROGELS FROM THAI SILK FIBROIN/GELATIN/HYALURONIC ACID FOR THE USE AS SCAFFOLDS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., 163 pp.

This research aimed to fabricate hydrogels from Thai silk fibroin/gelatin/hyaluronic acid (SFGHA) for the use as scaffolds. The hydrogels at different weight ratios including SF50G50, SF50G25HA25, and SF50HA50 were prepared by freeze-drying technique and crosslinking by immersion in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) solution in ethanol as a solvent. The results showed that 20 mM of EDC could be successfully used to crosslink SFGHA hydrogels at the crosslinking time of 6 h. The weight loss of all hydrogels after crosslinking was in the range of 4-5%. The contents of N-acetyl-D-glucosamine of hydrogels before and after crosslinking were rather similar. This suggested that most HA molecules could be crosslinked by EDC. The cross-sectional morphology of obtained hydrogels showed that increasing HA content would result in larger pore size of blended hydrogels. The results on ATR-FTIR proved that the chemical structure of hydrogels before and after crosslinking were different, possibly because of two main causes including ethanol used as the solvent in crosslinking process and the reactions of EDC crosslinking. To test water absorption all hydrogels were soaked in phosphate buffer saline (PBS) at 37°C. It was observed that the degrees of water absorption of hydrogels containing 25 and 50% of HA were around 5200% (or 52 fold). The results on degradation of hydrogels showed that protein hydrogels (SF50G50) was degraded in protease XIV solution faster than hydrogels with polysaccharide incorporation. But hydrogel with 50% of HA could be hydrolyzed via ester bond faster than others hydrogels when it was immersed in culture medium. The hydrogels with HA incorporation could support attachments and proliferation of NIH/3T3 mouse embryonic fibroblasts better than other hydrogels, possibly because of high hygroscopic properties of HA. However, the morphology of attached cells were quite round due to highly negative charges of the HA. The results indicated that SFGHA hydrogels possessed suitable properties for further use as scaffolds.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงการวางแผนการวิจัย แนวทางการดำเนินการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และการอบรมให้ความรู้ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อนงค์นาฏ สมหวังธนโรจน์ ประธาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ ดร. จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ วรมงคลชัย กรรมการ ที่สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำต่าง ๆ มากมาย

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ ที่อนุเคราะห์รังไหมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพ.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblasts, NIH/3T3) สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อและห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือกลาง (Chula MRC) คณะแพทยศาสตร์ ห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินการทดลอง รวมทั้งเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณรุ่งนภา แยมเดช คุณกันยาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์ คุณปิยะรัตน์ สังข์พันธุ์ คุณเทพฤทธิ์ วงศ์ภาคำ และคุณศุภวิชญ์ จันทน์ขาว รวมทั้งพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ สำหรับกำลังใจ คำแนะนำและการให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านสำหรับการดำเนินการวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจ คำปรึกษา และสนับสนุนการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ทำให้ผู้วิจัยก้าวผ่านอุปสรรคต่าง ๆ และดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 มूलเหตุจูงใจและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering).....	6
2.2 ไฮโดรเจล (hydrogel).....	7
2.3 กระบวนการขึ้นรูปไฮโดรเจล.....	8
2.3.1 การขึ้นรูปแบบหลอมเหลว (melt molding).....	8
2.3.2 การชะล้างเกลือ (salt leaching).....	8
2.3.3 อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning).....	9
2.3.4 กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying).....	10
2.4 ชีววัสดุ (Biomaterials).....	15
2.4.1 ไหม (Silk).....	16
2.4.1.1 โครงสร้างของเส้นใยไหม.....	16
2.4.1.2 สมบัติของไหม.....	21
2.4.1.3 การประยุกต์ใช้งานของไหม.....	22

2.4.2 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid).....	22
2.4.2.1 โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิก	23
2.4.2.2 สมบัติของกรดไฮยาลูรอนิก	25
2.4.2.3 การย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิก	26
2.4.2.4 บทบาทของกรดไฮยาลูรอนิกต่อการหายของบาดแผล.....	27
2.4.2.5 การประยุกต์ใช้งานของกรดไฮยาลูรอนิก	30
2.4.3 เจลาติน (Gelatin).....	30
2.4.3.1 โครงสร้างของเจลาติน.....	32
2.4.3.2 สมบัติของเจลาติน.....	33
2.4.3.3 การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน.....	34
2.5 การเชื่อมขวาง (Crosslinking).....	37
2.5.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical Crosslinking).....	37
2.5.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment, DHT).....	38
2.5.1.2 การเชื่อมขวางด้วยการฉายรังสีแกมมา (Gamma ray).....	39
2.5.1.3 การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Irradiation, UV)	43
2.5.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking)	43
2.5.2.1 การเชื่อมขวางผ่านหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล	44
2.5.2.2 การเชื่อมขวางผ่านหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล	49
2.6 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility).....	61
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย.....	69
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	69
3.2 อุปกรณ์.....	70
3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย	72

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	73
3.4.1 การเตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก	73
3.4.1.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน สารละลายเจลาติน และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก	73
3.4.1.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะของสารละลาย	75
1. การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลาย	75
2. การวิเคราะห์ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) ของสารละลาย ..	75
3.4.1.3 การขึ้นรูปไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก.....	76
3.4.1.4 การเชื่อมขวางทางเคมีของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก.....	76
3.4.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม .	77
3.4.2.1 การวิเคราะห์สภาวะการเชื่อมขวางที่เหมาะสมในการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก.....	77
1. การวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลหลังจากผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง	77
2. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระคงเหลือในไฮโดรเจลหลังผ่านการเชื่อมขวางโดยใช้เทคนิค 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)	78
3. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) ในไฮโดรเจล หลังผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay ..	79
3.4.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลผสมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)	81
3.4.2.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสมด้วย Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR).....	81

3.4.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำ (Water absorption) ของไฮโดรเจลผสม.....	81
3.4.2.5 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (In vitro biodegradation) ของไฮโดรเจลผสม	82
3.4.2.6 การวิเคราะห์ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสมกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast cell line, NIH/3T3)	83
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	88
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	88
4.1 คุณลักษณะของสารละลายบริสุทธิ์และสารละลายผสม SFGHA.....	88
4.1.1. ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) สารละลายเจลาติน (G100) และสารละลายผสม SFGHA.....	88
4.1.2 ค่าความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) สารละลายเจลาติน (G100) สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) และสารละลายผสม SFGHA.....	93
4.2 ผลของความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางของไฮโดรเจล.....	94
4.2.1. ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจล	94
4.2.2. ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระคงเหลือในไฮโดรเจลผสม SFGHA และร้อยละหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงภายหลังผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง.....	98
4.2.3. ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) คงเหลือในไฮโดรเจลภายหลังการเชื่อมขวาง	103
4.3 คุณลักษณะและสมบัติของไฮโดรเจลผสม SFGHA	106
4.3.1 สมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลผสม SFGHA	106
4.3.1.1 โครงสร้างสัณฐานภายในของไฮโดรเจลผสม SFGHA ก่อนและหลังผ่านการเชื่อมขวาง.....	106

4.3.1.2	โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสม SFGHA ก่อนและหลังการเชื่อมขวาง	109
4.3.1.3	ความสามารถในการดูดซับน้ำ (water absorption) ของไฮโดรเจลผสม SFGHA ภายหลังจากการเชื่อมขวาง.....	113
4.3.2	สมบัติทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม SFGHA	115
4.3.2.1	ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม SFGHA ในระดับห้องปฏิบัติการ	115
	1) การย่อยสลายไฮโดรเจลผสม SFGHA ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV (Protease XIV) ในระดับห้องปฏิบัติการ.....	115
	2) การย่อยสลายไฮโดรเจลผสม SFGHA ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ ในระดับห้องปฏิบัติการ	117
4.3.2.2	การทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast cell line, NIH/3T3) บนไฮโดรเจลผสม SFGHA	119
	1) การยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลผสม	120
	2) การเจริญเติบโตของเซลล์บนไฮโดรเจลผสม.....	122
	3) โครงสร้างสัณฐานของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม.....	126
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	131
5.1	สรุปผลการทดลอง	131
5.2	ข้อเสนอแนะ	133
	รายการอ้างอิง	134
	ภาคผนวก ก ค่าศักย์เซต้าของสารละลายและสารละลายผสม.....	147
	ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานของ beta-Alanine.....	148
	ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine.....	149
	ภาคผนวก ง ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสมภายหลังจากการเชื่อมขวางด้วย EDC.....	150

ภาคผนวก จ ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือในไฮโดรเจลหลังการแช่ในสารละลาย เอนไซม์โปรติเอส XIV และอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM.....	151
ภาคผนวก ฉ จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast cell line, NIH/3T3).....	153
ภาคผนวก ช การเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (NIH/3T3) ที่เพาะเลี้ยง บนไฮโดรเจลผสม SFGHA	157
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	163



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	องค์ประกอบของเส้นใยไหม	17
ตารางที่ 2.2	องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซินของ <i>Bombyx mori</i>	19
ตารางที่ 2.3	สมบัติทางกลของพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ	21
ตารางที่ 2.4	ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่สกัดได้จากอวัยวะส่วนต่างๆของหนู	23
ตารางที่ 2.5	น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกจากแหล่งต่าง ๆ	24
ตารางที่ 2.6	ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิก (มิลลิกรัมต่อกรัม) จากแหล่งต่าง ๆ	28
ตารางที่ 2.7	กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเจลาติน	33
ตารางที่ 2.8	สมบัติของเจลาติน ชนิดเอและชนิดบี	34
ตารางที่ 2.9	สรุปการเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิก	55
ตารางที่ 2.10	การเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิกกับชีววัสดุอื่น ๆ	57
ตารางที่ 2.11	ตัวอย่างเซลล์และแหล่งที่พบ	62
ตารางที่ 3.1	สัญลักษณ์แทนไฮโดรเจลที่เชื่อมขวางที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ	77
ตารางที่ 4.1	ค่าความหนืดของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาติน สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก และสารละลายผสม SFGHA ที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของของแข็งรวมเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก.....	94
ตารางที่ 4.2	ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของไฮโดรเจลผสม SFGHA ก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	109
ตารางที่ 4.3	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม SFGHA แต่ละชนิด ที่เชื่อมขวางด้วย EDC.....	124
ตารางที่ ก.1	ค่าศักยภาพเต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายเจลาติน (G100) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายผสม SF50G50,	

SF50G25HA25, และ SF50HA50 โดยมีความเข้มข้นของของแข็งรวมเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9 147

ตารางที่ ง.1 ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลที่เชื่อมขวางด้วย EDC ภายหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (PBS) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 150

ตารางที่ จ.1 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 151

ตารางที่ จ.2 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ 152

ตารางที่ ข.1 ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม 159



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 การขึ้นรูปโครงร่างด้วยกระบวนการล้างเกลือ	9
รูปที่ 2.2 แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์	11
รูปที่ 2.3 การเปรียบเทียบเวลาและอุณหภูมิในการทำแห้ง	12
รูปที่ 2.4 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง	12
รูปที่ 2.5 การถ่ายเทมวลสารและพลังงานในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง	14
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม	17
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเส้นใยไฟเบอร์อิน	20
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของเซรีซิน.....	21
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิก	24
รูปที่ 2.10 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอและบี	31
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเจลาติน	32
รูปที่ 2.12 การเชื่อมขวางโปรตีนด้วยความร้อน	39
รูปที่ 2.13 การสลายตัวของ Co-60	40
รูปที่ 2.14 การเกิดหมู่เอมีโนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางโดยใช้รังสีอัลตราไวโอ เลต	43
รูปที่ 2.15 ตำแหน่งสำหรับการเชื่อมขวางทางเคมีของโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิก	44
รูปที่ 2.16 การเชื่อมขวางของกรดไฮยาลูรอนิกด้วย EDC ร่วมกับ NHS หรือ HOBt	44
รูปที่ 2.17 การเชื่อมขวางของกรดไฮยาลูรอนิกด้วย poly(ethylene glycol) diglycidyl (PEGDG).....	50
รูปที่ 2.18 การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกด้วย DVS	50
รูปที่ 2.19 การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกด้วยกลูตารัลดีไฮด์	51
รูปที่ 2.20 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์	52
รูปที่ 2.21 โครงสร้างของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู	62

รูปที่ 2.22 กราฟจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 25,000 เซลล์ต่อ 24 well plate (12,500 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร)	64
รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	72
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน	74
รูปที่ 3.3 ปฏิกริยาระหว่าง 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)	79
รูปที่ 3.4 ปฏิกริยาของ Elson-Morgan assay	80
รูปที่ 3.5 ตำแหน่งภาพตัดขวางของไฮโดรเจล.....	87
รูปที่ 4.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายเจลาติน (G100) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายผสม SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 โดยมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9	89
รูปที่ 4.2 ลักษณะของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) และสารละลายผสม SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 โดยมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9	91
รูปที่ 4.3 ลักษณะการเกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีนที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ กัน [109]	92
รูปที่ 4.4 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปภายหลังกระบวนการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วยการแช่ในตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 80:20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่ 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาในการเชื่อมขวาง (ก) 6, (ข) 12, และ (ค) 24 ชั่วโมง	97
รูปที่ 4.5 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระคงเหลือในไฮโดรเจลผสม SFGHA ชนิดต่าง ๆ (กราฟด้านซ้าย) ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ในตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 80:20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเชื่อมขวางเป็นเวลา (ก) 6, (ข) 12, และ (ค) 24 ชั่วโมง ส่วนกราฟด้านขวาแสดงร้อยละหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงภายหลังการเชื่อมขวาง	101
รูปที่ 4.6 กลไกการเชื่อมขวางระหว่างโปรตีนกับโปรตีน และโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์	102

รูปที่ 4.7 ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine คงเหลือในไฮโดรเจลผสม SFGHA ภายหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่ 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาในการเชื่อมขวางเท่ากัน คือ (ก) 6, (ข) 12, และ (ค) 24 ชั่วโมง.....	105
รูปที่ 4.8 ลักษณะภายนอกของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC.....	106
รูปที่ 4.9 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลผสม SFGHA ชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา.....	108
รูปที่ 4.10 สเปกตรัมค่าการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของไฮโดรเจลผสม SFGHA ทั้งสามชนิด ก่อน (NC) และหลัง (C) การเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 80:20 เปรอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy โดยเทคนิค Attenuated total reflectance mode (FTIR-ATR)	112
รูปที่ 4.11 ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยการแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	114
รูปที่ 4.12 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.....	117
รูปที่ 4.13 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 0.1% Penicillin-streptomycin) ที่สภาวะการเพาะเลี้ยง (ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปรอร์เซ็นต์).....	119
รูปที่ 4.14 ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม SFGHA แต่ละชนิด ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, และ 6 ชั่วโมง ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปรอร์เซ็นต์ ความหนาแน่นเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (cell seeding) 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร	121

รูปที่ 4.15 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SFGHA แต่ละชนิด แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยที่ 1 (ด้านเพาะเลี้ยง; seeding) และ 2 (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร).....	122
รูปที่ 4.16 จำนวนเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม SFGHA ชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร	124
รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร.....	126
รูปที่ 4.18 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SF50G50 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่ตำแหน่ง ก) 1 (ด้านเพาะเลี้ยง, seeding), ข) 2, ค) 3, และ ง) 4 (ด้านที่สัมผัสกับจานเลี้ยงเซลล์) (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร).....	128
รูปที่ 4.19 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่ตำแหน่ง ก) 1 (ด้านเพาะเลี้ยง, seeding), ข) 2, ค) 3, และ ง) 4 (ด้านที่สัมผัสกับจานเลี้ยงเซลล์) (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร).....	129
รูปที่ 4.20 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SF50HA50 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่ตำแหน่ง ก) 1 (ด้านเพาะเลี้ยง, seeding), ข) 2, ค) 3, และ ง) 4 (ด้านที่สัมผัสกับจานเลี้ยงเซลล์) (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร).....	130
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -Alanine ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร.....	148
รูปที่ ค.1 กราฟสแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดของสารละลาย	149
รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetyl-D-glucosamine ที่ความยาวคลื่น 528 นาโนเมตร.....	149
รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ NIH/3T3.....	153
รูปที่ ฉ.2 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NIH/3T3.....	154

- รูปที่ ฉ.3** รูปร่างของเซลล์ NIH/3T3 หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน..... 156
- รูปที่ ข.1** กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ NIH/3T3 วัดโดยวิธี DNA..... 157
- รูปที่ ข.2** จำนวนเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร..... 158



บทที่ 1

บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจและที่มาของงานวิจัย

งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการปลูกถ่าย หรือทดแทนอวัยวะที่เสียหาย โดยทั่วไปเนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะประกอบด้วยเซลล์และเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extra cellular matrix; ECM) ทั้งนี้โครงเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ใช้เป็นองค์ประกอบสำหรับสร้างเนื้อเยื่อ ซึ่งจะทำหน้าที่เสมือนเป็นเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ เป็นที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ และเซลล์สามารถเปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างเฉพาะของเนื้อเยื่อได้ [1] โครงเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมควรมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ มีพื้นผิวที่เหมาะสมสำหรับให้เซลล์ยึดเกาะ อัตราการย่อยสลายจะสัมพันธ์กับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และมีสมบัติเชิงกลที่ดี

ในปัจจุบันโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผลิตจากพอลิเมอร์ธรรมชาติได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างมาก เนื่องด้วยสมบัติเด่นทางชีวภาพ อาทิ สามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ในร่างกาย ทั้งนี้พอลิเมอร์ธรรมชาติมีสมบัติทางกลและความแข็งแรงต่ำ และมีการย่อยสลายได้เร็วเมื่อเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ จึงทำให้มีการพัฒนาข้อต่อยเหล่านี้ด้วยการนำพอลิเมอร์ที่มีสมบัติเด่นด้านต่าง ๆ มาผสมเข้าด้วยกัน เพื่อปรับปรุงสมบัติบางประการให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การสร้างพันธะทางเคมีภายใน หรือระหว่างสายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์ หรือ “การเชื่อมขวาง” ส่งผลทำให้สมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไป คือ ทำให้อัตราการย่อยสลายช้าลง มีสมบัติทางกลดีขึ้น ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งาน ชีววัสดุที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารอินทรีย์ประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Hetero polysaccharide) ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharides) เป็นน้ำตาล 2 ชนิด ได้แก่ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucuronic acid กรดไฮยาลูรอนิกมีน้ำหนักโมเลกุลสูง และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเมทริกซ์นอกเซลล์ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น กระดูกอ่อน หงอนไก่ เป็นต้น [2] กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารที่ร่างกายสามารถผลิตขึ้นเองได้ จึงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกาย มีความสามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

นอกจากนี้หมู่คาร์บอกซิล ซึ่งมีประจุลบทำให้กรดไฮยาลูรอนิกมีสมบัติเป็น polyanionic และมีความชอบน้ำและอุ้มน้ำได้สูง ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้กรดไฮยาลูรอนิกช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี จากสมบัติเหล่านี้จึงทำให้กรดไฮยาลูรอนิกเป็นชีววัสดุที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และเครื่องสำอาง [3] รวมทั้งใช้รักษาโรคข้อเข่าเสื่อม

ทั้งนี้กรดไฮยาลูรอนิกมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เมื่อนำไปใช้งานจึงอาจจะไม่มีความเหมาะสม เพราะมีความหนืดสูง จึงมีการย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลให้มีขนาดสั้นลง เพื่อให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกลดลง ซึ่งกรดไฮยาลูรอนิกที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถทำให้เกิดหลอดเลือดใหม่ กระตุ้นให้เกิดการอักเสบและช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกที่มีขนาดใหญ่ [4] นอกจากนี้กรดไฮยาลูรอนิกยังมีข้อจำกัดอีกหนึ่งอย่าง คือ เป็นชีววัสดุที่ไม่แข็งแรง และมีความชอบน้ำสูงจึงสามารถละลายน้ำได้ง่าย การนำกรดไฮยาลูรอนิกไปประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวการแพทย์ จึงต้องมีการปรับปรุงสมบัติดังกล่าว โดยการนำชีววัสดุธรรมชาติชนิดอื่นมาผสม เช่น เจลาติน คอลลาเจน แอลจีเนต และไฟโบรอิน เป็นต้น

ไฟโบรอินไหมไทย เป็นโปรตีนเส้นใยที่ได้มาจากหนอนไหมประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ ไฟโบรอินประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และเซรีซินประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ [5] เส้นใยไฟโบรอินมีสมบัติทางกลค่อนข้างดี มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จึงนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

เจลาตินเป็นโปรตีนที่สกัดได้จากคอลลาเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เจลาตินสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมีความเข้ากันได้กับร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ และยังช่วยการยึดเกาะของเซลล์ ดังนั้นเจลาตินจึงถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง ด้วยการนำมาผสมกับวัสดุชีวภาพอื่น ๆ ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ และขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ [6] ไฮโดรเจล [7] พิล์ม [8] และเส้นใย [9] เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม การนำชีววัสดุที่มีสมบัติเด่นต่าง ๆ มาผสมกันอาจจะมีผลเสียไม่เพียงพอดังนั้นการเชื่อมขวางชีววัสดุเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเสริมความเสถียรได้ ซึ่งการเชื่อมขวางทำได้ทั้งทางกายภาพ (เช่น ความร้อน และรังสี) และทางเคมี (เช่น การใช้กลูตารัลดีไฮด์ ไดไวนิลซัลโฟน เป็นต้น) งานวิจัยนี้เลือกใช้การเชื่อมขวางทางเคมี โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการเชื่อมขวางคอลลาเจน [10] เจลาติน [11] ไคโตซาน [12] และกรดไฮยาลูรอนิก [7] โดยการเกิดปฏิกิริยา

Amidation ผ่านหมู่คาร์บอกซิลเกิดเป็นพันธะเอสเทอร์และพันธะเอไมด์ การใช้ EDC เป็นสารเชื่อมขวางมีข้อดีคือ ภายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการเชื่อมขวางจะได้อนุพันธ์ของยูเรียหรือ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) urea ซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และสามารถกำจัดออกได้ง่ายด้วยการล้างน้ำ จากการรายงานมีการใช้ EDC เชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกกับเจลาตินเพื่อปรับปรุงสมบัติการบวมน้ำ [6] รวมทั้งการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินไคโตซาน และกรดไฮยาลูรอนิก ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS/MES ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อสมบัติทางความร้อนและสมบัติทางกายภาพ และเมื่อความเข้มข้นของเจลาตินเปลี่ยนจะส่งผลต่อขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ผสม รวมทั้งการเจริญเติบโตและการยึดเกาะของเซลล์ [12] นอกจากนี้ในปี 2010, Ratanavaraporn, J. และคณะ [13] ได้ทำการศึกษาการเชื่อมขวางเส้นใยเจลาตินชนิดเอและชนิดบีด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ การใช้ความร้อน สารเคมี และใช้พลาสมา

ทั้งนี้ไฮโดรเจลซึ่งเป็นโครงสร้างรูพรุนสามมิติเป็นรูปแบบหนึ่งของโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อที่นิยมผลิต เนื่องจากมีรูพรุนและความพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากทำให้ดูดซับน้ำได้ดี โดยไฮโดรเจลสามารถเตรียมได้หลายวิธี ได้แก่ การชะล้างเกลือ (salt leaching) อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) เป็นต้น ในงานวิจัยนี้เลือกการขึ้นรูปไฮโดรเจลด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เพราะเป็นกระบวนการทำให้เกิดรูพรุนด้วยโมเลกุลของน้ำ ทำให้ไม่มีสารเคมีตกค้างภายหลังกระบวนการขึ้นรูป และสามารถควบคุมขนาดของรูพรุนด้วยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็ง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการเตรียมไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยเจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิกที่สัดส่วนผสมต่าง ๆ กัน และทำการเชื่อมขวางไฮโดรเจลด้วยการแช่ในตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งมี 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) เป็นสารเชื่อมขวาง โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเชื่อมขวาง อาทิ ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง เป็นต้น และศึกษาสมบัติทางกายภาพ และสมบัติด้านต่าง ๆ ของไฮโดรเจลผสม เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ไฮโดรเจลผสมสำหรับเป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อหาสภาวะในการเตรียมไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก
- 1.2.2 เพื่อศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสมที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 เตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF) พันธุนางน้อยศรีษะเกษ 1 สารละลายเจลาตินชนิดเอ (G) และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA) ให้ได้สารละลายผสมที่มีน้ำหนักรวมของของแข็งเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
- 1.3.2 ขึ้นรูปไฮโดรเจลผสม SFGHA จากสารละลายผสมที่มีน้ำหนักของของแข็งรวมเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยมีตัวแปรที่ศึกษาได้แก่
- 1.3.2.1 สัดส่วนผสมโดยน้ำหนัก SFGHA = SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50
- 1.3.2.2 ความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง: 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์
- 1.3.2.3 เวลาในการเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวาง EDC: 6, 12, และ 24 ชั่วโมง
- 1.3.3 วิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม SFGHA ดังนี้
- 1.3.3.1 ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายและสารละลายผสม
- 1.3.3.2 ค่าความหนืดของสารละลายและสารละลายผสม
- 1.3.3.3 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลผสมหลังการเชื่อมขวาง
- 1.3.3.4 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยเทคนิค 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)
- 1.3.3.5 ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay

1.3.3.6 โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลผสม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning Electron Microscope; SEM)

1.3.3.7 โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสม ด้วย Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

1.3.3.8 ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสม SFGHA

1.3.3.9 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในสภาวะที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3.3.10 การยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast cell line, NIH/3T3) บนไฮโดรเจลผสม

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้ไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก ที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และผ่านการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมด้วยสารละลาย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) ที่มีความเสถียรและมีสมบัติเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์แขนงใหม่เชิงสหวิทยาการ ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อเพื่อทดแทน ซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับความเสียหายหรือสูญหาย ซึ่งโดยปกติจะไม่มีการงอกใหม่ในมนุษย์ เช่น ผิวหนังแท้ เส้นประสาท กระดูก กระดูกอ่อน กล้ามเนื้อ หัวใจ เป็นต้น หลักการสำคัญของวิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกได้ 3 องค์ประกอบหลักคือ เซลล์ (cell) โกรว์ทแฟกเตอร์ (growth factor) และเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) หรือโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ (scaffold) สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ นอกจากใช้เมทริกซ์ภายนอกเซลล์เป็นโครงร่างสำหรับให้เซลล์ยึดเกาะ แล้วยังสามารถใช้วัสดุพอลิเมอร์ผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ไม่ได้ทำหน้าที่เพียงแคให้เซลล์ยึดเกาะ แต่ยังเป็นตัวเชื่อมต่อและส่งสัญญาณระหว่างเซลล์กับสภาวะภายนอก วัสดุที่นิยมนำมาใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ ชีววัสดุ เช่น เจลาติน ไพโบรอน และคอลลาเจน หรือวัสดุสังเคราะห์ เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinylalcohol, PVA) พอลิคาร์โปลาแลกโตน (polycaprolactone, PCL) เป็นต้น ซึ่งชนิดของวัสดุที่ใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญต่อชนิดของเนื้อเยื่อที่ต้องการสร้างและตำแหน่งที่ต้องการซ่อมแซม การเลือกใช้ควรพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ ตัวอย่างเช่น การใช้คอลลาเจน สำหรับเนื้อเยื่อที่ต้องการความยืดหยุ่นและเข้ากับเซลล์ร่างกายได้ดี หรือการใช้พอลิเมอร์ที่มีความชอบน้ำทำให้พอลิเมอร์สามารถจับกับโมเลกุลที่ชอบน้ำได้ดี เมื่อนำไปใช้งานในร่างกาย อย่างไรก็ตามลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ยังส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ โดยรูปแบบของโครงเลี้ยงเซลล์ที่พบ ได้แก่ ฟิล์ม เจล เส้นใย ไฮโดรเจล เป็นต้น รูปแบบโครงสร้างแตกต่างกันส่งผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อของเซลล์ที่ต่างกัน เช่น พอลิเมอร์ที่มีความเป็นระเบียบสูงทำให้มีความแข็งแรง มีเสถียรภาพในการใช้งานทำให้เหมาะกับเนื้อเยื่อที่ต้องรับแรงที่ดี เช่น เนื้อเยื่อกระดูก [14] ในขณะที่พอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างมีความเป็นระเบียบน้อยทำให้มีความแข็งแรงต่ำ และมีการดูดซับน้ำและการบวมตัวที่ดี เหมาะสำหรับเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการความแข็งแรงมาก เช่น เนื้อเยื่อผิวหนัง เนื้อเยื่อไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีความเข้ากันได้กับเซลล์ร่างกายโดยไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของร่างกาย และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อพฤติกรรมของเซลล์ เช่น การยึดเกาะ

(attachment) การเพิ่มจำนวน (proliferation) และการเคลื่อนย้าย (migration) รวมทั้งลักษณะทางกายภาพอื่น ๆ เช่น ขนาดของรูพรุน ความพรุน ความยืดหยุ่น และความสามารถในการรองรับน้ำหนักของเซลล์ที่จะสร้างใหม่ โดยเซลล์ที่สร้างบนโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อควรมีสสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับสถานะของเนื้อเยื่อเดิม

ในงานวิจัยนี้ได้สนใจที่จะขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจลสามมิติที่มีรูพรุนเพื่อใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยสมบัติและกระบวนการขึ้นรูปของไฮโดรเจลจะได้นำเสนอต่อไป

2.2 ไฮโดรเจล (hydrogel)

ไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นวัสดุที่ดูดซับน้ำได้มาก ภายในโครงสร้างมีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย ส่วนใหญ่ทำมาจากพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชัน เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH group), หมู่คาร์บอกซิล (-COOH group), หมู่เอไมด์ (-CONH₂ group) และหมู่ต่าง ๆ ที่เป็นอนุพันธ์ของหมู่ดังกล่าว ไฮโดรเจลที่ถูกสร้างขึ้นจะทำหน้าที่เป็นที่อยู่ชั่วคราวของเซลล์ ซึ่งเซลล์สามารถเจริญเติบโตเพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ โดยทั่วไปไฮโดรเจลมีลักษณะดังนี้ [15]

1. โครงสร้างเป็นสามมิติ เพื่อเป็นโครงสร้างค้ำจุนให้เซลล์สามารถเจริญเติบโต มีสมบัติทางกลที่สัมพันธ์กับเนื้อเยื่อ ซึ่งเมื่อทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ไฮโดรเจลสามารถช่วยป้องกันเซลล์จากอันตราย
2. มีความพรุนสูง โดยมีขนาดรูพรุนประมาณ 100-300 ไมโครเมตร และรูพรุนควรเชื่อมต่อกัน เพื่อสารอาหารและของเสียต่าง ๆ สามารถแพร่ผ่านเข้าออกโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างสะดวก
3. มีโครงสร้างทางกายภาพหรือสมบัติทางเคมีเหมาะสมสำหรับให้เซลล์ยึดเกาะ เจริญเติบโต มีการเลียนแบบโครงสร้างภายนอกเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเพื่อช่วยเชื่อมโยงกับเนื้อเยื่อและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่ที่ต้องการได้
4. สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย โดยไม่ทิ้งสารที่เป็นพิษไว้ในร่างกายสามารถกำจัดได้ตลอดเวลา และมีอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสมกับอัตราการเกิดขึ้นของเนื้อเยื่อใหม่
5. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatible)

สำหรับในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ไฮโดรเจลจะถูกนำมาใช้เนื่องจากมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดีและกักเก็บน้ำได้มาก นอกจากนี้ยังมีระดับความยืดหยุ่นคล้ายกับเนื้อเยื่อ ตัวอย่างการนำ

ไฮโดรเจลมาประยุกต์ใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น งานวิจัยในปี 2003 ของ Palsson, B., และคณะ [16] ได้รายงานว่ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปร่างโค้งช่วยให้ปฏิกิริยาตอบสนองกับเซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี รวมทั้งโครงสร้างของรูพรุนควรมีการเชื่อมโยงกันเพื่อให้เส้นเลือดสามารถเข้าไปหล่อเลี้ยงเซลล์ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้ดี ดังนั้นไฮโดรเจลจึงได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นวัสดุในทางการแพทย์ โดยไฮโดรเจลสามารถขึ้นรูปได้หลายวิธี ดังจะกล่าวในหัวข้อต่อไป

2.3 กระบวนการขึ้นรูปไฮโดรเจล

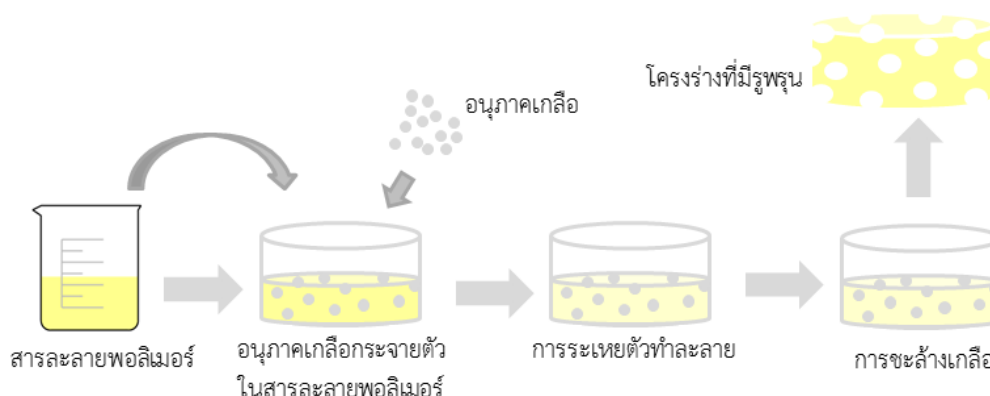
กระบวนการขึ้นรูปไฮโดรเจลมีหลายวิธีด้วยกัน แต่ละวิธีจะให้ขนาดรูพรุนและโครงสร้างสัณฐานที่แตกต่างกัน ซึ่งลักษณะของรูพรุนภายในและขนาดของรูพรุนที่ต่างกันของไฮโดรเจลเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อสมบัติของไฮโดรเจล เช่น ความว่องไวทางชีวภาพ อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ การยึดเกาะกันระหว่างไฮโดรเจลกับเซลล์ และสมบัติเชิงกล เป็นต้น วิธีการขึ้นรูปไฮโดรเจลจะแตกต่างกันโดยอาศัยความแตกต่างของการสร้างรูพรุน ตัวทำละลาย ความร้อน หรือความดันที่ใช้

2.3.1 การขึ้นรูปแบบหลอมเหลว (melt molding)

กระบวนการหลอมเหลวเป็นการหลอมพอลิเมอร์ด้วยความร้อนแล้วทำให้พอลิเมอร์หลอมเหลวแข็งตัวภายในแม่พิมพ์ วิธีการดังกล่าวนี้ต้องใช้พอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเทอร์โมพลาสติก ซึ่งสามารถหลอมละลายได้ด้วยความร้อนไม่เกิดการสลายตัวก่อนหลอมเหลว โดยสมบัติของโครงสร้างที่ได้จากกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะโครงสร้างและกระบวนการขึ้นรูปของพอลิเมอร์ ซึ่งลักษณะเฉพาะและโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่มีผลต่อสมบัติ ได้แก่ ขนาด รูปร่าง และลักษณะของโมเลกุลพอลิเมอร์ เช่น น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สูงจะมีความแข็งแรงและทนต่อแรงดึงมากกว่าพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ [17]

2.3.2 การชะล้างเกลือ (salt leaching)

เกลือเป็นสารทำให้เกิดรูพรุนชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการขึ้นรูปไฮโดรเจล โดยจะใช้อนุภาคของเกลือกระจายในสารละลายพอลิเมอร์หรือพอลิเมอร์หลอมเหลวอนุภาคของเกลือเกิดการแยกเฟสกับพอลิเมอร์ หลังจากนั้นทำให้พอลิเมอร์แข็งตัวแล้วทำการล้างเกลือออก จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน กระบวนการชะล้างเกลือแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การขึ้นรูปโครงสร้างด้วยกระบวนการล้างเกล็ด

ในกระบวนการล้างเกล็ดสามารถควบคุมขนาดและลักษณะของรูพรุนได้ 2 ส่วนคือ ส่วนของเกล็ด กล่าวคือ ขนาดของเกล็ดที่ใช้ที่มีขนาดแตกต่างกันจะทำให้ได้ขนาดรูพรุนต่างกัน และส่วนของพอลิเมอร์โดยการใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ต่างกัน โดยพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นสูงทำให้ลักษณะผนังของรูพรุนมีความหนากว่ากรณีความเข้มข้นต่ำ ทั้งขนาดและลักษณะของรูพรุนมีผลต่อสมบัติของรูปร่าง เช่น รูปร่างที่มีขนาดรูพรุนต่างกันจะมีผลต่อความแข็งแรงที่ต่างกัน [18] นอกจากนี้ขนาดของรูพรุนยังมีผลต่อการเกาะของเซลล์บนพื้นผิวด้วย กล่าวคือ เซลล์แต่ละชนิดสามารถเข้าไปอยู่ในรูพรุนที่มีขนาดต่างกัน อีกทั้งพื้นผิวผนังของรูพรุนมีผลต่อการเกาะของเซลล์ที่ต่างกัน [19] ทั้งนี้กระบวนการล้างเกล็ดมีข้อเสียคือ อาจจะมีเกล็ดตกค้างในพอลิเมอร์ได้

2.3.3 อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning)

อิเล็กโตรสปินนิง เป็นวิธีการขึ้นรูปโครงสร้างให้มีเส้นใยขนาดเล็ก โดยกระบวนการดังกล่าวทำได้โดยการใช้สนามไฟฟ้าที่สามารถยึดดึงพอลิเมอร์ที่อยู่ในสถานะสารละลายหรือหลอมเหลวให้มีเป็นเส้นใยขนาดเล็ก โดยสารละลายดังกล่าวบรรจุลงในหัวฉีดที่ปลายมีหัวเข็มขนาดเล็กที่ต่อกับวงจรไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูง ขนาดของเส้นใยที่ผลิตได้มีความสำคัญต่อสมบัติของโครงสร้าง โดยเส้นใยที่มีขนาดต่างกันจะมีผลต่อการเกาะของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ต่างกัน ดังนั้นการควบคุมขนาดของเส้นใยจึงมีความสำคัญ ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดเส้นใย คือ น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ กล่าวคือ ถ้าพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้ได้ขนาดเส้นใยใหญ่ นอกจากนี้ยังมีความหนืดของสารละลาย

ตัวทำละลาย และความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ เป็นต้น และอีกปัจจัยหนึ่งคือ พารามิเตอร์ของเครื่องมือ เช่น ความต่างศักย์สูงจะทำให้เกิดเม็ดบนเส้นใย

2.3.4 กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

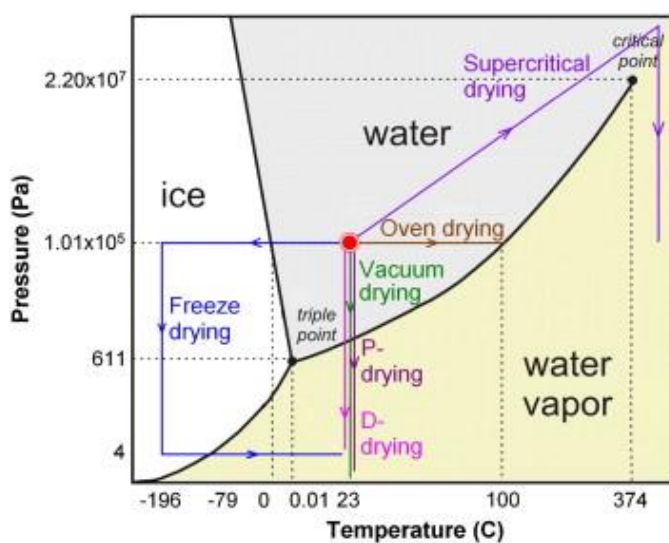
ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งในการขึ้นรูปไฮโดรเจล ซึ่งมีหลักการทำแห้งแบบเยือกแข็งและข้อดีข้อเสียดังนี้

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) หรือ การทำแห้งแบบระเหิด (Sublimation drying) มีชื่อเรียกเฉพาะว่า “Lyophilization” เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำและความดันต่ำ โดยอาศัยหลักการแช่แข็ง (Freezing) เพื่อเปลี่ยนสถานะของน้ำจากสถานะของเหลวมาเป็นของแข็ง จากนั้นทำให้เกิดการระเหิดของน้ำแข็งให้กลายเป็นไอโดยการปรับความดันให้น้ำมีค่าต่ำกว่าจุดร่วมสามสถานะ (Triple point) ของน้ำ ซึ่งเป็นจุดที่น้ำในสถานะของแข็ง ของเหลว และแก๊สสมดุลกัน ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นชิ้นงานแห้ง และมีความคงรูป โดยทั่วไปเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งนิยมใช้กับสารที่มีการสลายตัวด้วยความร้อนได้ง่าย ทำให้ไม่สามารถใช้การอบแห้งหรือการทำแห้งโดยวิธีการนำหรือพาความร้อนได้โดยตรง

ปัจจุบันเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งนิยมนำมาขึ้นรูปวัสดุสำหรับใช้ในทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น เช่น ใช้ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจลใช้เป็นระบบนำส่งยา รวมทั้งเป็นแผ่นปิดแผล เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคการทำแห้งที่นิยมใช้กับสารที่มีการสลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมนต่าง ๆ เป็นต้น

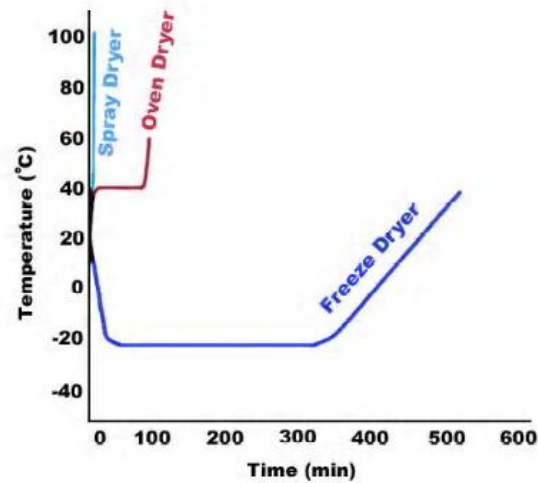
กระบวนการทำแห้ง สามารถอธิบายได้จากแผนภูมิสถานะ (Phase diagram) ของน้ำบริสุทธิ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 การทำแห้งโดยทั่วไป (conventional drying) จะให้พลังงานความร้อนกับผลิตภัณฑ์ จนถึงระดับความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ (Latent heat of evaporation) ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะกลายเป็นไอ แต่สำหรับการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็งหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็ง ทำการลดความดันสุญญากาศลงจนต่ำกว่าความดันของจุดร่วมสามสถานะ (triple point pressure) ของน้ำ (น้ำแข็งระเหิดที่ความดันเท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า) หลังจากนั้นให้พลังงานความร้อนแฝงของการระเหิด (Latent heat of sublimation) เพื่อให้น้ำแข็งระเหิดเป็นไอได้อย่างสมบูรณ์

โดยทั่วไปน้ำในผลิตภัณฑ์แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ น้ำอิสระ (free water) และน้ำที่ถูกยึดไว้ด้วยพันธะทางเคมี (bound water) อย่างไรก็ตาม ปริมาณความชื้นหรือน้ำที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่ได้อยู่ในรูปของน้ำบริสุทธิ์ มักจะอยู่ผสมกับสารอื่น ๆ ในรูปของตัวทำละลาย ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของสาร ดังนั้นในการทำแห้งแบบเยือกแข็งของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจึงมีข้อจำกัดและลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ



รูปที่ 2.2 แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์ [20]

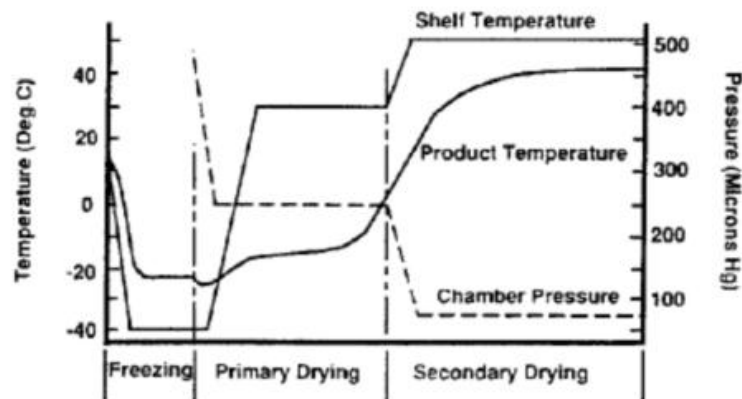
การทำแห้งแบบเยือกแข็งมีลักษณะที่แตกต่างไปจากการทำแห้งแบบอื่น ๆ คือ เป็นการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำและความดันต่ำ ซึ่งจากรูปที่ 2.3 เป็นการเปรียบเทียบเวลาและอุณหภูมิต่ำในการทำให้แห้ง จะเห็นได้ว่าการทำแห้งแบบเยือกแข็งใช้อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน ในขณะที่การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) และการทำแห้งในตู้อบ (oven dryer) จะใช้อุณหภูมิสูงในเวลาสั้น



รูปที่ 2.3 การเปรียบเทียบเวลาและอุณหภูมิในการทำแห้ง [21]

ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็งประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน (ดังแสดงในรูปที่ 2.4)

ดังนี้



รูปที่ 2.4 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง [22]

1. การแช่เยือกแข็ง (Freezing) เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ลงจนถึงจุดเยือกแข็งหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้ น้ำหรือสารละลายเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนสำคัญของขั้นตอนนี้ คือ การเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยอัตราการแช่แข็ง (Freezing rate) ควรมีอัตราสูงเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก ซึ่งลักษณะของผลึกเช่นนี้ไม่ทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์เสียหาย แต่ถ้าอัตราการแช่แข็งต่ำส่งผลให้ระยะเวลาในการรวมตัวของน้ำเพื่อเกิดเป็นผลึกมากขึ้น

ทำให้ผลึกน้ำแข็งที่ได้มีขนาดใหญ่ ซึ่งเปิดช่องว่างระหว่างโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ ทำให้ได้รับความเสียหาย อุณหภูมิการแช่แข็งที่ต่างกันจะส่งผลทำให้ได้ขนาดรูพรุนต่างกันด้วย

ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิการแช่แข็งต่อขนาดรูพรุนของผลิตภัณฑ์ เช่น งานวิจัยในปี 1990 ของ Kang, H.-W. และคณะ [23] ได้ทำการขึ้นรูปไฮโดรเจลจากเจลาตินด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สำหรับใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และศึกษาอุณหภูมิการแช่แข็ง ได้แก่ -20, -80, และ -196 องศาเซลเซียส (ไนโตรเจนเหลว) พบว่า ไฮโดรเจลที่แช่ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิการแช่แข็งต่ำ) ทำให้ความหนาแน่นของรูพรุนในไฮโดรเจลเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับอุณหภูมิการแช่แข็งที่ -20 และ -80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า ขนาดรูพรุนที่อัตราการแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส มีขนาดใหญ่และไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากโมเลกุลของน้ำรวมตัวกับโมเลกุลที่ชอบน้ำในเจลาติน ทำให้ผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการแช่แข็งทำให้ขนาดของรูพรุนมีขนาดเล็ก

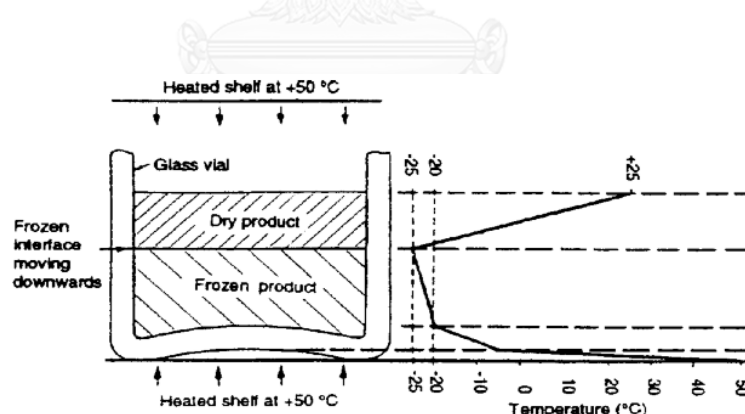
เมื่อปี 2009 Mandal, B. B. และคณะ [24] ได้ศึกษาผลของขนาดรูพรุน ความพรุนและการเชื่อมโยงภายในรูพรุนต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน โดยใช้สารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ (2, 4, และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิในการแช่แข็ง (-20, -80, และ -196°C) จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อลดอุณหภูมิในการแช่แข็งลง ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็ก ส่งผลให้รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดลดลง แต่ในกรณีที่อุณหภูมิในการแช่แข็งต่ำ (ติดลบน้อย) ผลึกน้ำแข็งจะมีขนาดใหญ่ เพราะโมเลกุลของน้ำมีเวลามากพอในการรวมตัว นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (ไฟโบรอิน) รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดลดลง ผลการทดสอบการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ human foreskin fibroblast บนโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุดในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนขนาด 80-100 ไมโครเมตร (อุณหภูมิในการแช่แข็ง -196°C) เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์มีการเชื่อมโยงภายในรูพรุนสูง และมีความพรุนสูง (ประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์)

นอกจากนี้ในปี 2007 He, J., D. และคณะ [25] ได้ทำการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินและไคโตซานให้เป็นวัสดุที่มีโครงสร้างภายในชัดเจน (well-defined internal morphology) โดยใช้เทคนิค Solid freeform fabrication (SFF) ร่วมกับการขึ้นรูปโครงสร้างขนาดเล็ก (microfabrication) และกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่สัดส่วนของเจลาตินต่อไคโตซานต่าง ๆ กัน และเชื่อมขวางด้วยกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นรวมของสารละลาย ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น จาก 90.62 เป็น 98.13 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สูง ต้องมีการผ่านเข้าของ ออกซิเจนและสารอาหาร รวมทั้งมีการผ่านออกของของเสียได้อย่างสะดวก นอกจากนี้ยังพบว่า อุณหภูมิในการแช่แข็งลดลง (ติดลบมาก) ทำให้รูพรุนเฉลี่ยมีขนาดเล็กลง

2. การทำแห้งระยะที่ 1 (Primary drying) ขั้นตอนนี้เป็นการลดความดันลงเพื่อให้ผลึก น้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอออกจากผลิตภัณฑ์ โดยการระเหิดนี้จะอาศัยพลังงาน ภายนอก (ปั๊มสุญญากาศเป็นตัวกำเนิดพลังงาน) เป็นตัวพาความร้อนเข้าสู่เนื้อของสารแช่แข็ง เพื่อให้ ชั้นของผลึกน้ำแข็งซึ่งเป็นน้ำอิสระ (Free water) ระเหิดออกไป การระเหิดในขั้นตอนนี้สามารถลด ปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง

พฤติกรรมของการระเหิดของผลึกน้ำแข็งระหว่างการทำแห้งระยะที่ 1 (ดังแสดงในรูปที่ 2.5) มี ดังนี้ ชั้นแรกเกิดการระเหิดจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าตัวอย่าง โดยจะเกิดการถ่ายเทความร้อน โดยตรงผ่านผิวที่สัมผัสกับด้านล่างของภาชนะและจากผนังของภาชนะไปยังตัวอย่างแช่แข็ง โดยชั้น น้ำแข็งจะกลายเป็นชั้นแห้ง ส่วนชั้นที่สอง ชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในตัวอย่างจะระเหิดผ่านชั้นแห้งออกสู่ ผิวหน้าของตัวอย่าง ทั้งนี้เวลาในการระเหิด (sublimation time) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นสารตัวอย่าง



รูปที่ 2.5 การถ่ายเทมวลสารและพลังงานในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง [22]

3. การทำแห้งระยะที่ 2 (Secondary drying) เป็นการกำจัดน้ำที่ถูกยึดไว้ด้วยพันธะทางเคมี (bound water) ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งไม่ตกผลึกและแข็งตัวไปกับน้ำอิสระ เรียกขั้นตอนนี้ว่าการคายน้ำที่ ดูดซับ (desorption) โดยขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นเมื่อน้ำอิสระระเหิดหมดไปในขั้นตอนการทำแห้งระยะที่ 1 ซึ่งในช่วงของการคายน้ำที่ดูดซับ อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วง 20-40 องศา

เซลเซียส เนื่องจากการถ่ายเทความร้อนแฝงทำให้ชั้นน้ำแข็งหมดไป พลังงานจากแหล่งให้ความร้อน จึงถ่ายเทสู่ผลิตภัณฑ์โดยตรง ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลามากที่สุด

ข้อดีของกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

1. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น
2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างรูพรุนเกิดขึ้น เนื่องจากส่วนของน้ำที่ถูกยึดไว้ด้วยพันธะทางเคมี (bound water) ถูกดึงออกไป
3. เมื่อนำผลิตภัณฑ์มาแช่ในน้ำ โมเลกุลของน้ำสามารถแทรกเข้าไปในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนได้ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สามารถคืนตัว (rehydration) ได้อย่างรวดเร็ว

ข้อเสียของกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

1. เครื่องมือมีราคาแพงกว่าการทำแห้งโดยทั่วไป ประมาณ 3 เท่า
2. ใช้พลังงานในขั้นตอนการทำแห้งสูง 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีการทำแห้งแบบทั่วไป
3. ใช้เวลาในการทำแห้งแต่ละรอบนานประมาณ 24-72 ชั่วโมง
4. สำหรับตัวอย่างทางชีวภาพ (biological sample) โครงสร้างของตัวอย่างหลังเสร็จสิ้นกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งอาจมีการฉีกขาดได้ เนื่องจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในชิ้นงาน

2.4 ชีววัสดุ (Biomaterials)

ปัจจุบันได้มีการนำชีววัสดุ (biomaterial) มาใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างหลากหลาย เนื่องจากสมบัติเด่นในด้านความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกาย พอลิเมอร์ที่มีความนิยมนับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เช่น โฟโบรินไหมไทย มีสมบัติเชิงกลที่ดี และเจลาติน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ย่อยของคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบในผิวหนังและช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่วนชีววัสดุที่ได้รับความสนใจอีกชนิดหนึ่งคือ กรดไฮยาลูรอนิกที่เป็นสารในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan, GAG) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ซึ่งมีส่วนช่วยในเรื่องการหายของบาดแผล รายละเอียดชีววัสดุแต่ละชนิดมีดังนี้

2.4.1 ไหม (Silk)

เส้นไหมมีแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่ผลิตจากแมลงในไฟลัม *Arthropoda* เช่น หนอนไหมและแมงมุม ไหมที่ได้จากตัวหนอนไหม (silkworm silk) จัดเป็นโปรตีนประเภทเส้นใย และแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. ไหมป่า (wild silkworm หรือ non-mulberry silkworm) เป็นไหมที่กินพืชอื่นที่ไม่ใช่ใบหม่อนเป็นอาหาร เช่น ไหมอีรี (*Eri silkworms*) ไหมทาชาร์ (*Tasar silkworms*) และไหมมูกา (*Muga silkworm*)

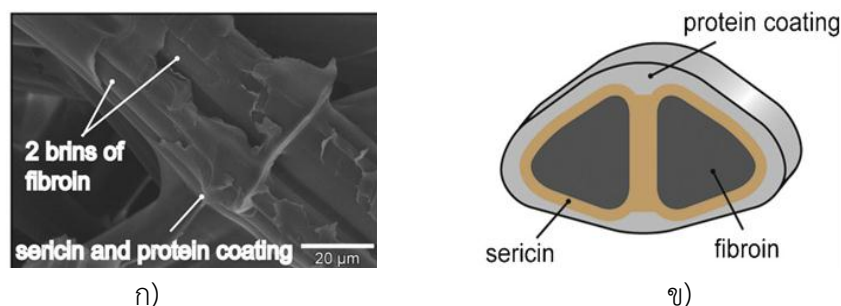
2. ไหมกินใบหม่อนหรือไหมบ้าน (Mulberry silkworms) เป็นหนอนไหมที่มนุษย์เพาะเลี้ยงโดยใช้ใบหม่อนสดเป็นอาหาร ตัวหนอนไหมที่ใช้เลี้ยงมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* โดยมีการจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ดังนี้ [26]

Phylum	:	<i>Arthropoda</i>
Class	:	<i>Insecta</i>
Sub – Class	:	<i>Pterygota</i>
Division	:	<i>Endopterygota</i>
Order	:	<i>Lepidoptera</i>
Family	:	<i>Bombycidae</i>
Genus	:	<i>Bombyx</i>
Species	:	<i>mori</i>

2.4.1.1 โครงสร้างของเส้นใยไหม

ไหมที่ได้จากหนอนไหม *Bombyx mori* ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 ส่วนคือ เซรีซิน (sericin) และไฟโบรอิน (fibroin) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 เซรีซินถูกสร้างมาจากต่อมบริเวณส่วนกลางของลำตัวหนอนไหมมีสมบัติเหนียวคล้ายกาวเคลือบอยู่รอบ ๆ เส้นไหมหรือไฟโบรอิน ทำหน้าที่เคลือบหรือห่อหุ้มและเป็นกาวยึดเกาะเส้นไฟโบรอินให้คงสภาพเป็นรังไหมไว้ได้ สามารถละลายในน้ำร้อนหรือด่างอ่อน ส่วนไฟโบรอินถูกสร้างมาจากต่อมบริเวณส่วนหลังของหนอนไหมเป็นโปรตีนเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ แต่จะถูกย่อยสลายด้วยด่างแก่ [5] นอกจากนั้นรังไหมยังประกอบด้วยส่วนประกอบ

อื่น ๆ ได้แก่ ไขมัน น้ำมัน แร่ธาตุต่าง ๆ และสีที่ปรากฏตามธรรมชาติ เป็นต้น ปริมาณขององค์ประกอบหลักต่าง ๆ ของเส้นไหมแสดงในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์
ข) ภาพวาด [27]

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของเส้นใยไหม [28]

	องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
1.	ไฟโบรอิน (Fibroin)	70 - 80
2.	เซริซิน (Sericin)	20 - 30
3.	ไขมัน แวกซ์ (Fat and wax)	0.4 - 0.8
4.	สารไฮโดรคาร์บอน	1.2 - 1.6
5.	สารสี (Pigment)	0.2
6.	ปริมาณเถ้า (Ash)	0.7

1. ไฟโบรอิน (silk fibroin) [27, 29]

ไฟโบรอิน (silk fibroin) เป็นองค์ประกอบหลักของเส้นไหม (70-80 %) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 ไมโครเมตร ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine, Gly) อะลานีน (Alanine, Ala) เซรีน (Serine, Ser) และไทโรซีน (Tyrosine, Tyr) [30] ไฟโบรอินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 391 กิโลดาลตัน [31, 32] และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่ซับซ้อนอยู่ 3 ส่วน ได้แก่ สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy Chain) หรือที่เรียกว่า H-chain ซึ่งเป็นหน่วยที่ใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยไกลซีน 46% อะลานีน 30% และเซรีน 12% แบ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

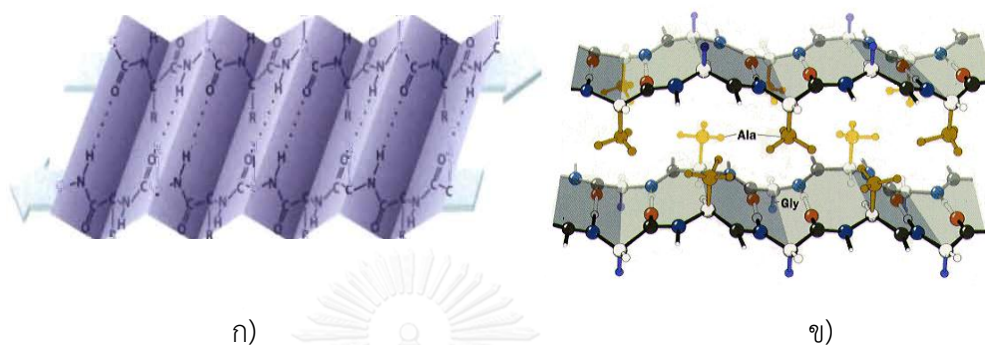
เรียงตัวแบบสลับ โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำประกอบด้วยหมู่อะมิโนที่เรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ คือ [Gly-Ala-Gly-Ala-Ser]_n ถึง 2 ใน 3 ของสาย H-chain ซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ในรูปแผ่นพลิทเบตา (β -pleated sheet) แสดงในรูปที่ 2.7 เป็นแผ่นมีลักษณะเป็นจیبหรือคลื่นแบบไม่ขนาน (Antiparallel) มีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายพอลิเปปไทด์และเป็นบริเวณที่มีประจุ จึงทำให้ H-chain มีความไม่ชอบน้ำสูงมาก โดย H-chain จะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light chain) หรือที่เรียกว่า L-chain ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) L-chain มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย กรดอะมิโนลิวซีน ไอโซลิวซีน วาลีน และกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรด (acidic amino acid) จำนวนมาก [33] และส่วนที่สามคือ โปรตีนที่เรียกว่า P25 เป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่ง P25 จะเชื่อมกับ H-L complex ด้วยอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Interaction) โดยอัตราส่วนของ H-chain:L-chain:P25 คือ 6:1:1 [34]



ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซินของ *Bombyx mori* [35]

ชนิดกรดอะมิโน		ไฟโบรอิน			ปริมาณเซรีซิน (กรัม/100 กรัม โปรตีน)
		ปริมาณไฟโบร อิน (กรัม/100 กรัมโปรตีน)	ประจุ	ความชอบ น้ำ/ความไม่ ชอบน้ำ	
กรดอะมิโน ชนิดไม่มีขั้ว (non-polar amino acid)	Glycine	42.8	กลาง	ชอบน้ำ	8.8
	Alanine	32.4	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	4.0
	Leucine	0.7	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	0.9
	Isoleucine	0.9	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	0.6
	Valine	3.0	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	3.1
	Phenylalanine	1.2	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	0.6
	Proline	0.6	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	0.5
กรดอะมิโน ชนิดที่เป็น กรด (acidic- amino acid)	Aspartic Acid	1.9	ลบ	ชอบน้ำ	16.8
	Glutamic Acid	1.7	ลบ	ชอบน้ำ	10.1
asicamino acid	Arginine	0.9	บวก	ชอบน้ำ	4.2
	Histidine	0.3	บวก	ชอบน้ำ	1.4
	Lysine	0.5	บวก	ชอบน้ำ	5.5
Oxy-amino acid	Serine	14.7	กลาง	ชอบน้ำ	30.1
	Threonine	1.2	กลาง	ชอบน้ำ	8.5
	Tyrosine	11.8	กลาง	ชอบน้ำ	4.9
sulfur- complex Amino acid	Methionine	0.2	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	0.1
	Tryptophan	0.5	กลาง	ชอบน้ำ	0.5
	Cystine	0.1	กลาง	ไม่ชอบน้ำ	0.3

นอกจากนี้ประจุของเส้นใยไฟโบรอินยังขึ้นอยู่กับค่า pH ด้วย เนื่องจากค่าไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric Point, pI) ของเส้นใยไฟโบรอินอยู่ในช่วง 3.8–4.5 ดังนั้น ถ้าเส้นใยไฟโบรอินอยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI ประจุโดยรวมของเส้นใยเป็นประจุบวก แต่ถ้าเส้นใยไฟโบรอินอยู่ในสารละลายที่มีค่า pH มากกว่าค่า pI ประจุโดยรวมของเส้นใยเป็นประจุลบ



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน ก) ลักษณะแผ่นพลิทเบตา (β -Pleated Sheet)
ข) การเรียงตัวของหมู่อะมิโน [36, 37]

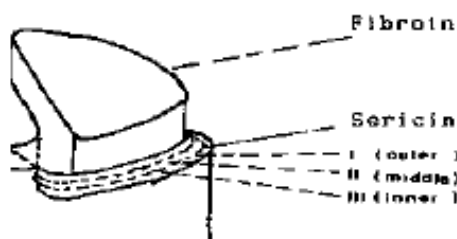
2. เซริซิน (Sericin)

เซริซิน (Sericin) หรือกาไหมมีประมาณ 20–30% ของรังไหม สามารถละลายน้ำได้ ทำหน้าที่ห่อหุ้มเส้นใยไฟโบรอิน 2 เส้นให้ยึดติดกัน หมู่อะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซริซิน ได้แก่ เซรีน (Serine) ทรีโอนีน (Threonine) กรดแอสพาทิก (Aspartic Acid) และกรดกลูตามิก (Glutamic Acid) [38] เซริซินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความเป็นขั้วสูง กรดอะมิโนเหล่านี้จะมีโครงสร้างแบบอสัณฐาน (amorphous) เซริซินแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ได้แก่

เซริซิน I คือ เซริซินชั้นนอก สามารถละลายออกง่ายที่สุด (ประมาณ 40%)

เซริซิน II คือ เซริซินชั้นกลาง สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นต่างอ่อน (ประมาณ 40-50%)

เซริซิน III คือ เซริซินชั้นใน เป็นเซริซินส่วนที่ติดกับแกนเส้นไหมไฟโบรอิน สามารถละลายได้สารละลายที่เป็นต่างอ่อน (ละลายยากที่สุด โดยมีประมาณ 10-20%)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของเซรีซิน [35]

2.4.1.2 สมบัติของไหม [5,26]

ไหมมีสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีสมบัติทางกลที่ดี เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นผลึก เป็นส่วนที่ทำให้เส้นไหมมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่น ซึ่งสมบัติทางกลของไหมไฟโบรอินจะมีค่าสูง เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพดังแสดงในตารางที่ 2.3 จึงทำให้เส้นไหมสามารถทนแรงกดอัดได้ดี นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ มีความคงตัว สามารถทนความร้อนได้สูง

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกลของพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ [39]

แหล่งที่มาของชีววัสดุ	มอดุลัส (GPa)	UTS (MPa)	% Strain at break
B. mori silk (with sericin)	5–12	500	19
B. mori silk (without sericin)	15–17	610–690	4–16
B. mori silk	10	740	20
N. clavipes silk	11–13	875–972	17–18
Collagen	0.0018–0.046	0.9–7.4	24–68
Cross-linked collagen	0.4–0.8	47–72	12–16
Polylactic acid	1.2–3.0	28–50	2–6

GPa = Giga pascal ($\times 10^9$)

UTS=Ultimate tensile strength

MPa=Mega pascal ($\times 10^6$)

2.4.1.3 การประยุกต์ใช้งานของไหม

จากสมบัติของไหมดั่งที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้มีการนำไหมมาประยุกต์ใช้มากมาย อาทิ งานด้านสิ่งทอ เครื่องสำอาง ตลอดจนงานทางด้านทางการแพทย์ เป็นต้น โดยเฉพาะในปัจจุบันไหมได้รับความสนใจในการประยุกต์ใช้งานทางด้านทางการแพทย์และด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างมาก เช่น นำไหมมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มหรือเป็นแผ่นเส้นใย เพื่อใช้ในการตกแต่งแผลหรือผิวหนังที่มีรอยแผลเป็น หรือขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจล เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งยา ยังสามารถนำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้เป็นวัสดุค้ำจุนสำหรับการยึดเกาะของเซลล์ [40]

นอกจากนี้ในปี 2000 Yeo, J. H. และคณะ [41] รายงานว่าเมื่อนำแผ่นปิดแผลซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง polyvinyl alcohol (PVA) ไคโตซาน และไฟโบรอิน (สัญลักษณ์ย่อคือ PCF) มาปิดบาดแผลให้หนู พบว่าช่วยลดการอักเสบได้ดี มีผลทำให้ผิวหนังหายได้เร็ว รวมทั้งเมื่อปี 1999 Santin, M. และคณะ [42] พบว่า เมมเบรนไฟโบรอิน สามารถชักนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทน และรักษาอาการผิวหนังไหม้ ลดการอักเสบของบาดแผลในหนูได้ ในปี 2005 Gil, Eun S. และคณะ [43] ได้ทำการศึกษาการผลิตเมมเบรนโปรตีน โดยใช้สารละลายผสมไฟโบรอินไหมและเจลาติน โดยพบว่าปฏิกิริยาการเป็นผลึกของสารละลายไฟโบรอินไหมที่ผสมกับเจลาตินไม่แตกต่างกันกับปฏิกิริยาการเป็นผลึกของสารละลายไหมไฟโบรอินที่ไม่ได้ผสมเจลาติน ทำให้ทราบว่าสมบัติของไหมไฟโบรอินไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อผสมกับเจลาติน ในปี 2012 Kasoju, N. และคณะ [44] ได้นำไหมไฟโบรอินมาใช้เป็นวัสดุทดแทนในงานด้านศัลยกรรมหลอดเลือดและเส้นประสาท โดยใช้ไหมไฟโบรอินเป็นวัสดุทดแทนหลอดเลือดเทียม หรือใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อกระตุ้นและปรับปรุงการทำงานของเซลล์ประสาทชั้นต้นให้ทำงานดีขึ้น

2.4.2 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid)

กรดไฮยาลูรอนิก จัดเป็นชีววัสดุประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในธรรมชาติ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Karl Meyer และ John Palmer เมื่อปี ค.ศ.1934 ซึ่งได้ทำการสกัดแยกกรดไฮยาลูรอนิกจากน้ำเลี้ยงลูกตาของวัว และพบว่ามีส่วนประกอบของโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุล หนึ่งในนั้นคือ uronic acid จึงเป็นที่มาของชื่อ hyaluronic acid ซึ่งมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก hyalos แปลว่าแก้ว (glass) และ uronic acid และได้มีการใช้ชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น hyaluronan, hyaluronate เป็นต้น ต่อมากรดไฮยาลูรอนิกถูกนำมาใช้ในทางการค้า โดยในปี ค.ศ.

1942 Endre Balazs ใช้กรดไฮยาลูรอนิกแทนไขขาวในการทำเบเกอร์ และตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 ได้มีการนำกรดไฮยาลูรอนิกมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มากขึ้น [2]

นอกจากกรดไฮยาลูรอนิกพบได้ในน้ำเลี้ยงลูกตาหรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแล้ว ยังอาจพบในแหล่งอื่นเช่น ผิวหนัง (skin) เอ็น (tendons) กล้ามเนื้อ (muscles) กระดูกอ่อน (cartilage) สายสะดือ (umbilical cord) น้ำไขข้อ (synovial fluid) และหงอนไก่ตัวผู้ (rooster combs) และยังพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *S.pyogenes* กรดไฮยาลูรอนิกที่สกัดได้จากแหล่งต่าง ๆ จะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่สกัดได้จากอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของหมู [45]

อวัยวะ	ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกทั้งหมด (มิลลิกรัม)
หมูทั้งตัว	60.5
ผิวหนัง (Skin)	33.8
กล้ามเนื้อ (Muscles)	4.69
โครงสร้างของระบบกระดูกและส่วนรับรอง (Skeleton and supporting structures)	16.2
ลำไส้ (Intestines) และกระเพาะอาหาร (stomach)	0.50
อวัยวะภายในอื่น ๆ (Remaining internal organs)	5.25

2.4.2.1 โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิก

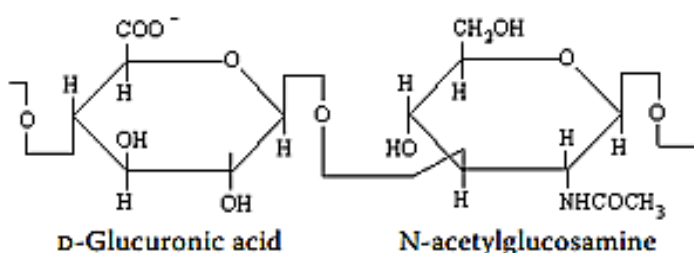
กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารอินทรีย์ประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropoly saccharide) ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน (Glycoaminoglycan, GAG) หรือมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (Mucopolysaccharide) มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลมีลักษณะเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil structure) ที่เกี่ยวพันกันเป็นร่างแห มีน้ำหนักโมเลกุลสูง สูตรโมเลกุลคือ

$(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ โดย $n > 1,000$ ความยาวของพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับแหล่งที่สกัดแยก วิธีการสกัดแยกและวิธีการตรวจวัด ตารางที่ 2.5 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกจากแหล่งต่าง ๆ จะเห็นว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่สกัดได้จากแบคทีเรียกลุ่ม *S.pyogenes* จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าที่สกัดได้จากแหล่งอื่น โดยทั่วไปกรดไฮยาลูรอนิกที่พบในธรรมชาติและที่สกัดได้มักอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม คือ โซเดียมไฮยาลูรอนิก และพบบ้างในรูปของเกลือโพแทสเซียม คือ โพแทสเซียมไฮยาลูรอนิก ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงตั้งแต่ 10^6 - 10^7 ดาลตัน [46]

ตารางที่ 2.5 น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกจากแหล่งต่าง ๆ [47]

แหล่งที่ได้	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
รกของทารก	3,000-4,000	Laurent, 1995
วุ้นตา	77-1,700	Laurent และคณะ, 1960
น้ำไขข้อ	57-1,300	Rowen และคณะ, 1956
<i>S.pyogenes</i>	55	Bracke และคณะ, 1985

โครงสร้างโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharide) ได้แก่ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucuronic acid ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิก [2]

น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ทั้งสองชนิดภายในหน่วยย่อยไดแซ็กคาไรด์จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic bond ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 1 ของ N-acetyl-D-glucosamine กับคาร์บอนอะตอมที่ 4 ของ D-glucuronic acid และหน่วยย่อยของน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์จะเชื่อมต่อกัน

ด้วยพันธะ β -1,3 glycosidic bond ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 1 ของ D-glucuronic acid กับคาร์บอนอะตอมที่ 3 ของ N-acetyl-D-glucosamine และจากการที่มีส่วนของกลูโคโรนิกที่มีประจุเป็นลบ (anionic) จึงทำให้กรดไฮยาลูรอนิกแสดงประจุลบ ซึ่งทำให้มีความสามารถในการจับตัวกับไอออนที่เป็นประจุบวกได้

2.4.2.2 สมบัติของกรดไฮยาลูรอนิก

เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อภายในร่างกาย เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน สายรก กระจกตา น้ำไขข้อ และหมอนไก่ สมบัติทางกายภาพของกรดไฮยาลูรอนิกจึงมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เช่น กรดไฮยาลูรอนิกในน้ำไขข้ออาศัยคุณสมบัติของความหนืด ทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่น นอกจากนี้กรดไฮยาลูรอนิกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟมา (lymphoma cell) ยับยั้งปฏิกิริยาการต่อต้านเซลล์ปลูกถ่าย

กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารประเภทกรดอ่อนเพราะในโครงสร้างโมเลกุลมีหมู่คาร์บอกซิลที่แสดงความเป็นกรดเพียงหมู่เดียวเท่านั้น สายโซ่หลักของกรดไฮยาลูรอนิกมีความแข็งแรงมากเนื่องจากโมเลกุลประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีที่เชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนมากมาย ซึ่งทำให้สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารอื่นได้ง่ายด้วย [48] โครงสร้างโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นเกลียวแบบสุ่มที่เกี่ยวข้องกันเป็นร่างแหของกรดไฮยาลูรอนิกนี้ ทำให้กรดไฮยาลูรอนิกมีลักษณะคล้ายเจล มีความเหนียว หนืด และยืดหยุ่น กรดไฮยาลูรอนิกยังมีหน้าที่สำคัญในการช่วยกักเก็บน้ำ โดยพบว่ากรดไฮยาลูรอนิกสามารถกักเก็บน้ำได้มากกว่าพอลิเมอร์ธรรมชาติและพอลิเมอร์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ตัวอย่างเช่น สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก 2% จะกักเก็บน้ำได้ถึง 98% หรือน้ำปริมาตร 1 ลิตรจะถูกตรึงอยู่ในกรดไฮยาลูรอนิกน้ำหนัก 1 กรัม [49]

นอกจากนี้ยังพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถย่อยสลายได้ โดยการย่อยสลายจะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกลดลง สายโซ่โมเลกุลสั้นลง การย่อยสลายกรดไฮยาลูรอนิกนี้จะกล่าวโดยละเอียดในหัวข้อ 2.4.2.3 ต่อไป

2.4.2.3 การย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิก

การย่อยสลายกรดไฮยาลูรอนิกสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (Ultrasonication) รวมทั้งการสลายตัวของพอลิเมอร์แบบอนุมูลอิสระ (Free radical depolymerization) ที่เกิดผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) นอกจากนี้กรดไฮยาลูรอนิกยังสามารถถูกย่อยสลายได้โดยใช้รังสีบางชนิด เช่น การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV irradiation) โอโซน (Ozone treatment) ซึ่งจะทำให้ความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายไฮยาลูรอนิกลดลง ในปี 2008 Stern และคณะ [50] รายงานว่าเมื่อกรดไฮยาลูรอนิกมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะส่งผลทำให้สมบัติทางชีวภาพมีค่าแตกต่างกัน เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่า และเมื่อปี 2001 Miyazaki, T. และคณะ [51] ศึกษาการใช้รังสีแกมมา (gamma irradiation) ในการย่อยสลายกรดไฮยาลูรอนิกให้น้ำหนักโมเลกุลต่ำทำให้สามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านทานการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ได้

สำหรับการย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิกด้วยคลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (ultrasonication) คือการใช้คลื่นอัลตราซาวนด์หรือคลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic waves) ซึ่งมีพลังงานที่เกิดจากสันของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า หรือคลื่นความดัน (pressure waves) ที่มีความถี่สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ (สูงกว่า 20,000 กิโลเฮิร์ตซ์) ส่งผ่านเข้าสู่ตัวกลางสารละลายพอลิเมอร์ จะทำให้เกิดปรากฏการณ์การก่อกองตัวของเหลว เนื่องจากคลื่นที่เคลื่อนที่ผ่านตัวกลางจะเกิดการเปลี่ยนแปลงความดันคือ เกิดเป็นช่วงอัดและขยาย ซึ่งในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางจะทำให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมาก โดยกระบวนการเกิดและสลายของฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมากอย่างรวดเร็ว เรียกว่า กระบวนการ cavitation [51] จากนั้นเมื่อฟองอากาศได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองอากาศแตกออกและปลดปล่อยพลังงานมหาศาลออกมา ส่งผลให้พันธะเคมีถูกทำลาย และทำให้สายโซ่โมเลกุลเล็กลง ยิ่งให้เวลาในการส่งคลื่นนาน ยิ่งทำให้น้ำหนักโมเลกุลลดลงมาก การย่อยสลายวิธีนี้จะเกิดแบบไม่เจาะจง (non-random fashion) มีผลทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลกว้าง นอกจากนี้การย่อยสลายด้วยวิธีนี้จะเกิดแบบไม่สมบูรณ์ โดยสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกจะไม่ถูกย่อยสลายจนกลายเป็นมอนอเมอร์ [52] การเลือกใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงในการย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์นี้ เป็นเพียงการแยกพันธะทางเคมีเท่านั้น แต่จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีของพอลิเมอร์ จึงเป็นวิธีที่เป็นที่ยอมรับว่าสามารถลดขนาดโมเลกุลและลดความหนืดสารละลายพอลิเมอร์ได้

ในปี 2001 Miyazaki, T. และคณะ [51] ได้ใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงในการตัดสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก และศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิก การอยู่ร่วมกันของไอออนบวก (coexisting cations) และผลของค่าความแรงไอออน (ionic strength) ต่อโครงสร้างของโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก รวมทั้งศึกษาอัตราการย่อยสลาย การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลที่เปลี่ยนไป จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความหนาแน่น (intensity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชันเริ่มต้น (initial depolymerization rate, k) จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิคลดลง โดยตัวแปรที่มีผลกระทบต่อโครงสร้างโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมาก คือ k นอกจากนี้ยังพบว่า ไม่ว่าจะส่งคลื่นเสียงความถี่สูงผ่านสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกแบบต่อเนื่องหรือไม่ต่อเนื่องก็สามารถลดน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิคลงได้

สำหรับการประยุกต์ใช้ในงานด้านการแพทย์และเครื่องสำอาง กรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีข้อดีกว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยมีรายงานว่า กรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีสมบัติยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ ด้านการอักเสบ และด้านการตอบสนองของภูมิคุ้มกันบกพร่อง แต่ในทางตรงกันข้าม กรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถกระตุ้นการเกิดหลอดเลือดใหม่ และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่า [4]

2.4.2.4 บทบาทของกรดไฮยาลูรอนิกต่อการหายของบาดแผล

ในร่างกายของมนุษย์ที่มีน้ำหนัก 70 กิโลกรัม จะพบปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกทั้งหมด 15 กรัม โดยจะพบมากที่สุดในบริเวณเมทริกซ์ภายในเซลล์ (intercellular matrix) ของผิวหนังและเนื้อเยื่อกระดูก รวมทั้งกล้ามเนื้อ ซึ่งพบในเนื้อเยื่อผิวหนังประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติในชั้นผิวหนังแท้จะมีกรดไฮยาลูรอนิกความเข้มข้นประมาณ 0.5 และชั้นผิวหนังกำพวด 0.1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเนื้อเยื่อ แต่จะไม่พบกรดไฮยาลูรอนิกในชั้นถัดจาก granular layer และในชั้น stratum corneum ส่วนในชั้นหนังแท้กรดไฮยาลูรอนิกจะพบในชั้นที่ต่ำกว่าชั้น basement membrane และอยู่รอบ ๆ อวัยวะที่กำเนิดจากผิวหนัง ดังนั้นความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิกที่พบในอวัยวะต่าง ๆ ของแต่ละสปีชีส์จะแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิก (มิลลิกรัมต่อกรัม) จากแหล่งต่าง ๆ [53]

อวัยวะหรือของไหล	มนุษย์เพศชาย	แกะ	กระต่าย	หนู
สายสะดือ	4100			
น้ำไขข้อ	1400-3600	540	3890	
ผิวหนังแท้	200			
น้ำเลี้ยงตา	140-338	260	29	
ปอด		98-243		34
ไต			93-113	30
พาพิลลา (renal papillae)			250	
คอร์เทกซ์ (renal cortex)			4	
สมอง	35-115		54-76	74
กล้ามเนื้อ			27	
น้ำเหลืองในทรวงอก	8.5-18	1-34		5.4
ลำไส้				44
ตับ			1.5	4
ของเหลวในดวงตา (aqueous humour)	0.3-2.2	1.6-5.4	0.6-2.5	0.2
ปัสสาวะ	0.1-0.3			
Lumbar CSF	0.02-0.32			
พลาสมา (ซีรัม)	0.01-0.1	0.12-0.31	0.019-0.086	0.048-0.26

บทบาทของกรดไฮยาลูรอนิกต่อการหายของบาดแผล ได้แก่

1. การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue)
2. การตอบสนองการอักเสบลดลง
3. การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)
4. การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration)

ใน 1996 งานวิจัยของ Ellis, I. R. และคณะ [54] ศึกษาผลของกรดไฮยาลูรอนิกที่สังเคราะห์จากภายนอกร่างกาย (exogenous hyaluronan) ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ที่สกัดแยกจาก human adult และ foetal fibroblast ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกและ TGF- β 1 (transforming growth factor-beta 1) ที่ตรวจวัดเพิ่มขึ้น แสดงถึงเซลล์มีการเคลื่อนที่ได้ดีขึ้น ทั้งนี้ในกรณีเซลล์ adult fibroblast จะไม่แสดงผล TGF- β 1 แต่จะแสดงโกรทแฟคเตอร์ในรูปแบบอื่น เช่น EGF, PDGF, aFGF, และ bFGF แสดงให้เห็นว่า กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสื่อกลางในการเคลื่อนที่ของเซลล์ เนื่องจากสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) และสมบัติอุ้มน้ำสูงส่งผลทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้ง่าย

ทั้งนี้การเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เกิดจาก กรดไฮยาลูรอนิกเกิดอันตรกิริยากับตัวรับ (receptors เช่น CD44, ICAM-1 และ RHAMM) ถ้าจำนวนตัวรับมีปริมาณมากกว่ากรดไฮยาลูรอนิกจะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของไฟโบรบลาสต์ ดังนั้นจำนวนไฟโบรบลาสต์ที่เพิ่มขึ้นในบริเวณบาดแผล ส่งผลทำให้สามารถผลิตเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (ECM) และคอลลาเจนได้มากขึ้น

5. การเจริญเติบโตของเซลล์ กรดไฮยาลูรอนิกมีส่วนช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ แต่ไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่า กรดไฮยาลูรอนิกมีผลโดยตรงต่อ mitogenic activity ทั้งนี้เมื่อเกิดกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ จะทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น จากรายงานวิจัยหลายชิ้นพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกจากภายนอก (exogenous hyaluronic acid) และกรดไฮยาลูรอนิกที่ร่างกายสร้างขึ้นได้เอง จะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ [55, 56] กล่าวคือ เมื่อไม่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าสมบัติอุ้มน้ำของกรดไฮยาลูรอนิก ช่วยทำให้สภาพแวดล้อมมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากขึ้น

จากงานวิจัยในปี 2013 ของ Wang, H. M. และคณะ [57] ทำการศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังทดแทน จากผลการวิจัยพบว่า เซลล์ human skin cell fibroblast มีร้อยละการยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ผสมของคอลลาเจน กรดไฮยาลูรอนิก และเจลาติน ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูง เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดรูพรุนสม่ำเสมอ ทั้งนี้เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ KCs ร่วมกับเซลล์ MCs และ FBs บนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากสมบัติอุ้มน้ำสูงของกรดไฮยาลูรอนิก และเซลล์มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ โดยจะพบเซลล์ KCs และ MCs กระจายตัวอยู่บริเวณด้านบนของไฮโดรเจล ในขณะที่ FBs จะกระจายตัวอยู่ด้านล่าง ทั้งนี้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้ พบปริมาณคอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้น มีค่าสูง (ประมาณ 1.6 เท่า) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง และเมื่อ

นำโครงเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบกับแผลบนผิวหนังหนู พบว่า แผลมีขนาดเล็กงและชั้นผิวหนังที่สร้างใหม่หนาขึ้น เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ

2.4.2.5 การประยุกต์ใช้งานของกรดไฮยาลูรอนิก

กรดไฮยาลูรอนิกได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้ในการรักษาผ่าตัดดวงตา เป็นส่วนประกอบในยาหลอดเลือด (ophthalmics) ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับข้อต่อกระดูก (orthopaedics) ใช้รักษาบาดแผล (wound healing) นอกจากนี้กรดไฮยาลูรอนิกได้ถูกใช้ในงานด้านศัลยกรรม ใช้เป็นตัวต่อต้านการยึดเกาะของแบคทีเรียหลังการผ่าตัดบาดแผลที่พื้นตัวซ้ำและใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังในครีมทาหน้า เป็นต้น

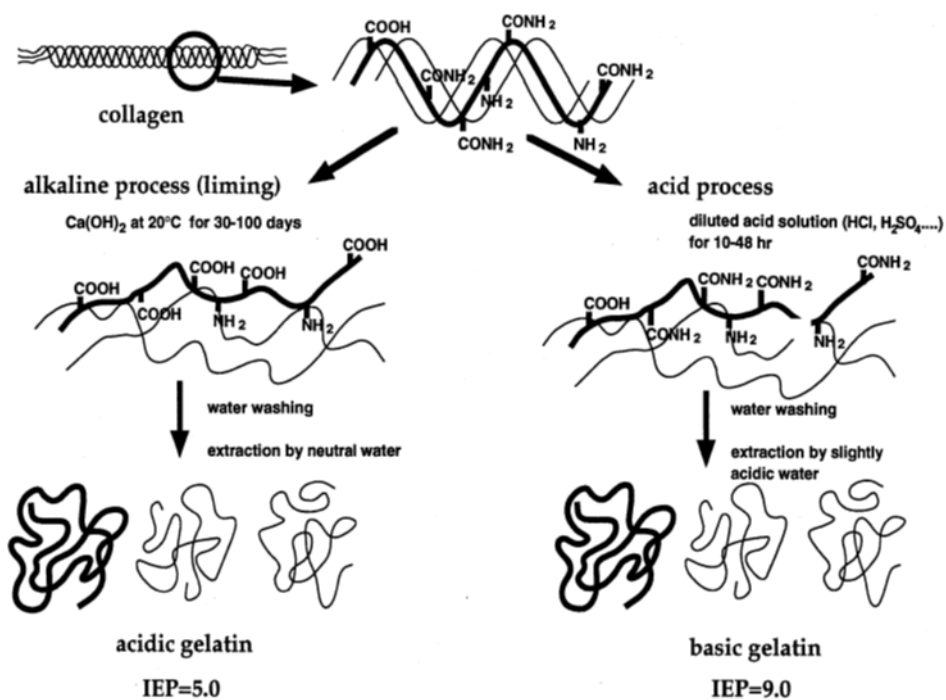
นอกจากนี้กรดไฮยาลูรอนิกยังถูกนำมาใช้ในการประยุกต์ใช้ด้านการหายของบาดแผล (wound healing) ในปี 2009 Hellstrom, S. และคณะ [58] นำกรดไฮยาลูรอนิกมาใช้งานในหูชั้นกลางของหนู พบว่า การฉีกขาดของเยื่อแก้วหู (tympanic membrane) สามารถรักษาให้หายได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกจากภายนอกอาจช่วยในการหายของบาดแผล โดยที่ไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด ทั้งนี้กรดไฮยาลูรอนิกยังช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ epithelial [59, 60] รวมทั้งช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ หรือการประสานกันของเนื้อเยื่อ

ทั้งนี้กรดไฮยาลูรอนิกสามารถละลายได้ในน้ำ จึงทำให้มีอัตราการย่อยสลายเร็ว โดยเฉพาะเมื่อใช้ภายในร่างกายที่มีเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายกรดไฮยาลูรอนิก ดังนั้นการนำกรดไฮยาลูรอนิกไปประยุกต์ใช้งานในด้านการแพทย์จึงต้องมีการปรับปรุงทางเคมีให้กรดไฮยาลูรอนิกอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้น้อยลง ซึ่งจะช่วยให้มีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพช้าลงและมีเสถียรภาพมากขึ้น การปรับปรุงกรดไฮยาลูรอนิกด้วยวิธีทางเคมีทำได้โดยการเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวาง (crosslinking agent) ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดในหัวข้อ 2.5 ต่อไป

2.4.3 เจลาติน (Gelatin)

เจลาติน (gelatin) เป็นโปรตีนที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแต่สกัดได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระดูก และผิวหนังของสิ่งมีชีวิต โดยสกัด

ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วยกรดหรือด่าง ดังแสดงในรูปที่ 2.10 สมบัติของเจลาตินที่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจนและกระบวนการไฮโดรไลซิส [61]



รูปที่ 2.10 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอและบี [62]

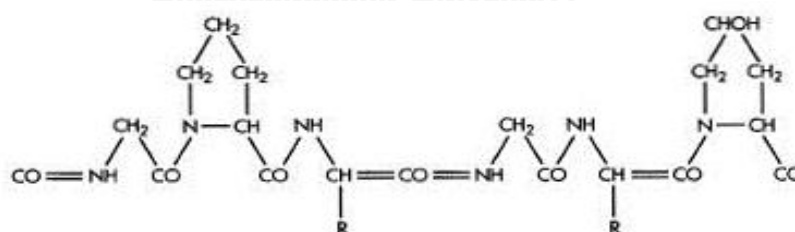
จากรูปที่ 2.10 กระบวนการผลิตเจลาตินแบ่งเป็น 2 ประเภท แต่ละประเภทจะได้เจลาตินต่างชนิดกัน คือ

1. Basic gelatin (เจลาติน ชนิด A) ได้มาจากกระบวนการที่ใช้กรด (acid process) กระบวนการนี้นิยมใช้กับวัตถุดิบจำพวกหนังหมู กรดที่ใช้ส่วนมากได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl), กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4), กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการนี้ทำให้ได้หมู่อะมิโนจำนวนมาก เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดกับหมู่อะมิโนในคอลลาเจนมีน้อย จึงทำให้เจลาตินมีค่า Isoelectric point (pi) ประมาณ 9 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pi ของคอลลาเจน เจลาตินชนิดนี้เหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

2. Acidic gelatin (เจลาติน ชนิด B) ได้มาจากกระบวนการที่ใช้ด่าง (alkaline process) กระบวนการนี้จะนิยมใช้กับวัตถุดิบที่เป็นพวกกระดูก สารละลายต่างที่ใช้ ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) กระบวนการนี้เป็นกระบวนการไฮโดรไลซิสหมู่เอไมด์ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีหมู่คาร์บอกซิลปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุเป็นลบ มีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส

2.4.3.1 โครงสร้างของเจลาติน

เจลาตินเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์จนเกิดเป็นพอลิเปปไทด์สายยาว ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในเจลาติน ซึ่งมีกรดอะมิโนหลัก 3 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine, Gly) ร้อยละ 21.4, โพรลีน (Proline, Pro) ร้อยละ 12.4 และไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline, Hyp) ร้อยละ 11.2 กรดอะมิโนเหล่านี้จะจัดเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ คือ $(-\text{Gly-Pro-Hyp-})_n$ และเชื่อมด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายพอลิเปปไทด์และภายในโมเลกุลจะยึดกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ดังแสดงในรูปที่ 2.11 [61] กรดอะมิโนจำเป็นพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมชอบน้ำ (hydrophilic) จึงทำให้เจลาตินละลายน้ำได้ดี และเนื่องจากเจลาตินเป็นอนุพันธ์ที่ได้จากคอลลาเจนส่งผลให้เจลาตินมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างกว้างตั้งแต่ช่วงต่ำกว่า 10,000 กรัมต่อโมล จนถึงสูงกว่า 400,000 กรัมต่อโมล [63]



เมื่อ R = glycine-X-Y triplet, X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเจลาติน [62]

ตารางที่ 2.7 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเจลาติน [62]

ชนิดกรดอะมิโน	% กรดอะมิโนในเจลาติน	ชนิดกรดอะมิโน	% กรดอะมิโนในเจลาติน
Alanine	8.9	Leucine	3.3
Arginine	7.8	Lysine	3.5
Asperic acid	6.0	Methionine	0.7
Glutamic acid	10.0	phenylalanine	2.4
Glycine	21.4	Proline	12.4
Histidine	0.8	Serine	3.6
Hydoxylsine	1.0	Theronine	2.1
Hydroxyproline	11.2	Tyrosine	0.5
Isoleucine	1.5	Valine	2.2

2.4.3.2 สมบัติของเจลาติน

เจลาตินมีลักษณะสีเหลืองอ่อน สามารถละลายในสารละลายประเภทพอลิไฮดริค แอลกอฮอล์ (Polyhydric Alcohol) คือ สารละลายที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 1 หมู่ เช่น กลีเซอรอล (glycerol) หรือโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) เป็นต้น นอกจากนี้เจลาตินยังสามารถละลายในสารละลายที่มีความเป็นขั้วสูงและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (acetic Acid) และฟอร์มาร์ไมด์ (formamide) เป็นต้น ปกติเจลาตินสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส [64] แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วน้อย เช่น เบนซิน หรืออะซิโตน เป็นต้น เจลาตินที่อยู่ในรูปสารละลายจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และมีสมบัติเป็นได้ทั้งกรดและเบส หรือที่เรียกว่า แอมโฟเทอริก (amphoteric) กล่าวคือ สารละลายเจลาตินที่เป็นกรดจะมีประจุบวกและรวมตัวกับประจุลบในสนามไฟฟ้า ส่วนสารละลายเจลาตินที่เป็นเบสจะมีประจุลบและรวมตัวกับประจุบวกในสนามไฟฟ้า

ตารางที่ 2.8 แสดงสมบัติทางกายภาพของเจลาตินชนิดเอและชนิดบี ซึ่งมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 9 และ 5 ตามลำดับ โดยสมบัติต่าง ๆ ของเจลาตินจะขึ้นอยู่กับแหล่งของ

คอลลาเจนที่นำมาสกัดและกระบวนการสกัด นอกจากนี้เจลาตินยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradability) มีความเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์ (biocompatibility) โดยไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์และราคาไม่แพง เมื่อนำเจลาตินมาละลายน้ำที่อุณหภูมิมากกว่า 37°C จะสามารถหลอมเหลวกลายเป็นของเหลวหนืด แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ของเหลวจะคืนตัวกลับมาเป็นเจล นั่นคือ เจลาตินมีสมบัติการก่อเจลแบบ Thermal reversible [65] สมบัติที่สำคัญของเจลาตินคือ การทำหน้าที่เป็นสารพวกไฮโดรคอลลอยด์ เจลาตินที่ให้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงมักจะมีค่าความหนืดสูงด้วย ซึ่งจะทำให้เจลาตินสามารถฟอร์มตัวเป็นเจลได้เร็ว เจลาตินที่มีความหนืดต่ำจะละลายได้เร็ว นอกจากนี้เจลาตินยังสามารถพองตัว เมื่อแช่ในน้ำเย็น และมีสมบัติป้องกันการเกิดคอลลอยด์ (protective colloid) เจลาตินมีสมบัติทางกายภาพที่ต่ำ ดังนั้นในการนำมาใช้งานที่ต้องรับแรงจึงมักจะทำการเชื่อมขวางหรือผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพให้ดีขึ้น

ตารางที่ 2.8 สมบัติของเจลาตินชนิดเอและชนิดบี [66]

คุณสมบัติ	เจลาตินชนิดเอ	เจลาตินชนิดบี
pH	3.8-5.5	5.0-7.5
ความชื้น (%)	8-12	8-12
Isoelectric point	7.0-9.0	4.7-5.4
ค่าความแข็งแรงของเจล(gel strength) (bloom)	50-300	50-300
ความหนืด (Viscosity) (mps)	15-75	20-75
เถ้า (%)	0.3-2.0	0.5-2.0

2.4.3.3 การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน

สมบัติของเจลาตินมักจะขึ้นกับแหล่งที่มาและสมบัติที่แตกต่างกันของเจลาตินมีผลต่อการนำไปประยุกต์ใช้งาน เช่น เจลาตินที่ได้มาจากปลา มีข้อด้อยคือ เมื่ออยู่ในรูปเจลจะมีความเสถียรค่อนข้างต่ำและมีสมบัติรีโอโลยี (Rheological Properties) ต่ำกว่าเจลาตินที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่งผลให้การนำไปประยุกต์ใช้งานมีจำกัด ในปัจจุบันมีการนำเจลาตินมาใช้ประโยชน์ใน

อุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง และพลาสติก โดยมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด หรือใช้ในการกักเก็บ (encapsulate) กลิ่นอาหารหรือวิตามิน เพื่อป้องกันการออกซิเดชันจากอากาศ นอกจากนี้เจลลาตินยังได้รับความสนใจนำไปประยุกต์ใช้งานด้านการแพทย์และด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นแผ่นปิดแผล ใช้เป็นตัวนำส่งเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยา หรือขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น [66]

สำหรับตัวอย่างการนำชีววัสดุที่มีสมบัติเด่นด้านต่าง ๆ มาผสมกันเพื่อปรับปรุงสมบัติบางประการ เช่น สมบัติทางกล หรือความเข้ากันได้ทางชีวภาพ รวมทั้งการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ในปี 2013 Yan, S. และคณะ [67] ได้ศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ผสมสามองค์ประกอบของไฟโบรอินไหมไทย คอนดรอยตินซัลเฟต และกรดไฮยาลูรอนิก (SF/CS/HA) เพื่อใช้สำหรับงานฟื้นฟูเนื้อเยื่อผิวหนัง โดยได้ทำการขึ้นรูปด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และทำการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย EDC/NHS/MES จากผลการวิจัยพบว่า โครงสร้างสัญญาณภายในของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ กล่าวคือ เมื่อสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้นส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนลดลง แต่ในขณะที่ความพรุนเพิ่มขึ้น ซึ่งรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 95-248 ไมครอน และความพรุนอยู่ในช่วง 88-93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบอัตราการบวมน้ำ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของพอลิแซ็กคาไรด์จะมีอัตราการบวมน้ำสูงขึ้น จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่าง SF/CS/HA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง หลังจากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไปเลี้ยงด้วยเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblast) พบว่า จำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ผสม SF/CS/HA มีจำนวนเซลล์มากกว่าโครงเลี้ยง SF และโครงเลี้ยงเซลล์ SF/HA ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ผสม SF/CS/HA เหมาะสำหรับการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์

เมื่อปี 2014 Sawatjui, N. และคณะ [68] ได้ทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลลาติน คอนดรอยติน ซัลเฟตและกรดไฮยาลูรอนิก (SF-GCH) โดยการขึ้นรูปด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และได้ทำการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย EDC/NHS ผลจากการวิจัยพบว่า ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์จะลดลงเมื่อปริมาณของไฟโบรอินลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างสัญญาณจะขึ้นกับอัตราส่วนของไฟโบรอินส่วนการบวมน้ำซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า การบวมน้ำจะเพิ่มขึ้น

เมื่อมีสัดส่วนของ GCH ผสมอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากว่าเจลาติน คอนดรอยตินซัลเฟต และ กรดไฮยาลูรอนิคมีหมู่ที่ชอบน้ำจำนวนมากจึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ผสม SF-GCH มีอัตราการบวมน้ำ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปริมาณกรดไฮยาลูรอนิคเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF จะมีความแข็งแรงต่อการกดอัดสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ SF-GCH แต่ความแข็งแรงต่อการกดอัดจะ เพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณไฟโบรอินอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงด้วย เซลล์ human bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) โดยเลือกโครงเลี้ยงเซลล์ที่ สัดส่วน SF-GCH (2:1) ไปทำการเลี้ยงเซลล์เนื่องจากมีความแข็งแรงต่อการกดอัดที่สูงและการย่อย สลายช้า ผลการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 1.48, 1.55 และ 1.86 เท่าของโครงเลี้ยงเซลล์ SF ด้วยการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์มีส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินจะส่งผลทำให้การยึดเกาะและการ เจริญเติบโตของเซลล์มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ SF

ในปี 2014 Han, F. และคณะ [69] ได้ทำการพัฒนาวัสดุสำหรับใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ผิวหนัง โดยทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินร่วมกับไคโตซานด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือก แข็งที่อัตราส่วนของเจลาตินต่อไคโตซานต่าง ๆ กัน (Gel:Chs เท่ากับ 3:7, 5:5, และ 7:3) ที่ความ เข้มข้นรวมเท่ากับ 0.6 กรัม จากผลการวิจัยพบว่า โครงสร้างสัมพันธ์ภายในของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นรวมของสารละลาย กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นรวมลดลง (0.3 กรัม) โครงเลี้ยงเซลล์มี แนวโน้มเปลี่ยนผิวดูและมีความทนต่อแรงต่ำ คือ ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ แต่เมื่อความ เข้มข้นรวมเพิ่มขึ้น (0.9 กรัม) ทำให้สารละลายหนืดและง่ายต่อการเกิดเจล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ เลือกความเข้มข้นรวมของสารละลายเท่ากับ 0.6 กรัม และขนาดรูพรุนที่ได้อยู่ในช่วง 120 ถึง 140 ไมโครเมตร รวมทั้งมีความพรุนสูงมากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการดูด ซึบน้ำและความสามารถในการอุ้มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเจลาติน คือ เมื่อ อัตราส่วนของเจลาตินเพิ่มให้ความสามารถในการดูดซับน้ำและการอุ้มน้ำเพิ่ม อาจเป็นไปได้ว่า เมื่อมี ปริมาณเจลาตินเพิ่มทำให้มีโมเลกุลของน้ำและมีระยะห่างระหว่างโมเลกุลมากขึ้น สำหรับการย่อย สลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ควรสอดคล้องกับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์สามารถย่อยสลายได้เร็วกว่า 28 วัน โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์มีอัตราการย่อยสลายเร็วขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณเจลาติน

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงด้วยเซลล์ human skin fibroblast (HSF) พบว่า จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มเป็นเวลา 14 วัน และลดลง เนื่องจากการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์ที่อัตราส่วนเจลาตินต่อโคโตซาน 7:3 มีจำนวนเซลล์สูงสุด อาจเป็นเพราะว่าโครงสร้างสัณฐานภายในมีความเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์และพื้นผิวของวัสดุที่เป็นบวกทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี และเมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งของแบคทีเรียโดยใช้ยา Ciprofloxacin hydrochloride (CIP) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มียาสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ หลังจากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปปลูกฝังในผิวหนังกระต่าย ซึ่งจำลองบาดแผลระดับ full-thickness พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มียามีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบของบาดแผลได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มียา

เนื่องจากชีววัสดุมีสมบัติทางกลต่ำ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ง่าย และมีการย่อยสลายที่เร็ว จึงได้ทำการปรับปรุงวัสดุเพื่อลดความสามารถในการละลายน้ำและมีความสามารถในการย่อยสลายช้าลง และเพื่อให้วัสดุมีความเสถียรภาพและสอดคล้องกับการนำไปใช้งาน วิธีการชะลออัตราการย่อยสลายของชีววัสดุที่นิยมใช้คือ การเชื่อมขวาง ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT) การเชื่อมขวางโดยสารเคมี เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (glutaldehyde) และ 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ซึ่งกลไกการเชื่อมขวางด้วยวิธีต่าง ๆ จะแตกต่างกัน

2.5 การเชื่อมขวาง (Crosslinking)

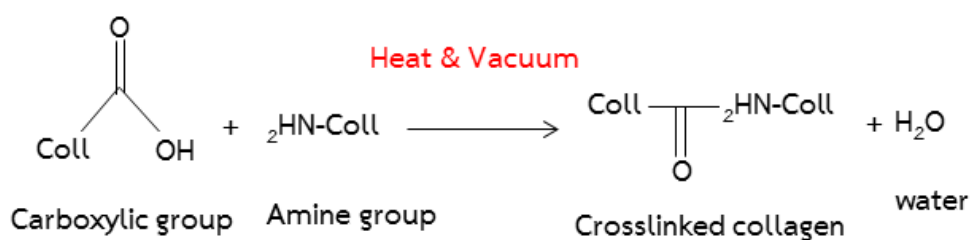
การเชื่อมขวางเป็นกระบวนการสร้างพันธะทางเคมีภายใน หรือระหว่างสายโซ่โพลิเมอร์ของพอลิเมอร์ ส่งผลให้สมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไป โดยทำให้วัสดุมีสมบัติเชิงกลดีขึ้น ทำให้อัตราการย่อยสลายช้าลง และยังปรับปรุงความสามารถในการบวมน้ำ (Swelling capacity) ของวัสดุให้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้งาน ซึ่งการเชื่อมขวางนั้นมีหลายวิธี โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักคือ การเชื่อมขวางทางกายภาพและการเชื่อมขวางทางเคมี

2.5.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical Crosslinking) ได้แก่ การใช้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT) การใช้รังสี เช่น การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-irradiation) การฉายรังสีแกมมา (gamma irradiation) เป็นต้น

2.5.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment, DHT)

การเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อน เป็นการเชื่อมขวางระหว่างหมู่อะมิโนของคอลลาเจน และหมู่คาร์บอกซิลิกของสายโซ่พอลิเมอร์ที่อยู่ใกล้กัน โดยอาศัยความร้อนและจะมีการขับน้ำออกมา 1 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.12 ส่งผลทำให้คอลลาเจนมีความสามารถในการทนแรงดึงเพิ่มขึ้น และความสามารถในการกักเก็บน้ำลดลง [70] จุดเด่นของการใช้ความร้อนในการเชื่อมขวางคือ เป็นวิธีการเชื่อมขวางที่ไม่ใช้สารเคมี ทำให้ไม่มีสารเคมีตกค้างหลังการเชื่อมขวาง แต่การเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีข้อจำกัดคือ สามารถเกิดขึ้นได้เฉพาะในหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ใกล้กันเท่านั้น และความร้อนอาจทำให้โปรตีนเสียสภาพ (denature) ได้ ในปี 2011 Haugh, M. G. และคณะ [71] ได้ศึกษาการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจนกับไกลโคสะมิโนไกลแคน (collagen-glycosaminoglycan, CG) ด้วยเทคนิคต่าง ๆ กัน (เช่น การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC หรือ EDAC) กลูตารัลดีไฮด์ และการเชื่อมขวางด้วยความร้อน) ที่มีผลต่อคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ จากการศึกษาพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อน เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเชื่อมขวางทำให้ค่ามอดูลัสแรงอัดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในปี 2010 Drexler, J. W. และคณะ [72] ได้ทำการศึกษาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน ด้วยกระบวนการทางไฟฟ้าสถิต (electrospinning) และเปรียบเทียบการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (DHT) เชื่อมขวางทางเคมีโดยใช้สารเชื่อมขวาง EDC และเชื่อมขวางร่วมระหว่าง DHT และ EDC จากการศึกษาพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย DHT, EDC, และ DHT/EDC และไม่ผ่านการแช่ในสารละลาย HBS (HEPES buffered saline) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย แต่เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีต่าง ๆ ไปแช่ในสารละลาย HBS เป็นเวลา 7 วัน พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย EDC จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพิ่มขึ้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้น 15 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย DHT และยังพบว่า ระยะห่างภายในของเส้นใยของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย DHT/EDC จะมีขนาดใหญ่กว่า ส่งผลทำให้ขนาดรูพรุนมีขนาดใหญ่ และมีการย่อยสลายที่ช้ากว่าการเชื่อมขวางด้วยวิธีอื่น นอกจากนี้ยังพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย DHT/EDC ยังมีความแข็งแรง และความเหนียวที่มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีอื่นอีกด้วย เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงด้วยเซลล์ผิวหนัง (dermal fibroblasts) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย DHT จะมี % penetration ที่สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย EDC แต่

ไม่ค่อยแตกต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย DHT/EDC ดังนั้นในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนด้วยการเชื่อมขวางทางความร้อนจะทำให้มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ แต่จะมีประสิทธิภาพดีขึ้น เมื่อมีการเชื่อมขวางร่วมกับการเชื่อมขวางทางเคมี เนื่องจากการเชื่อมขวางทางความร้อนมีข้อจำกัดคือ สามารถเกิดขึ้นได้เฉพาะในหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ใกล้กันดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น



รูปที่ 2.12 การเชื่อมขวางโปรตีนด้วยความร้อน [71]

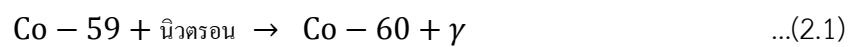
2.5.1.2 การเชื่อมขวางด้วยการฉายรังสีแกมมา (Gamma ray)

การฉายรังสีเป็นหนึ่งในกรรมวิธีที่นำมาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ เมื่อนำพอลิเมอร์ไปฉายรังสี พลังงานจากรังสีซึ่งถูกถ่ายทอดไปยังโมเลกุลของพอลิเมอร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในโครงสร้างของโมเลกุลพอลิเมอร์ได้ โดยมีปฏิกิริยาหลักเกิดขึ้นสองชนิด คือการเกิดการเชื่อมขวาง (Crosslinking) และการย่อยสลาย (Degradation) ทั้งสองปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้พร้อม ๆ กัน โดยมีปฏิกิริยาอันไดอันหนึ่งที่เกิดขึ้นมากกว่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักสองประการ คือ โครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์และปริมาณรังสีที่ฉาย (กิโลเกรย์, kGy) ซึ่งการเชื่อมขวางและการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจะส่งผลกระทบต่อสมบัติเชิงกลและเชิงความร้อนของพอลิเมอร์

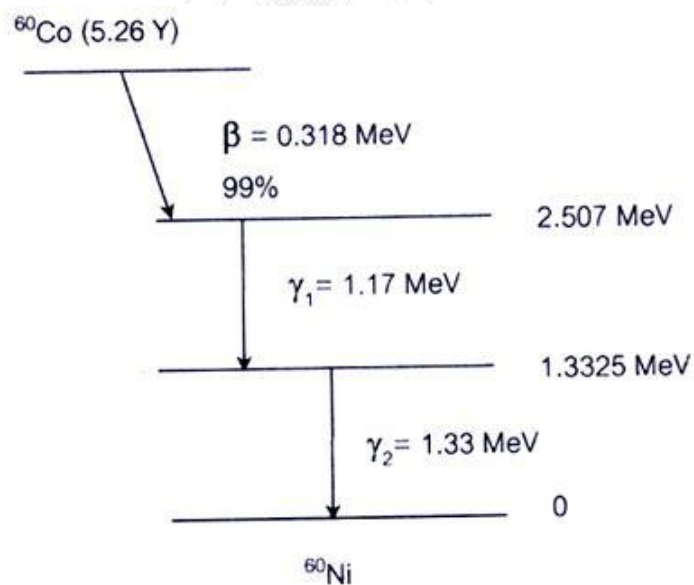
รังสีแกมมา (Gamma Ray) เกิดจากการที่นิวเคลียสที่อยู่ในสถานะกระตุ้นกลับสู่สถานะพื้นฐานโดยการปลดปล่อยรังสีแกมมาออกมา รังสีแกมมาจึงเป็นโฟตอนของการแผ่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าพลังงานสูง มีสมบัติเช่นเดียวกับรังสีเอ็กซ์ แต่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าและมีอำนาจในการทะลุทะลวงสูงมากกว่ารังสีเอ็กซ์ ไม่มีประจุไฟฟ้าและมวล ไม่เบี่ยงเบนในสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็ก และเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่าแสงสามารถทะลุผ่านร่างกายได้ การกำบังรังสีแกมมาต้องใช้วัสดุที่มีความหนาแน่นสูงเช่น ตะกั่วหรือยูเรเนียม เป็นต้น

1. แหล่งกำเนิดรังสีแกมมาโคบอลต์-60

รังสีแกมมาที่ใช้ในงานด้านการปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ส่วนใหญ่จะมีต้นกำเนิดรังสีจากธาตุกัมมันตรังสี เช่น โคบอลต์-60 (cobalt-60) เป็นแหล่งกำเนิดรังสีแกมมาที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันซึ่งเป็นไอโซโทปรังสี (radioisotope) สามารถสลายตัวและแผ่กัมมันตภาพรังสีออกมาได้ โดยโคบอลต์-60 มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 60 หน่วย ไม่ปรากฏอยู่ในธรรมชาติ แต่ผลิตได้จากการกระตุ้นธาตุโคบอลต์ Co-59 ด้วยนิวตรอนในเครื่องปฏิกรณ์ Co-60 ดังแสดงในสมการ (2.1) สามารถสลายตัวให้รังสีแกมมา 2 พลังงานคือ 1.33 และ 1.17 MeV ดังแสดงในรูปที่ 2.13



นอกจากนี้ แหล่งของรังสีแกมมาอีกชนิดหนึ่งคือ กัมมันตรังสีซีเซียม-137 (Cs-137) ซึ่งได้จากปฏิกิริยาฟิชชันในเครื่องปฏิกรณ์นิวเคลียร์ Cs-137 สลายตัวให้รังสีแกมมาพลังงาน 0.662 MeV เป็นต้น



รูปที่ 2.13 การสลายตัวของ Co-60 [73]

2. การประยุกต์ใช้งานของรังสีแกมมา

2.1 เทคโนโลยีพันธุกรรม (Genetic Technology)

รังสีแกมมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต เพราะมีพลังงานสูง ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับดีเอ็นเอ โดยปกติสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีหน้าที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมจะทำให้เกิดหน่วยพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น สีของดอก รูปลักษณะของลำต้น ใบ เป็นต้น

2.2 เทคโนโลยีการถนอมอาหาร

เทคโนโลยีการถนอมอาหารนั้นมีหลากหลายวิธี โดยสาระสำคัญอยู่ที่การพยายามฆ่าหรือทำลายเชื้อโรคในอาหาร โดยทั่วไปแล้วการใช้ความร้อนซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างได้ผลมาก หากเพียงการใช้ความร้อนเป็นการบิบบังคับว่าอาหารนั้นจำเป็นที่จะต้องสุกจึงจะถนอมไว้ได้ เพื่อตัดปัญหานี้ การฉายรังสีจึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่า เนื่องจากการฉายรังสีที่มีพลังงานสูง เช่น รังสีแกมมานี้จะไปทำลายเซลล์สิ่งมีชีวิต รวมไปถึงสารพันธุกรรมต่าง ๆ โดยไม่กระทบกระเทือนกับอาหาร ถึงแม้ว่าการดูดซึมรังสีของอาหารจะทำให้เกิดความร้อนขึ้นมาเล็กน้อย แต่สิ่งนั้นก่อให้เกิดความผิดปกติของรสชาติอาหารไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการฉายรังสีดูเหมือนจะเป็นหนทางที่ดีในการถนอมอาหาร แต่กลุ่มผู้บริโภคบางส่วนก็มีแนวคิดว่าการฉายรังสีอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาบางอย่างกับอาหารแล้วทำให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อร่างกายได้ แต่ปัจจุบันถือเป็นการทำปลอดเชื้อ (sterilization) มาตรฐานวิธีหนึ่งโดยอาหารที่ผ่านการฉายด้วยรังสีแกมมาต้องติดฉลากระบุให้ชัดเจน เพื่อให้ผู้บริโภคเลือก

2.3 ด้านการแพทย์

ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิด โดยการฉายรังสีแกมมาที่ได้จาก โคบอลต์-60 เข้าไปทำลายเซลล์มะเร็ง ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งในระยะแรกสามารถรักษาให้หายขาดได้ แล้วยังใช้โซเดียม-24 ที่อยู่ในรูปของโซเดียมคลอไรด์ฉีดเข้าไปในเส้นเลือด เพื่อตรวจการไหลเวียนของโลหิต โดยโซเดียม-24 จะสลายให้รังสีบีตาซึ่งสามารถตรวจวัดได้ และสามารถบอกได้ว่ามีการตีตันของเส้นเลือดหรือไม่

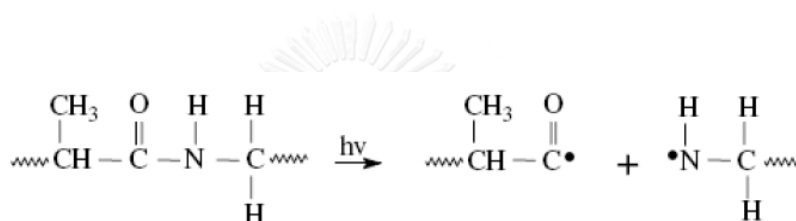
สำหรับรายงานวิจัยที่ใช้รังสีแกมมาเชื่อมขวางพอลิเมอร์ ได้แก่ เมื่อปี 2007 Srinivas, A. และคณะ [74] ศึกษาการใช้รังสีแกมมา โดยใช้ปริมาณรังสีที่ฉาย (radiation dose) ที่ค่าต่าง ๆ กัน (0-13.5 kGy) เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพ (เช่น การทดสอบการบวมน้ำ ลักษณะผิวหน้า

(surface topography) และโครงสร้างของรูพรุน เป็นต้น) และทางชีวภาพ (เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนเซลล์) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปด้วยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวาง divinyl sulfone (DVS) และเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแต่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย DVS จากการทดลองพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา มีความสามารถในการบวมน้ำลดลง โครงสร้างจะมีลักษณะอ่อน กล่าวคือ มีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น พื้นผิวจะมีความหยาบ มีขนาดของรูพรุนเพิ่มขึ้น และสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิวลดลง ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณรังสีที่ได้รับเพิ่มขึ้น การฉายรังสีแกมมาผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาพแห้ง จะทำให้เกิดการอัดตัวแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์มากขึ้น การบวมน้ำลดลง และขนาดของรูพรุนลดลงมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ฉายรังสีในสภาวะเปียก หรืออุ้มน้ำอยู่ นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการฉายด้วยรังสีแกมมา สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดี เมื่อเทียบกับพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการฉายด้วยรังสีแกมมา อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการฉายด้วยรังสีแกมมาเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน (มากกว่า 60 วัน) อาจเกิดการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ถึงแม้ว่าการฉายรังสีแกมมาทำให้สามารถปรับปรุงสมบัติทางกายและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการย่อยสลายที่อาจจะเป็นผลทำให้เกิดอนุภาคนิวเคลียสได้ และอาจทำให้มีการตัดสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกให้สั้นลงอีกด้วย

ในปี 2011 Lim, Y. -M. และคณะ [75] ได้ทำการเตรียมและวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของไฮโดรเจลผสมระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกกับพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) และไฮโดรเจลผสมระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกกับเจลาตินที่สัดส่วนต่าง ๆ กัน และทำการเชื่อมขวางไฮโดรเจลด้วยเทคนิคการฉายรังสีแกมมาด้วยปริมาณรังสีที่ฉาย (radiation dose) ที่ 10, 30, 50 และ 70 kGy จากการศึกษาพบว่า ร้อยละของการก่อเจล (gel fraction) ของไฮโดรเจลผสมระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกกับ PVP และไฮโดรเจลผสมระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกกับเจลาติน จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเชื่อมขวางด้วยการฉายรังสีแกมมา โดยไฮโดรเจลผสมระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกกับ PVP จะมีร้อยละของการก่อเจลด้อยกว่าไฮโดรเจลผสมระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกกับเจลาตินที่ได้รับปริมาณรังสีในช่วง 30-50 kGy แต่เมื่อปริมาณรังสีที่ได้รับสูงขึ้น ร้อยละของการก่อเจลจะลดลง นอกจากนี้ปริมาณรังสีที่ได้รับเพิ่มจะส่งผลให้ไฮโดรเจลมีอุณหภูมิละลายตัวและเสถียรภาพทางความร้อนสูงขึ้นด้วย และยังเหนียวนำไปเกิดโครงร่างตาข่ายเพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้การบวมน้ำของไฮโดรเจลลดลง

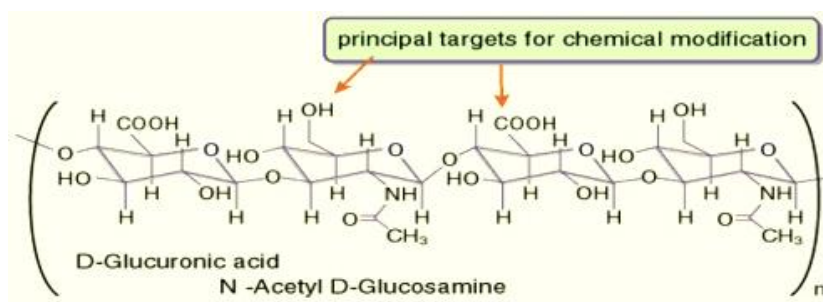
2.5.1.3 การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Irradiation, UV)

การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเกิดจากการป้อนรังสีอัลตราไวโอเลตโดยกระบวนการ photodegradation เข้าไปตัดโซ่ระหว่างพันธะภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เกิดเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ของหมู่เอมีนอิสระขึ้น ซึ่งหมู่เอมีนอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะไปเชื่อมขวางกับหมู่เอมีนอิสระของพอลิเมอร์โมเลกุลอื่น ทำให้เกิดการเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีน ดังแสดงในรูปที่ 2.14 การเชื่อมขวางวิธีนี้สามารถให้ค่าความหนาแน่นของการเชื่อมขวางสูงมาก ใช้ระยะเวลาในการเชื่อมขวางสั้น และไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้าง แต่ถ้าระยะเวลาในการฉายรังสีนานเกินไปอาจจะทำให้สายโซ่ของพอลิเมอร์ถูกตัดให้สั้นลง [70]



รูปที่ 2.14 การเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางโดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต [76]

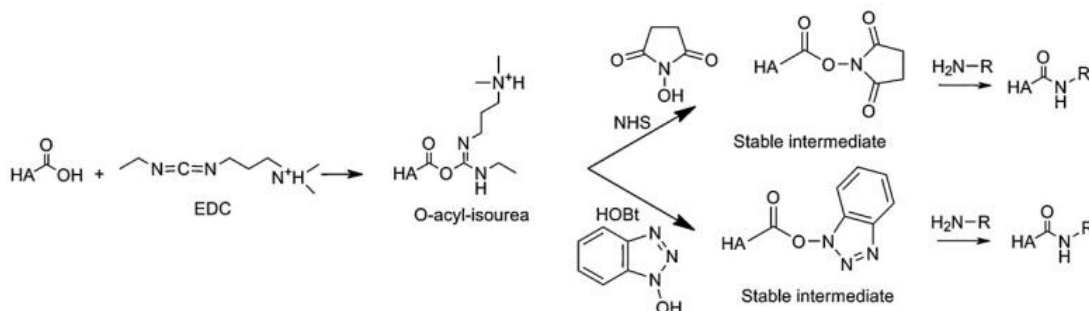
2.5.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking) โดยส่วนใหญ่จะเกิดผ่านหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ คือ หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ไฮดรอกซิล ดังแสดงในรูปที่ 2.15 และสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการเชื่อมขวางได้แก่ สารที่มีหมู่แอลดีไฮด์ เช่น Glutaldehyde (GA), Formaldehyde, N-hydroxysuccinimide (NHS) และ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) [9]



รูปที่ 2.15 ตำแหน่งสำหรับการเชื่อมขวางทางเคมีของโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิก [77]

2.5.2.1 การเชื่อมขวางผ่านหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล ได้แก่

1. การเชื่อมขวางหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลที่เกิดผ่านปฏิกิริยา Amidation โดยใช้สารเชื่อมขวางประเภท Carbodiimides เช่น 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) การเชื่อมขวางด้วย EDC เป็นวิธีการที่น่าสนใจ และได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีข้อดีคือ ภายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการเชื่อมขวางจะได้อนุพันธ์ของยูเรียหรือ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) urea ซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกายและสามารถกำจัดออกได้ง่ายด้วยการล้างน้ำ



รูปที่ 2.16 การเชื่อมขวางของกรดไฮยาลูรอนิกด้วย EDC ร่วมกับ NHS หรือ HOBt [78]

รูปที่ 2.16 แสดงกลไกการเชื่อมขวางของหมู่คาร์บอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกด้วย EDC ร่วมกับ N-Hydroxysuccinimide (NHS) โดย EDC จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิกในกรดไฮยาลูรอนิก เกิดเป็นสารที่อยู่ในรูปไม่เสถียร เรียกว่า intermediate ซึ่งก็คือ O-acylisourea intermediate โดย O-acylisourea intermediate ที่เกิดขึ้นมีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ดังนั้นป้องกันไม่ให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาในการเชื่อมขวางและเพื่อเพิ่มความเสถียรมากขึ้น โดย NHS จะทำปฏิกิริยา

กับ O-acylisourea intermediate เกิดเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น ก็คือ O-acylisourea ester จากนั้น O-acylisourea ester จะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับหมู่เอมีน เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ที่มีความเสถียร หลังเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวาง EDC และ NHS จะถูกกำจัดออก ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการเชื่อมขวาง คือ อนุพันธ์ของยูเรีย ซึ่งสามารถกำจัดได้โดยการล้างน้ำออก ข้อดีของวิธีนี้คือ ไม่มีสารเคมีตกค้างอยู่ในชิ้นงาน นอกจากนี้ปฏิกิริยาเชื่อมขวางจะเกิดได้เร็ว เมื่อทำในสภาวะที่มี pH~3.5-4.5 และปฏิกิริยาจะเกิดได้สมบูรณ์หลังจากการเชื่อมขวางเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่รายงานในงานวิจัยนี้จะอยู่ในช่วง 15 นาที ถึง 24 ชั่วโมง [79]

ตัวอย่างการเชื่อมขวางวัสดุพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ด้วย EDC ได้แก่ เมื่อปี 2002 Park, S. -N. และคณะ [80] ได้ทำการศึกษาลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิก ด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิการแช่แข็งต่าง ๆ กัน โดยผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) ที่ความเข้มข้น 1-100 มิลลิโมลาร์ สำหรับใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ จากการศึกษาพบว่า ลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิก ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ EDC เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ผสมผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC จะทำให้ความพรุนเพิ่มขึ้น และส่งผลทำให้ขนาดของรูพรุนใหญ่ขึ้นด้วย และได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่เหลืออยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่ผ่านการเชื่อมขวาง ด้วยการหาเปอร์เซ็นต์กลูโคซามีน (glucosamine) พบว่า ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่เหลือ อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางแล้วจะมีปริมาณเท่ากับ $8.9 \pm 1.2\%$ นอกจากนี้การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจนกับกรดไฮยาลูรอนิกในเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC และ GA พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค มีอัตราการย่อยสลายที่ช้ากว่า EDC

ในปี 2012 Zhou, Z. และคณะ [81] ได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปและวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินกับกรดไฮยาลูรอนิก โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่สัดส่วนต่าง ๆ กัน และทำการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกล ความเสถียรภาพ และสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ จากการศึกษาพบว่า การเชื่อมขวางด้วย EDC จะทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ผสมมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและมีรูพรุนขนาดเล็ก มีความหนาแน่นมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง และเมื่อความเข้มข้นของ EDC เพิ่มมากขึ้น โครง

เลี้ยงเซลล์จะบวมน้ำได้น้อยลง เนื่องจากการเชื่อมขวางจะทำให้หมู่ที่มีความชอบน้ำในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกและเจลาตินลดลง ผลการทดสอบสมบัติทางกลพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของสารเชื่อมขวางจะทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงต่อการกดอัดเพิ่มขึ้น

ในปี 2013 Zhou, Z. และคณะ [7] ได้ทำการขึ้นรูปไฮโดรเจลผสมระหว่างเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิก และทำการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC โดยศึกษาอิทธิพลของการเชื่อมขวาง รวมทั้งความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง และเวลาในการเชื่อมขวางต่อสัญญาณวิทยาของไฮโดรเจลผสม จากการศึกษาพบว่า สมบัติของไฮโดรเจล (สัญญาณวิทยา อัตราการบวม น้ำ ฯลฯ) จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางและเวลาในการเชื่อมขวาง กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ไฮโดรเจลผสมจะมีขนาดรูพรุนเล็กลง เนื่องจากโครงสร้างหนาแน่นขึ้น และมีอัตราการบวมน้ำลดลงแต่ก็ไม่แตกต่างกันมากที่ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางต่าง ๆ กัน ระดับการเชื่อมขวางที่เพิ่มขึ้นทำให้หมู่ที่ชอบน้ำลดลง และยังส่งผลให้ไฮโดรเจลมีค่าความเค้นแรงอัดเพิ่มขึ้นด้วย อันเนื่องมาจากการเกิดพันธะทางเคมีระหว่างพอลิเมอร์ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อระยะเวลาในการเชื่อมขวางมากขึ้นจะช่วยให้พอลิเมอร์มีเวลามากพอในการเกิดปฏิกิริยาและเพิ่มระดับการเชื่อมขวาง ซึ่งจะทำให้ได้ไฮโดรเจลบวมน้ำได้น้อยลง แต่มีความเค้นแรงอัดสูงขึ้น เมื่อนำเซลล์ผิวหนังของหนู (Rat Fibroblast cell) มาเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง เนื่องจาก EDC เป็นสารเชื่อมขวางที่กำจัดออกได้ง่ายด้วยการล้างด้วยกรดอ่อนหรือน้ำจึงทำให้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ในปี 2010 Yan, S. -Q และคณะ [82] ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่สัดส่วนต่าง ๆ กัน โดยได้เปรียบเทียบสมบัติทางเคมีและกายภาพของฟิล์มผสมที่ได้กับฟิล์มผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC/NHS และ EDC/NHS/MES พบว่า พื้นผิวของฟิล์มผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC/NHS และ EDC/NHS/MES จะมีลักษณะคล้ายกับพื้นผิวของฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกจะช่วยทำให้พันธะไฮโดรเจนและการเกิดอันตรกิริยาของแรงดึงดูดระหว่างประจุและแรงต้านของโมเลกุลไฟโบรอินไหมไทยมีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ฟิล์มที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางจะมีค่าความทนต่อแรงดึงสูงกว่าฟิล์มที่ผ่านการเชื่อมขวาง แต่ในทางตรงกันข้าม ฟิล์มที่

ผ่านการเชื่อมขวางจะมีค่าร้อยละของการยึดของชิ้นงานที่จุดขาดที่แสดงสมบัติด้านความแข็งแรงเปราะ ของวัสดุสูงกว่าฟิล์มที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง และเมื่อนำเซลล์ไฟโบริบลาสต์ (L929) มาเลี้ยงบนฟิล์ม ผสม พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะ และเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งแสดงถึงสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ ฟิล์มผสมดังกล่าว

ในปี 2012 Jetbumpenkul, P. และคณะ [83] ได้ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสม ระหว่างชีววัสดุ 2 ชนิด ที่มีประจุตรงข้ามกัน ได้แก่ ไฟโบริอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอทีสัดส่วน การผสมต่างๆ กัน ซึ่งชีววัสดุทั้ง 2 ชนิดจะอยู่ร่วมกันด้วยแรงทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic Blending) โดยได้เปรียบเทียบสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้กับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวาง ด้วยเทคนิค EDC/NHS จากการศึกษาพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งกรณีที่ผ่านการเชื่อมขวางและไม่ผ่านการเชื่อมขวาง มีโครงสร้างของรูพรุนที่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่สัดส่วนการ ผสมระหว่างไฟโบริอินไหมไทยและเจลาติน 50/50 มีสมบัติใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการ เชื่อมขวางมากที่สุด กล่าวคือ มีค่าร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปน้อยที่สุด และมีความสามารถในการทน แรงกดได้ดี เนื่องจากความสมดุลของแรงดึงดูดระหว่างประจุของไฟโบริอินไหมไทยและเจลาติน นั้นเอง สำหรับการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางและมีองค์ประกอบของเจลาตินในสัดส่วนที่สูงจะมีอัตรา การย่อยสลายที่ค่อนข้างเร็ว และเมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่สกัดแยกจากของหนูวิสตัดมาเลี้ยง บนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวางมีการเจริญเติบโต น้อยกว่ากรณีเซลล์ที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวาง

ในปี 2013 Enrione, J. และคณะ [12] ได้ทำการศึกษาผลกระทบของปริมาณเจลาตินและ ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง(EDC/NHS/MES) ต่อสมบัติทางความร้อน (อาทิ อุณหภูมิการเปลี่ยน สถานะคล้ายแก้วและอุณหภูมิหลอมเหลว) และสมบัติทางกายภาพ (เช่น ความพรุนและรูพรุนของ โครงสร้างจุลภาค) ของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาติน ไคโตซาน และกรดไฮยาลูรอนิก จาก การศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของ EDC/NHS/MES ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ต่อสมบัติทางความร้อนและสมบัติทางกายภาพ

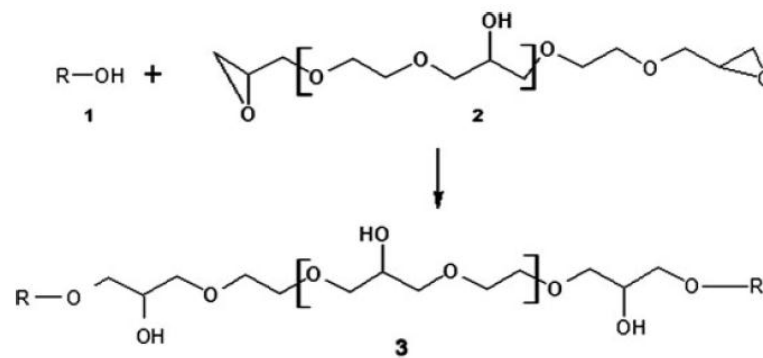
ในปี 2014 Chen, J. และคณะ [84] ได้ขึ้นรูปเมมเบรนเส้นใยกรดไฮยาลูรอนิก ที่ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิกต่าง ๆ (0.05, 0.15, และ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งและทำการเชื่อมขวางด้วย EDC เพื่อให้เมมเบรนเส้นใยสามารถต้านการละลายน้ำได้ เพื่อใช้ในการงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ จากการศึกษาพบว่า โครงสร้างพื้นฐานของเมมเบรนเส้นใยกรดไฮยาลูรอนิกจะมีลักษณะเปลี่ยนไปเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกเปลี่ยน และเมื่อทำการเชื่อมขวางเมมเบรนเส้นใยกรดไฮยาลูรอนิกพบว่า ความสามารถต้านการละลายน้ำ และความหนาแน่นในการเชื่อมขวางมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาในการเชื่อมขวาง นอกจากนี้แล้วเมื่อเพิ่มเวลาในการเชื่อมขวางยังทำให้การระเหยของน้ำลดลงอีกด้วย และผลจากการวิเคราะห์ด้วย TGA และ DSC พบว่า น้ำหนักที่หายไปและเอนทัลปีของการควบแน่น (dehydration enthalpy) มีค่าลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความสามารถต้านการละลายน้ำของเมมเบรนเส้นใยกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางมีค่าน้อยกว่า เมื่อเทียบกับเมมเบรนที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง แต่ทั้งนี้คุณสมบัติในการสลายตัวเพิ่มขึ้น เป็นผลเนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของน้ำหลังจากผ่านการเชื่อมขวาง

ในปี 2006 Powell, H. M. และคณะ [10] ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจน และ chondroitin-6-sulfate (GAG) ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และทำการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS/MES ที่ความเข้มข้นของ EDC ต่าง ๆ (0, 1, 5, 10, และ 50 มิลลิโมลาร์) จากการศึกษาพบว่า คุณลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางและไม่ผ่านการเชื่อมขวางไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพื้นฐาน แต่มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดในด้านความเสถียรภาพ สมบัติทางกล และ cellular organization ของโครงเลี้ยงเซลล์ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของ EDC เพิ่มขึ้นส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ผสมต้านการย่อยสลายได้ดี โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ EDC เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โครงเลี้ยงเซลล์ผสมต้านการย่อยสลายได้ถึง 30 วัน เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง (ตัวควบคุม) ที่ย่อยสลายภายใน 3 วัน ถึงแม้ความทนต่อแรงดึงและมอดูลัสมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นเพิ่ม แต่จากผลการศึกษาพบว่า ความเหนียวและความแข็งของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิโมลาร์ มีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อถึงจุด ๆ หนึ่ง ความเหนียวและความแข็งของวัสดุจะลดลง เนื่องจากการแพร่ของสารเชื่อมขวางเข้าไปภายในโครงเลี้ยงเซลล์ผสมจะช้าที่ความเข้มข้นของ EDC สูง โดยปฏิกิริยาเริ่มต้นจะเกิดที่พื้นผิวมากกว่า ซึ่งเป็นข้อจำกัดของสารเชื่อมขวางและอาจจะเกิดจากความเค้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางมีค่าสูง จึงส่งผลให้เส้นใยคอลลาเจนแข็งเปราะและ

ความสามารถในการยืด (elongation) มีค่าน้อย เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ผสมที่ใช้ในการทดลองมีโครงสร้างรูพรุนแบบเปิด และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางไปเลี้ยงด้วยเซลล์ human fibroblast (HF) และ human keratinocytes (HK) พบว่าเซลล์ที่พบในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 มิลลิโมลาร์ จะมีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำและ cellular organization ไม่ดี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ EDC ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 และ 50 มิลลิโมลาร์ ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์จะทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลง จากการศึกษาเมื่อปี 1996 ของ Hanthamrongwit, M. และคณะ [85] พบว่า EDC ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากสารเชื่อมขวาง EDC ที่ใช้มีความเข้มข้นสูง และเมื่อเกิดปฏิกิริยาจะเหลือส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาอยู่มาก ซึ่งถ้ากำจัดออกไม่หมดจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

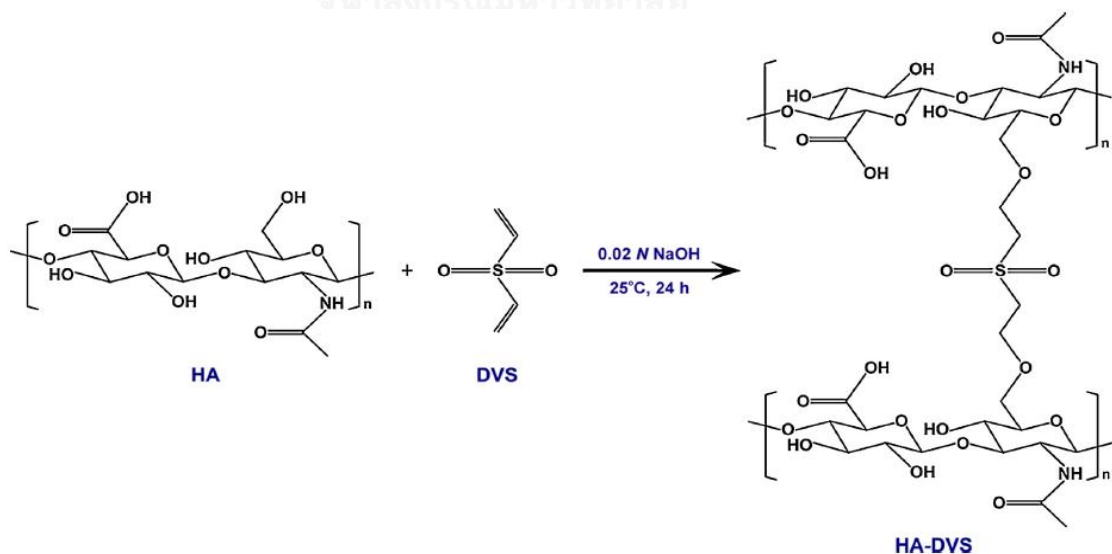
2.5.2.2 การเชื่อมขวางผ่านหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล สามารถเกิดเป็นพันธะอีเทอร์ โดยใช้สารประเภท Epoxide เช่น Butanedioldiglycidyl ether (BDDE) ในตัวกลางที่เป็นต่าง โดยใช้ปฏิกิริยาการเปิดวงของ Epoxide เพื่อสร้างพันธะอีเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก หรือใช้สารเชื่อมขวางประเภท Divinyl sulfone (DVS) ในตัวกลางที่เป็นต่าง โดยปฏิกิริยาจะเกิดการสร้างพันธะ Sulfonyl bisethyl ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก การเชื่อมขวางผ่านหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลได้แก่

1. การเชื่อมขวางหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลที่เกิดผ่านปฏิกิริยาการเกิดหมู่อีเทอร์ (ether formation) โดยการเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี (Epoxy compound) การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี เป็นการปรับปรุงหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิเมอร์ เกิดเป็นพันธะเอสเทอร์และพันธะอีเทอร์ได้ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 2.17 สารเชื่อมขวางประเภทสารประกอบอีพอกซี ได้แก่ เอทิลีนไกลคอลไดโกลซิไดลอีเทอร์ (Ethylene glycoldiglycidylether) ไกลคอลพอลิโกลซิไดลอีเทอร์ (Glycerol polyglycidylether) และเมทิลโกลซิไดลอีเทอร์ (Methylglycidylether) เป็นต้น สารประกอบอีพอกซีใช้ระยะเวลาการเชื่อมขวางนานกว่ากลูตารัลดีไฮด์ แต่วัสดุที่ได้สามารถลดการเกิดเกลือแคลเซียมและมีความยืดหยุ่นกว่าวัสดุที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์



รูปที่ 2.17 การเชื่อมขวางของกรดไฮยาลูรอนิคด้วย poly(ethylene glycol)diglycidyl (PEGDG) เมื่อ 1=หมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิค 2=หมู่อีพอกซีของ poly(ethyleneglycol)diglycidyl ether 3=พันธะเชื่อมขวางอีเทอร์ [86]

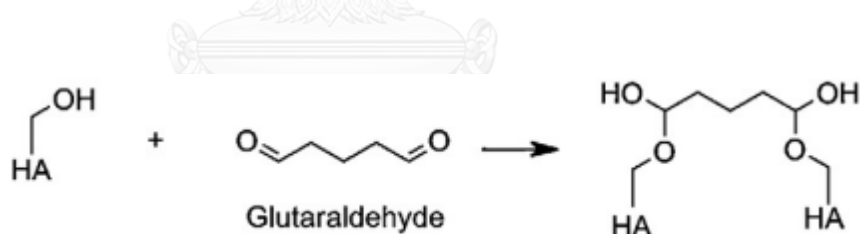
2. การเชื่อมขวางหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลที่เกิดผ่านปฏิกิริยา ether formation โดยการเชื่อมขวางด้วยไดไวนิล ซัลฟอน (divinylsulfone, DVS) กลไกการเชื่อมขวางของหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิเมอร์ด้วย DVS แสดงดังรูปที่ 2.18 โดยที่ DVS จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิเมอร์ ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส ทำให้เกิดเป็น sulfonyl-bis-ethyl มีรายงานว่าเจลไฮยาลูรอนิคที่เชื่อมขวางด้วย DVS มีความเสถียรสูงและสามารถคงรูปไว้ได้หลายวัน เมื่อเทียบกับเจลกรดไฮยาลูรอนิคที่เชื่อมขวางด้วยวิธี autocrosslinking [87]



รูปที่ 2.18 การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิคด้วย DVS [88]

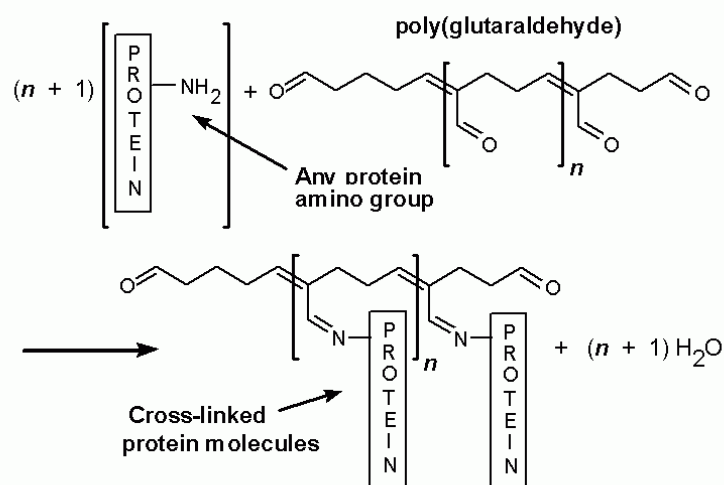
3. การเชื่อมขวางหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลที่เกิดผ่านปฏิกิริยา Hemiacetal โดยใช้สารเชื่อมขวางกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, GA) กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารประเภทแอลดีไฮด์ที่นิยมใช้ในการเชื่อมขวาง เนื่องจากราคาไม่แพง ปฏิกิริยาการเชื่อมขวางเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์มีลักษณะเป็นสายโซ่ตรงประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม และมีหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่ ที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล และหมู่แอลดีไฮด์จะช่วยทำหน้าที่ในการเชื่อมขวางกับหมู่อะมิโนของโปรตีนและหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์ กลูตารัลดีไฮด์จึงเป็นสารเชื่อมขวางสำหรับโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์

ตัวอย่างการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA และหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็น Hemiacetal โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวางในการเชื่อมขวางแบบแช่ที่ใช้ตัวกลางเป็นอะซิโตนกับน้ำ กลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-250 mM จะทำให้ไฮโดรเจลกรดไฮยาลูรอนิกมีการบวมน้ำต่ำลง ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณการเชื่อมขวางที่สูง และยังพบว่าปฏิกิริยาเชื่อมขวางจะเกิดได้เร็วเมื่อทำในตัวกลางที่เป็นกรด (pH~2) เนื่องจากเป็นการกระตุ้นหมู่แอลดีไฮด์ให้เกิดปฏิกิริยาสมบรูณ์มากขึ้น รูปที่ 2.19 แสดงหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) โดยจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (-OH) ของกรดไฮยาลูรอนิก



รูปที่ 2.19 การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [78]

นอกจากนี้หมู่แอลดีไฮด์ของกลูตารัลดีไฮด์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน (-NH₂) ของโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 2.20 เมื่อความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง แต่มีสมบัติทางกลดีขึ้นและทำให้ความชอบน้ำ (hydrophilic) ลดลง



รูปที่ 2.20 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [89]

ข้อดีของการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์คือ จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยปฏิกิริยาการเชื่อมขวางขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ตัวทำละลาย ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของกลูตารัลดีไฮด์ ข้อเสียของวิธีนี้ คือ กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารที่มีพิษ ดังนั้นหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวางจึงจำเป็นต้องกำจัด กลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินที่อาจตกค้างอยู่ในชิ้นงานออก โดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน ซึ่งมีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) เหมือนกับโปรตีน โดยกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่จะไปจับกับหมู่อะมิโนของสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนแทน [90]

ในปี 2011 Bigi, A. และคณะ [8] ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, GA) ที่มีผลต่อสมบัติทางกลและสมบัติทางความร้อนของฟิล์มเจลาติน จากการศึกษาพบว่า เมื่อความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มจะส่งผลทำให้ความสามารถในการยืดตัว (extensibility) ของฟิล์มลดลง แต่ค่าความทนต่อแรงดึง ณ จุดขาด (stress at break) มีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การบวมน้ำมีค่าลดลง โดยที่ค่าจะสูงกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ เล็กน้อย เมื่อฟิล์มเจลาตินผ่านเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ด้วยความเข้มข้นอย่างน้อย 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และยังเพิ่มค่ามอดูลัสยังของฟิล์มด้วย อย่างไรก็ตามการเชื่อมขวางด้วยความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่ำ ๆ สามารถทำให้ฟิล์มมีความเสถียรได้ แต่ที่ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะทำให้ได้ฟิล์มที่มีค่ามอดูลัสของยังเป็น 20 เท่า ของฟิล์มที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง ส่วนสมบัติทางความ

ร้อนและการบวมน้ำจะมีค่าใกล้เคียงกัน ในการเลือกความเข้มข้นของกลูตาธione ควรเลือกให้เหมาะสมกับการนำวัสดุไปใช้งาน เนื่องจากกลูตาธione มีความเป็นพิษหากกำจัดกลูตาธione ส่วนเกินออกไม่หมด

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ใช้ทั้งวิธีการเชื่อมขวางทางกายภาพร่วมกับการเชื่อมขวางทางเคมี ได้แก่ เมื่อปี 2010 จากรายงานของ Ratanavaraporn, J. และคณะ [13] ซึ่งได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปเส้นใยเจลลาตินชนิดเอและชนิดบี โดยใช้เทคนิคการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต และเปรียบเทียบคุณลักษณะและความสามารถในการเชื่อมขวางของเส้นใยเจลลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การใช้ความร้อน สารเคมี และการใช้พลาสมา พบว่า การเชื่อมขวางทางกายภาพทำให้อายุที่ลดลงของน้ำหนักมีค่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับวิธีการเชื่อมขวางทางเคมี และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการเชื่อมขวางทางเคมี และพบว่า แผ่นเส้นใยเจลลาตินชนิดเอที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีการพ่นละอองของสารละลาย EDC ก่อนการแช่ในสารละลาย EDC จะมีค่าอายุที่ลดลงของน้ำหนักน้อยที่สุด เนื่องจากการพ่นละอองเป็นการจำกัดปริมาณสารละลาย EDC ที่สัมผัสกับแผ่นเส้นใยโดยตรง และทำให้เกิดการเชื่อมขวางของเส้นใยก่อนบางส่วน จากนั้นจึงค่อยนำไปแช่ในสารละลาย EDC ซึ่งวิธีนี้ช่วยลดการละลายของแผ่นเส้นใยเจลลาตินได้เล็กน้อย โดยจะช่วยไม่ให้เจลลาตินละลายก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางโดยสมบูรณ์ ส่วนแผ่นเส้นใยเจลลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีการทางกายภาพมีค่าอายุการเชื่อมขวางน้อยกว่าและมีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพที่เร็วกว่าแผ่นเส้นใยเจลลาตินที่เชื่อมขวางด้วยวิธีทางเคมีแบบต่าง ๆ เพราะวิธีทางกายภาพจะเกิดการเชื่อมขวางที่พื้นผิวของแผ่นเส้นใยเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบการเชื่อมขวางระหว่างแผ่นเส้นใยเจลลาตินชนิดเอ และชนิดบีที่ใช้วิธีการเชื่อมขวางเหมือนกัน พบว่า อายุการเชื่อมขวางของแผ่นเจลลาตินชนิดบี มีค่าสูงกว่าอายุการเชื่อมขวางของเจลลาตินชนิดเอ เนื่องจากเจลลาตินชนิดบีผลิตมาจากกระบวนการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจนในสารละลายต่าง ทำให้ได้เจลลาตินที่มีปริมาณหมู่คาร์บอกซิลิกมาก ดังนั้นปริมาณหมู่คาร์บอกซิลิกที่มากอาจจะเป็นสาเหตุทำให้เจลลาตินชนิดบีเกิดการเชื่อมขวางด้วย EDC ได้มากกว่าเจลลาตินชนิดเอ ผลการเชื่อมขวางนี้ยังสอดคล้องกับความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใย กล่าวคือ แผ่นเส้นใยเจลลาตินชนิดบีที่เกิดการเชื่อมขวางมากกว่าจะย่อยสลายทางชีวภาพได้ช้ากว่าแผ่นเส้นใยเจลลาตินชนิดเอ

โดยสรุป การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกและเจลาติน ทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพและทางเคมี สำหรับการเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.9 และการเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิกกับชีวส์ตูดอื่น ๆ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.10



ตารางที่ 2.9 สรุปการเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิก [78]

ตำแหน่งในกรดไฮยาลูรอนิก	ประเภทการเกิดปฏิกิริยา	สารกระตุ้น (Activator)	สารทำปฏิกิริยา (reagent)	ตัวทำละลาย
หมู่คาร์บอกซิล (-COOH)	Amidation	Carbodiimides	EDC, NHS	Water (pH 4.75-7.5) หรือ DMSO
		CMPI	CMPI, triethylamine	
		CDMT	CDMT, NMM	
	Ugi condensation	1,1'-Carbonyl-diimidazole	1,1'-Carbonyl-diimidazole	
			Formaldehyde, diamine, cyclohexyl isocyanide	Water (pH 3)
			Trimethylsilyl diazomethane, acetic acid	DMSO
Esterification	Alkyl halides	Alkyl iodides หรือ bromides	DMSO	
	Tetraethylene glycol tosylate	Tetraethylene glycol tosylate	DMSO	
	Bisepoxide	Butanediol-diglycidyl ether	Water (acetic acid, pH 2-5)	
หมู่ไฮดรอกซิล (-OH)	Ether formation	Sodium periodate	Sodium periodate	Water
		Bisepoxides	1,2,3,4-Diepoxybutane	Water (0.2M NaOH, pH>13)
			Butanediol-diglycidyl ether	Water (0.25M NaOH, pH>13)
			Ethyleneglycol diglycidyl ether และ	Water (1M NaOH, pH 14)

ตารางที่ 2.9 สรุปการเชื่อมขวางทางเคมีของทรานสโพรตีน (ต่อ)

ตำแหน่งในทรานสโพรตีน	ประเภทการเกิดปฏิกิริยา	สารกระตุ้น (Activator)	สารทำปฏิกิริยา (reagent)	ตัวทำละลาย
		polyglycerol polyglycidylether Epichlorohydrin หรือ diepoxystyrene		Water (pH 10 then pH 4)
		Divinyl sulfone Ethylenesulfide	Divinyl sulfone Ethylenesulfide, dithiothreitol (DTT)	Water (0.2M NaOH, pH >13) Water (pH 8.5-10)
	Hemiacetal formation	Glutaraldehyde	Glutaraldehyde	Water (pH 2)
	Esterification	Alkyl succinic anhydrides Acyl-chloride activated carboxylate Methacrylic anhydride	Octenyl succinic anhydride	Water (pH 9) DMSO
	Carbamate formation	Cyanogen bromide (CNBr)		Water (pH 8-10) Water (pH 9-10) Water (pH 9-10)
หมู่อะซีตามิโด (NHCOCH ₃)	Deacetylation/ amidation	Hydrazine sulfate		Water followed by DMSO

ตารางที่ 2.10 การเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮดรอนกับชีววัสดุอื่น ๆ [77]

วัสดุทำโครง เลี้ยงเซลล์	สารเชื่อมขวาง	กลไกทางเคมี	รูปแบบโครง เลี้ยงเซลล์ที่ ผลิต	การ ประยุกต์ใช้ งาน	สมบัติทาง กายภาพที่ศึกษา	สมบัติทาง ชีวภาพที่ ศึกษา	ข้อดี	ข้อเสีย
HA	Butanediol diglycidyl ether with NaOH pH adjustmet	Photochemistry Methacryloyl modification and crosslinking	Gel	General TE applications	Swelling, crosslinking density	-	Shape changing/Anisotropic swelling	Requires primod
HA	DVS	-	Gel	Tissue grafts	Crosslink density, swelling, degradation	Cell culture (rat aortic cells)	-	Excess crosslinker must be removed
HA	EDC	-	Gas in liquid templating	General TE applications	-	-	-	-
HA	DL-dithiothreitol with RGD peptide functionalisation	Methacrylate functionalisation with cystein thiol groups on peptide (Michael type reaction)	Freeze drying	Brain tissue	Swelling, porosity	Human Glioblastoma cells	ECM tunable ligand density	-

ตารางที่ 2.10 การเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาทรูอนิคกับชีววัสดุอื่น ๆ (ต่อ)

วัสดุทำโครง เลี้ยงเซลล์	สารเชื่อม ขวาง	กลไกทางเคมี	รูปแบบโครง เลี้ยงเซลล์ที่ ผลิต	การ ประยุกต์ใช้ งาน	สมบัติทาง กายภาพที่ ศึกษา	สมบัติทาง ชีวภาพที่ ศึกษา	ข้อดี	ข้อเสีย
HA	EDC	Immersion	Ice particulate templating	General TE applications	Pore size	Cell culture/ seeding	Controlled porous structures	-
HA based	Adipic dihydrated (ADH) mod EDC	1. MMP peptide thiol crosslinker 2. HA-ADH mod. Crosslinker lamine peptide PEG thiol crosslinker (Michael type reaction)	-	Spinal cord	-	In vitro and in vivo testing hMSCs proliferation Cytotoxicity	Positive influence on regeneration of motor function	-
HA	GTA,EDC,DVS	Immersion	Freeze drying	General soft tissue application	Swelling, thermal, porosity, compression	-	Macroporous,interc onected, adequate mechanical	Excess crosslinker removal required

ตารางที่ 2.10 การเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนกับชีววัสดุอื่น ๆ (ต่อ)

วัสดุทำโครง เลี้ยงเซลล์	สารเชื่อมขวาง	กลไกทางเคมี	รูปแบบ โครงสร้าง เซลล์ที่ผลิต	การ ประยุกต์ใช้ งาน	สมบัติทาง กายภาพที่ ศึกษา	สมบัติทาง ชีวภาพที่ศึกษา	ข้อดี	ข้อเสีย
HA based	Sodium periodate (oxidation)	Oxidation EDC coupling of ADH	Gel	Anti-cancer drug delivery	-	Cell culture C428 cells	Performs better than 2D systems in anticancer drug delivery	-
HA based	-	CDCHR receptor	-	Periodontal tissue	-	Cell culture, Cell adhesion, PCR Histology	-	Inadequate scaffold details
HA/PGA	Glutaraldehyde	-	freeze drying	Muniscal repair	Porosity	In vitro cell viability (human meniscus cells)	Gene expression for meniscus cell	-
HA/Chitosan	-	Schiff base links	Freeze drying	Encapsulant/ tissue scaffold	-	fibroblasts	Non toxic chemistries	pretreatment required
HA/Collagen	EDC	-	Freeze drying	Brain tissue	Compression	Neural stem cells	Good mech properties	-

ตารางที่ 2.10 การเชื่อมขวางทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิคกับชีววัสดุอื่น ๆ (ต่อ)

วัสดุทำโครง เลี้ยงเซลล์	สารเชื่อมขวาง	กลไกทาง เคมี	รูปแบบโครง เลี้ยงเซลล์ที่ ผลิต	การ ประยุกต์ใช้ งาน	สมบัติทาง กายภาพที่ศึกษา	สมบัติทาง ชีวภาพที่ศึกษา	ข้อดี	ข้อเสีย
HA/Collagen	Ethylene glycol diglycidyl ether	-	Freeze drying	Cartilage	Mechanical, degradation	In vitro cell adhesion and proliferation/cho ndrocyte cells implantation in rabbit ears	Easily processed	-
HA/Collagen	EDC	-	Freeze drying	Adipose tissue	Swelling	3T3-C1 Preadipo cytes	Degradation resistant	Highly swollen
HA/Gelatin	EDC	-	Freeze drying	Soft tissue	Swelling	L929 fibroblasts	Good mech properties, Degradation resistant , no cytotoxicity effect	-
HA/Collagen	EDC	-	Freeze drying	Angiogenesis	Swelling, porosity	Histological studies with mice	Good angiogenesis	-

2.6 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)

สมบัติที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของชีววัสดุเมื่อนำไปใช้เป็นไฮโดรเจลหรือเป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ สมบัติทางชีวภาพ โดยเมื่อฝังไฮโดรเจลเข้าสู่ร่างกายไฮโดรเจลต้องสัมผัสกับระบบภายในร่างกาย ดังนั้นการตอบสนองของร่างกายต่อชีววัสดุจึงเป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตไฮโดรเจล โดยปกติชีววัสดุที่มักใช้ผลิตไฮโดรเจลต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย ซึ่งมักเป็นวัสดุที่โครงสร้างโมเลกุลมีหมู่ชอบน้ำ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) เป็นต้น นอกจากนี้มีหมู่ที่มีความชอบน้ำในโครงสร้างแล้ว การมีโครงสร้างทางเคมีที่ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะได้ดีเป็นอีกปัจจัยสำคัญของชีววัสดุในการนำมาใช้ผลิตไฮโดรเจล ตัวอย่างชีววัสดุที่นิยมนำมาใช้ เช่น คอลลาเจน ไกลโคสมิโนไกลแคน ไฟโบรอิน ไคโตซาน เป็นต้น ซึ่งชีววัสดุดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโนที่เซลล์สามารถจดจำได้ เช่น หมู่ลำดับกรดอะมิโนของ อาร์จินีน ไกลซีน กรดแอสพาร์ติก (arginine glycine aspartic acid, RGD) ที่พบในคอลลาเจน เป็นต้น

การทดสอบการเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลสามารถทำได้ด้วยการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อไฮโดรเจลในห้องปฏิบัติการ เช่น การยึดเกาะ (cell adhesion) การเจริญเติบโต (cell proliferation) การอยู่รอด (cell viability) ของเซลล์บนไฮโดรเจล

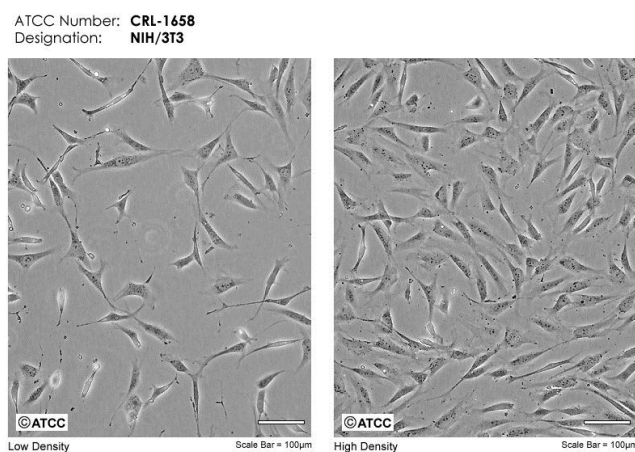
เซลล์ (Cell)

เซลล์ เป็นหน่วยเล็กของเนื้อเยื่อที่สำคัญมากในกระบวนการชีวภาพในร่างกาย ซึ่งแต่ละเซลล์มีองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์สารชีวภาพที่มีส่วนสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพ เมื่อองค์ประกอบดังกล่าวทำงานผิดปกติจะก่อให้เกิดโรคร้าย ทั้งนี้ภายในเนื้อเยื่อประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก โดยแต่ละเซลล์มีการเชื่อมต่อกันและมีการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อ ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะทำการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการจนกลายเป็นเนื้อเยื่อก่อนส่งผ่านเข้าสู่ร่างกาย โดยกระบวนการเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์กลายเป็นเนื้อเยื่อต้องมีสภาวะใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อธรรมชาติของร่างกายมนุษย์ ซึ่งอาจจะต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกันหลายชนิด เช่น การเลี้ยงเซลล์ออสติโอเบลาสต์ร่วมกับออสติโอคลาสต์เพื่อสร้างเนื้อเยื่อกระดูก [91] การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับเคราตินไซต์เพื่อสร้างเนื้อเยื่อผิวหนัง [92] เป็นต้น ตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ แสดงดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างเซลล์และแหล่งที่พบ

ตัวอย่างเซลล์	แหล่งที่พบ
ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast)	ผิวหนัง
เคราติโนไซต์ (keratinocyte)	ผิวหนัง
อีพิเธเลียล (epithelial)	ผิวหนัง
เอนโดเธเลียล (endothelial)	หลอดเลือด
ออสติโอเบลาส (osteoblast)	กระดูก
ออสติโอคลาส (osteoclast)	กระดูก
ออสติโอไซต์ (osteocyte)	กระดูก
ไมโอไซต์ (myocyte)	กล้ามเนื้อ
คอนโดโรไซต์ (chondrocyte)	กระดูกอ่อน

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (Mouse Embryonic Fibroblasts, NIH/3T3) ในการทดสอบความเข้ากันได้กับไฮโดรเจลที่ผลิตขึ้น ซึ่งลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.21 โครงสร้างของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู [93]

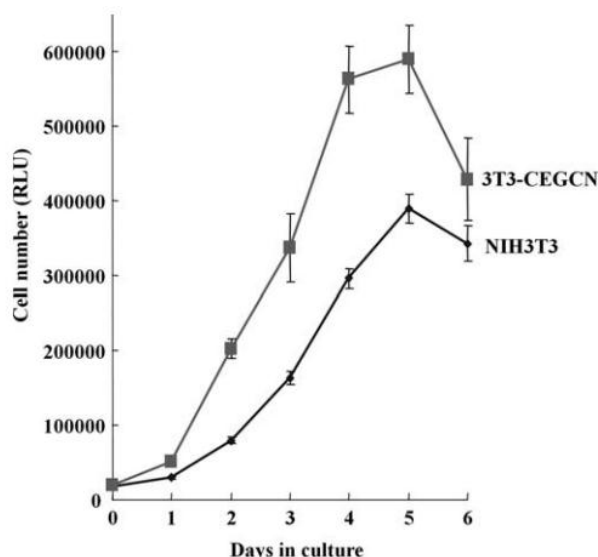
ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเซลล์

Name:	NIH/3T3—Mouse Embryonic Fibroblasts	Cell Type:	fibroblast
ATCC #:	CRL-1658	Age:	embryo
Organism:	Mus musculus, mouse	Morphology:	fibroblast
Strain:	NIH/Swiss	Growth Properties:	adherent
Tissue:	embryo		

เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (NIH/3T3) ถูกค้นพบในปี 1962 โดยภาควิชาพยาธิวิทยาของ New York University School of Medicine เป็นเซลล์ประเภทเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous cell line) ที่ได้จากการถ่ายเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังตัวอ่อนหนูที่สกัดแยกได้จากเนื้อเยื่อของตัวอ่อนหนูสายพันธุ์ NIH/Swiss โดยที่ 3T3 ย่อมาจาก 3-day transfer, inoculum 3×10^5 cells. หมายถึง เซลล์จะมีการถ่ายโอนทุก ๆ 3 วัน ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 3×10^5 เซลล์ต่อ 20 cm^2 เซลล์ NIH/3T3 มีคุณสมบัติเป็น cell contact inhibition สูง กล่าวคือ เมื่อแบ่งตัวจนเต็มพื้นผิวภาชนะแล้ว (ผนังเซลล์ชนกัน) จะหยุดการเจริญเติบโต โดยทั่วไปเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะมีขนาดประมาณ 38-150 ไมโครเมตร [94] เนื่องด้วยเซลล์ NIH/3T3 เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง จึงทำให้มีคุณสมบัติแบ่งตัวได้ไม่สิ้นสุดและสามารถเพาะเลี้ยงต่อไปได้เรื่อย ๆ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้เซลล์ประเภทนี้ถูกนำมาทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการศึกษาและวิจัย เช่น นำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของวัสดุ และศึกษาการยึดเกาะ การเจริญเติบโต รวมทั้งการเคลื่อนย้ายระหว่างเซลล์กับวัสดุ เป็นต้น

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ NIH/3T3 จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) ประกอบด้วย 4.5g/L glucose, L-glutamine ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับซีรัมชนิด fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้น 10% และสารละลาย Penicillin-Streptomycin (10,000 units/ml penicillin และ 10,000 ug/ml streptomycin ความเข้มข้น 1% และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่ความชื้นและ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในปี 2011 Watanabe, S., M. และคณะ [95] ได้รายงานลักษณะจุลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ NIH/3T3 ดังรูปที่ 2.22 เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific

growth rate, μ) เท่ากับ 0.0275 ต่อชั่วโมง และเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) เท่ากับ 25.21 ชั่วโมง



รูปที่ 2.22 กราฟจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 25,000 เซลล์ต่อ 24 well plate (12,500 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) [95]

ตัวอย่างการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (NIH/3T3) ได้แก่ เมื่อปี 2007 Chen, M. และคณะ [96] ได้ทำการศึกษาผลของขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยพอลิคาร์โปแลคโตน (polycaprolactone, PCL) ที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงต่อการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (NIH/3T3 mouse fibroblast cells) จากผลการวิจัยพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 56 ถึง 69 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของเซลล์ NIH/3T3 fibroblast cell (10-15 μm) และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอยู่ในช่วง 117 ถึง 1647 นาโนเมตร และเมื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยด้วยความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2.5×10^5 เซลล์/well (24 well plate) และวิเคราะห์การยึดเกาะของเซลล์ด้วยวิธี CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay (Promega, Madison, WI) และการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTS assay พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน เซลล์มีการแผ่กระจายบนพื้นผิวของ PCL ได้ดี ผลการยึดเกาะของเซลล์

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง พบว่า เซลล์จะยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 428 นาโนเมตร ได้ดีกว่าเส้นใยขนาดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยกล้อง laser scanning confocal microscope พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวด้านบนของโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่าภายในโครงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน จำนวนเซลล์ที่พบในแนวตัดขวางเพิ่มขึ้น

ในปี 2015 Miranda, D. G. และคณะ [97] ได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไฮโดรเจล จากไคโตซาน (CS) และกรดไฮยาลูรอนิก (HA) ที่สัดส่วนการผสมต่าง ๆ กัน (CS:HA = 7:3, 1:1 และ 3:7) โดยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์ MG63 osteoblast-like cell (สกัดแยกจาก human osteosarcoma) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 (สกัดแยกจากเนื้อเยื่ออ่อนของหนูสายพันธุ์ Swiss) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฮโดรเจลด้วยความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี Alamar Blue assay จากผลการวิจัยพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเซลล์ MG63 และ NIH/3T3 เพิ่มขึ้นประมาณ 20% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Alamar Blue ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ไม่มีเซลล์) เนื่องจากว่า การแสดงออกของกลุ่มโปรตีนบนผิวของเซลล์ (CD44) ของเซลล์ NIH/3T3 และ MG63 สูงกว่ากลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฮโดรเจล) แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฮโดรเจลเซลล์มีการเคลื่อนที่ได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในปี 2004 Bhattarai, S. R. และคณะ [98] ได้ทำการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการขึ้นรูปเส้นใยนาโนพอลิเมอร์จาก poly(p-dioxanone-co-L-lactide)-block-poly(ethylene glycol) หรือ PPDO/ PLLA-b-PEG จากผลการวิจัยพบว่า เส้นใยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยเท่ากับ 380 นาโนเมตร และมีขนาดรูพรุนเท่ากับ 8 ไมโครเมตร ความพรุนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยนาโนด้วยเซลล์ NIH/3T3 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, และ 10 วัน และทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA assay พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็น

เวลา 10 วัน จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่า เปรียบเทียบกับวันที่ 1 ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์แบบเส้นใยนาโนช่วยส่งเสริมให้เซลล์เจริญเติบโตและวัสดุที่ใช้ผลิตเส้นใยนาโนไม่เป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ยังศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 2, 3, 5, 7, และ 10 วัน หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 4% กลูตารัลดีไฮด์ และวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า เซลล์มีแนวโน้มแผ่กระจายบนเส้นใยและรวมเป็นกลุ่มก้อนเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน และมีขนาดใหญ่ขึ้นในวันที่ 5 และเซลล์แผ่ปกคลุมเมทริกซ์เส้นใยนาโนในวันที่ 10 แสดงให้เห็นว่าเส้นใยนาโนมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ อย่างไรก็ตามเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ สำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีขนาดเซลล์เท่ากับ 10-15 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนที่ควรอยู่ในช่วง 25-100 ไมโครเมตร [99]

ในปี 2010 Gui-Bo, Y. และคณะ [100] ได้ขึ้นรูปเส้นใยนาโนจากไฟโบรอินและเจลาติน ด้วยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิง โดยเคลือบบนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิแล็กติกแอซิด (PVA) และทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3 mouse fibroblast ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยนาโนด้วยความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 5×10^4 เซลล์ต่อ 24 well plate เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 10, และ 12 วัน และวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วย MTT assay จากผลการวิจัยพบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีบนโครงเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน จำนวนเซลล์มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีพื้นที่ว่างให้เซลล์ยึดเกาะ จึงเป็นสาเหตุให้เซลล์เจริญเติบโตได้ช้าลง นอกจากนี้พบว่าความหนาแน่นของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ PLA/SF-gelatin มีค่าสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ PLA/SF อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าเจลาตินมีองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีเหมือนคอลลาเจน ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์

ในปี 2014 Moon, B. M. และคณะ [101] ได้พัฒนากระบวนการขึ้นรูปแบบซาล้างด้วยเกลือบแบบใหม่เพื่อผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติจากไฟโบรอิน โดยใช้เกลือร่วมกับน้ำตาลซูโคสเป็นอนุภาคในการเกิดรูพรุนที่อัตราส่วนการผสมต่าง ๆ กัน (ขนาดอนุภาคประมาณ 350-550 ไมโครเมตร) และทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ NIH/3T3 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^4 เซลล์ต่อ 24 well-plate ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 7, และ 14 วัน และทำการวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

จากผลการวิจัยพบว่า เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ถึง 14 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโครง
เลี้ยงเซลล์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

ในปี 2015 Li, X. และคณะ [102] ได้พัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไฟโบรอินและพอลิแล็กติก
แอซิด PVA ด้วยเทคนิค thermally induced phase separation (กระบวนการที่ไฟโบรอินมีการก่อเจล
และเกิดการแยกเฟสเป็นไฮโดรเจล) ร่วมกับกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อทดสอบความเป็น
พิษในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์ mouse embryonic fibroblast cell (NIH/3T3) โดยทำการ
เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิเมตร และทำการ
เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 3, 5, และ 7 วัน ทำการวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี Cell
Counting Kit 8 (CCK8) จากผลการวิจัยพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์อย่าง
ต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์จะน้อยกว่าบนจานเพาะเลี้ยงแบบ
พอลิเมอร์สไตรีน (TCP plate) เนื่องจากว่า PVA ไม่ส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์

ในปี 2011 Yang, C. และคณะ [103] ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยนาโนจาก PVA
และเจลาติน ที่อัตราส่วนการผสมต่าง ๆ (100/0, 80/20, 60/40, 40/60, และ 0/100) ด้วย
กระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงและเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้
ในงานด้านแผ่นปิดแผลหรือใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) เมื่อทดสอบ
ความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเซลล์ NIH/3T3 fibroblast โดยเพาะเลี้ยงเซลล์
บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^6 เซลล์ต่อ 24 well-plate เป็นเวลา
6 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2, 3, และ 4
วัน เพื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำการวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ
สัญญาณของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากผลการวิจัยพบว่า โครงสร้าง
สัญญาณของเซลล์ NIH/3T3 ที่สัมผัสกับโครงเลี้ยงเซลล์จะมีลักษณะที่เปลี่ยนไป กล่าวคือ เซลล์จะแผ่
กระจายได้ดีและร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิด มีค่าประมาณ 100 ผล
การศึกษาจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์มีค่า
ใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ถึง 2 วัน ทั้งนี้เมื่อเพิ่มเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน
โครงเลี้ยงเซลล์สัดส่วน 80/20 มีจำนวนเซลล์มีสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์สัดส่วนอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า
โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ผสม

ระหว่าง PVA/gelatin เพราะเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย (ประมาณ 90 นาโนเมตร) มีขนาดค่อนข้างเล็ก และมีโครงข่ายหนาแน่น ซึ่งเซลล์อาจจะแทรกเข้าไปได้น้อย ทำให้จำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้น้อยด้วย แสดงให้เห็นว่า ขนาดของเส้นใยและอัตราส่วนการผสมระหว่าง PVA/gelatin มีผลต่อการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ NIH/3T3 fibroblast



บทที่ 3

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 ไหมไทย (พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1, สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีษะเกษ)

3.1.2 กรดไฮยาลูรอนิก, น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามน้ำหนัก (Mw) = 2,400 KDa, น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (Mv) = 722 KDa (Sodium Hyaluronate, Namsiang Co. Ltd, ไทย)

3.1.3 เจลาตินชนิดเอ, น้ำหนักโมเลกุล 100 kDa, pI = 9 (Nitta Gelatin Inc., Tokyo, ญี่ปุ่น)

3.1.4 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 ; Ajax Finechem, Pty'Ltd, ออสเตรเลีย)

3.1.5 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr; Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน)

3.1.6 ไฮโดรคลอริก (HCl; 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, สหรัฐอเมริกา)

3.1.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, Ajax Finechem, Pty, Ltd, ออสเตรเลีย)

3.1.8 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, pH 7.3-7.5, Bio basic Inc. แคนาดา)

3.1.9 เบต้า อะลานีน (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, ญี่ปุ่น)

3.1.10 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC; nacalaitesque, ญี่ปุ่น)

3.1.11 N-hydroxysuccinimide (NHS) (nacalai tesque, ญี่ปุ่น)

3.1.12 เอทานอล (99.7-100%, VWR International Ltd., อังกฤษ)

3.1.13 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3 99%, Fluka, Buchs, เยอรมัน)

3.1.14 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (NacalaiTesque, Kyoto, ญี่ปุ่น)

3.1.15 โปรติเอส XIV (Protease = 3.5 U/mg, Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

3.1.16 โซเดียมเอไซด์ (NaN_3 , Labchem, APS, ออสเตรเลีย)

3.1.17 น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water)

3.1.18 p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB, Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

- 3.1.19 N-acetyl-D-glucosamine (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.20 สารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ (25% GA, Fluka, เยอรมัน)
- 3.1.21 Sodium dodecyl sulfate lysis buffer (SDS, Bio basic, แคนาดา)
- 3.1.22 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.23 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, 10% medium + L-glutamine + AB, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.24 Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin in EDTA.4Na, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.25 Trypan blue stain 0.4% (Gibco, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.26 bisBenzimide fluorescent dye (Hoechst 33258, 1mg/ml DMSO, SigmaAldric, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.27 Penicilin/streptomycin antibiotic (100 units/ml, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.28 ถาดเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 24 หลุมและ 96 หลุม (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.29 ถาดเลี้ยงเซลล์กลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มม. (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.30 ถังไดอะไลซิส (MWCO 12,000-16,000, Viskase Company Inc, ญี่ปุ่น)
- 3.1.31 แม่พิมพ์เทฟลอน (Teflon Mold, ขนาด กว้างxยาวxสูง = 7x7x2 cm³)

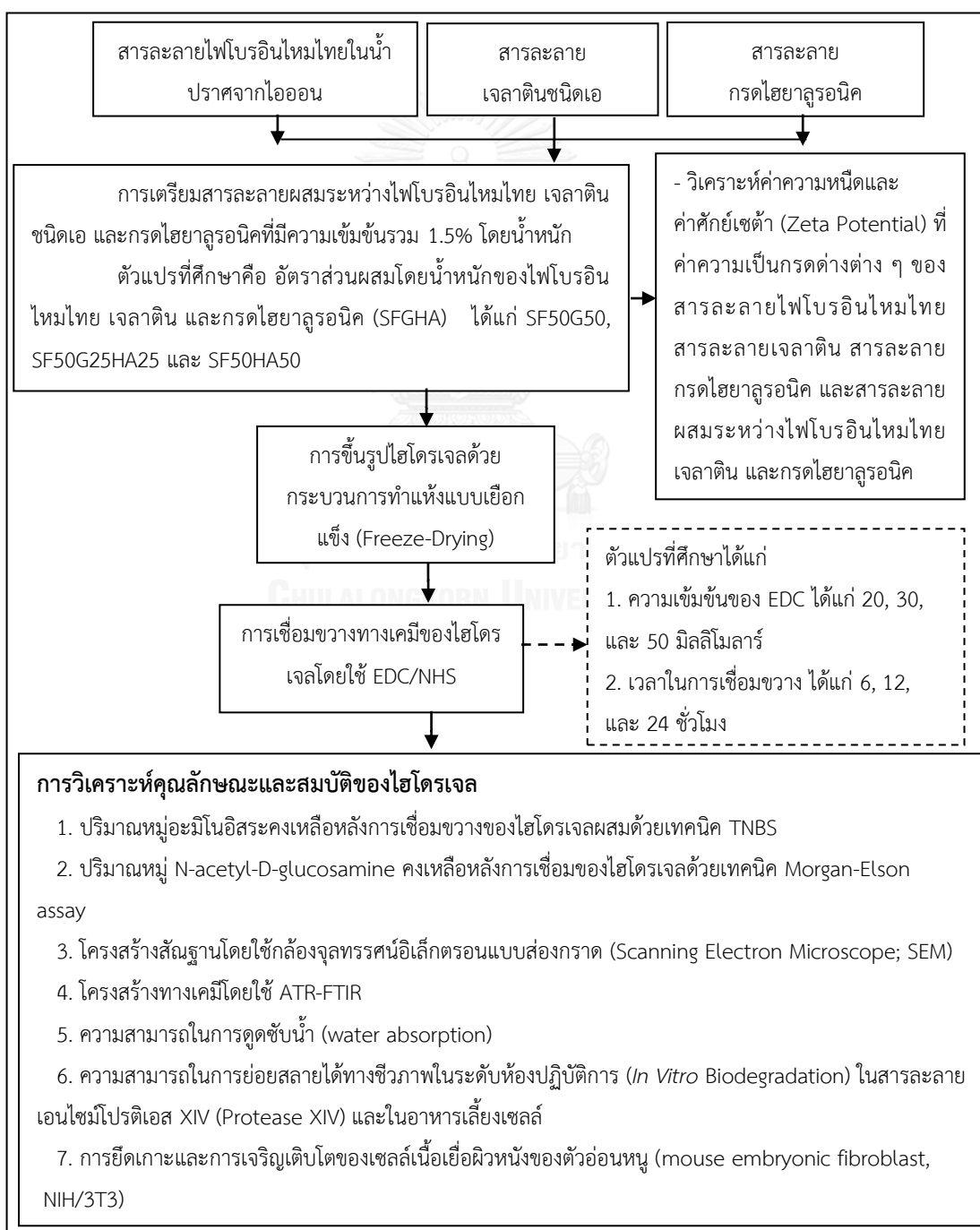
3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)
- 3.2.2 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer, CHRIST®, เยอรมัน) สถานที่ตั้ง: พื้นที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี
- 3.2.3 เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (UV -2450, Shimudzu, ญี่ปุ่น)
- 3.2.4 เครื่องวัดความหนืด (Sine-wave vibro viscometer, SV-10, ญี่ปุ่น)
- 3.2.5 เครื่อง Microplate reader (FLUOstar, Omega, BGM LABTECH, เยอรมัน)
- 3.2.6 ตู้เย็น 4 °C (NR-BU343, Panasonic, ไทย)
- 3.2.7 ตู้เย็น -20 °C (Sandenintercool, ไทย)
- 3.2.8 ตู้เย็น -40 °C (Haier, จีน)

- 3.2.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow, Mars 1800, Scanlaf, เดนมาร์ก)
- 3.2.10 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator, Galaxy 170 R, New Brunswick, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.11 Autopipette (Eppendorf, เยอรมัน)
- 3.2.12 กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, JSM-5410LV, JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)
- 3.2.13 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hotplate Stirrer, Cimarac 3, Thermolyne, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.14 เครื่อง Zetasizer NanoZS nanoseries (Malvaern Instrument Ltd., อังกฤษ)
- 3.2.15 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath, 1235 PC, Shel-Lab, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.16 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter, professional meter, pp-50, เยอรมัน)
- 3.2.17 Hemacytometer (Boeco, เยอรมัน)

3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นกระบวนการขึ้นรูปไฮโดรเจลด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและเชื่อมขวางทางเคมีด้วย 1-ethyl-3-(3-Dimethylamino propyl)carbodiimide hydrochloride, EDC ร่วมกับ N-hydroxysuccinimide (NHS) และส่วนที่สองเป็นการวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไฮโดรเจล รวมทั้งทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังตัวอ่อนหนู รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก

3.4.1.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน สารละลายเจลาติน และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก

การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน จะดำเนินการตามรายงานเมื่อปี 2005 ของ Kim, U.J. และคณะ [5] โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 3.2

1. การกำจัดกาวไหม

1) นำรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 มาดึงปุ๋ยไหมและตัวดักแต่้ออก จากนั้นชั่งน้ำหนักรังไหม 40 กรัม

2) ต้มรังไหมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที

3) นำรังไหมที่ต้มแล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) ประมาณ 4-5 รอบ เพื่อกำจัดเซรีซินและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

4) ทำซ้ำข้อ 2-3 อีกรอบ

5) นำเส้นใยไหมที่ผ่านการกำจัดกาวไหมไปผึ่งให้แห้งประมาณ 2 วัน และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาร้อยละของเซรีซินที่หายไป

6) ฉีกเส้นใยไฟโบรอินให้ฟูเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว สำหรับเตรียมทำสารละลายไฟโบรอินต่อไป

2. การละลายไฟโบรอิน

1) นำเส้นใยไฟโบรอินที่กำจัดกาวไหมแล้วละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ด้วยอัตราส่วนไหม 8 กรัมต่อลิเทียมโบรไมด์ 24 กรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนได้สารละลายไฟโบรอิน

2) นำสารละลายไฟโบรอินมาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ โดยเปลี่ยนน้ำที่เวลา 15, 35, และ 55 นาทีในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง (เช้า กลางวัน เย็น) เป็นเวลา 3 วัน

3) เมื่อไดอะไลซ์เสร็จให้นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน

4) ความเข้มข้นรวมของสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยหาได้จากนำเอาสารละลายไฟโบรอินหลังการไดอะไลซ์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ข้ามคืนพร้อมทั้งชั่งน้ำหนักก่อนและหลังอบแห้ง และได้สารละลายไฟโบรอินความเข้มข้นรวมเท่ากับ 7-7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

การเตรียมสารละลายเจลาติน

1. เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ โดยนำเจลาตินชนิดเอมาแช่ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินบวมตัวเต็มที่
2. ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที-1 ชั่วโมง จนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

การเตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก

เตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก โดยนำกรดไฮยาลูรอนิกละลายในน้ำปราศจากไอออนปั่นกวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

3.4.1.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะของสารละลาย

1. การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลาย

การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาติน สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก เพื่อตรวจสอบความเป็นประจุของสารละลาย โดยจะทำการวัดค่าศักย์เซต้าที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ กัน ซึ่งจะเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายเจลาตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก โดยใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักเท่ากับ SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 ที่มีความเข้มข้นรวม 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้มีค่าเท่ากับ 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, และ 9 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric; HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) และนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าด้วยเครื่อง Zetasizer NanoZS nanoseries (Malvaern Instrument Ltd., อังกฤษ)

2. การวิเคราะห์ความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) ของสารละลาย

การวัดความหนืดของสารละลายสามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาติน สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก โดยอัตราส่วนโดยน้ำหนักเท่ากับ SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 ที่มีความเข้มข้นรวม 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นำสารละลายและสารละลายผสมไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Sine-wave vibro viscometer (SV-10) โดยอาศัยการสั่นสะเทือนด้วยความถี่ 30 เฮิร์ต ที่มีค่า shear rate อยู่ในช่วง 7-420 ต่อวินาที และค่าความหนืดจะวัดด้วยเทคนิค tuning fork vibration ซึ่งจะควบคุมอุณหภูมิของสารละลายผสมในขณะวัดไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิการผสม) และอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิสำหรับการนำไปใช้งาน) แต่จะตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.4.1.3 การขึ้นรูปไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก

การขึ้นรูปไฮโดรเจลโดยใช้กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก ที่มีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 โดยอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 ปั่นกวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เทสารละลายลงในแม่พิมพ์เทฟลอน หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ 3 ชั้น จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.4.1.4 การเชื่อมขวางทางเคมีของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการเชื่อมขวางไฮโดรเจลด้วย EDC เพื่อลดการละลายน้ำของไฮโดรเจลโดยการเชื่อมขวางแบบ heterogeneous crosslinking ขั้นตอนการเชื่อมขวางสามารถทำได้โดย

1. ตัดไฮโดรเจลขนาด 1x1x0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร แช่ในสารเชื่อมขวางที่ประกอบด้วย 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) ร่วมกับ N-hydroxysuccinimide (NHS) ในตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ด้วย EDC ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเชื่อมขวางเท่ากับ 6, 12, และ 24 ชั่วโมง โดยสัญลักษณ์ของไฮโดรเจลผสมชนิดต่าง ๆ ที่เชื่อมขวางด้วย EDC สรุปในตารางที่ 3.1
2. เมื่อครบกำหนดเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง ล้าง EDC ส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกด้วยน้ำปราศจากไอออน 6 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
3. นำไฮโดรเจลไปทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งอีกครั้ง

ตารางที่ 3.1 สัญลักษณ์แทนไฮโดรเจลที่เชื่อมขวางที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ EDC (มิลลิโมลาร์)	เวลาที่ใช้เชื่อมขวาง (ชั่วโมง)		
	6	12	24
20	C20-6h	C20-12h	C20-24h
30	C30-6h	C30-12h	C30-24h
50	C50-6h	C50-12h	C50-24h

3.4.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม

3.4.2.1 การวิเคราะห์สภาวะการเชื่อมขวางที่เหมาะสมในการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก

ในการศึกษาการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิกที่สภาวะการเชื่อมขวางด้วยความเข้มข้นของ EDC คือ 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ และเวลาในการเชื่อมขวางคือ 6, 12, และ 24 ชั่วโมง สามารถวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมขวางไฮโดรเจลได้ด้วยการวิเคราะห์ ดังนี้

1. การวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลหลังจากผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง

การวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าไฮโดรเจลเกิดการเชื่อมขวาง สามารถทำได้ โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของชิ้นงานก่อนการเชื่อมขวางและน้ำหนักแห้งหลังการเชื่อมขวาง และคำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจล ได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไป} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad \dots 3.1$$

โดยที่ W_1 คือ น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลก่อนการเชื่อมขวาง
 W_2 คือ น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลหลังการเชื่อมขวาง

2. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระคงเหลือในไฮโดรเจลหลังผ่านการเชื่อมขวางโดยใช้เทคนิค 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)

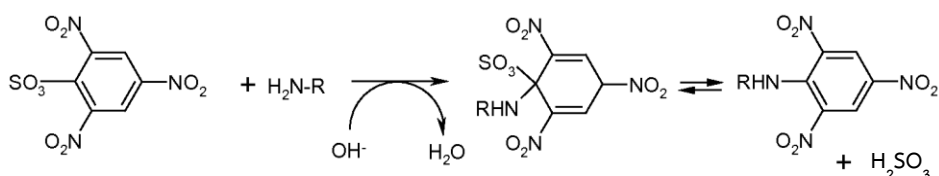
การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยเทคนิค 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bubnis W.A. และ Ofner Iii C.M., ในปี 1992 [104] เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโมเลกุลของโปรตีน เนื่องจากหมู่อะมิโนเป็นองค์ประกอบที่พบในไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบของไฟโบรอินและเจลาติน (สำหรับในงานวิจัยนี้) โดย TNBS จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) ของโปรตีน เกิดเป็นสารละลายสีเหลืองของอนุพันธ์ของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออน โดยสารละลายสีเหลืองที่เกิดขึ้นดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดยถ้าปริมาณหมู่อะมิโนในไฮโดรเจลผสมหลังจากการเชื่อมขวางลดลง แสดงว่าเกิดการเชื่อมขวางภายในไฮโดรเจล การหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสามารถทำได้โดย

1. ชั่งไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย เจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิก 5 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อให้ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย เจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิกละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ β -Alanine เพื่อหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่คงเหลือในไฮโดรเจล ร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระ} = \left(1 - \frac{A_2}{A_1} \right) \times 100 \quad \dots 3.2$$

โดยที่ A_1 คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจลก่อนการเชื่อมขวาง
 A_2 คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจลหลังการเชื่อมขวาง



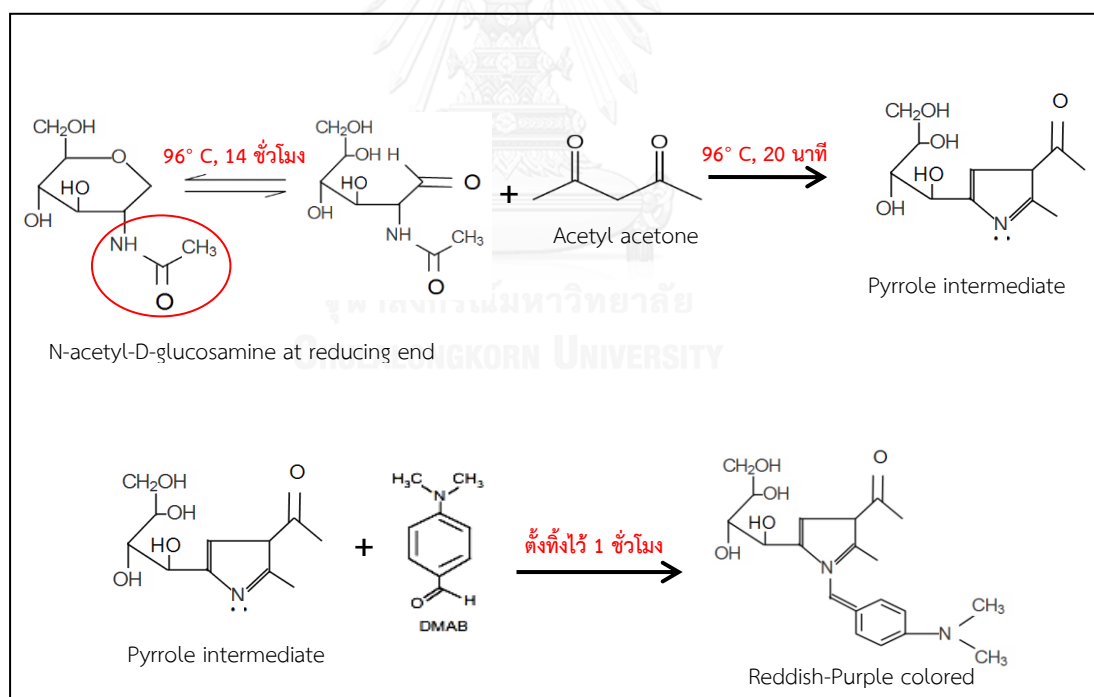
รูปที่ 3.3 ปฏิกริยาระหว่าง 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน เกิดเป็นอนุพันธ์ของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ [105]

3. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) ในไฮโดรเจลหลังผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay

การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ในไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิคหลังผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay (กลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 3.4) ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยในปี 1948 ของ Blix, G. และคณะ [106] โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการไฮโดรไลซ์ชิ้นงานโดยซังไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย เจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิค 5 มิลลิกรัม โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมงในอ่างน้ำร้อน
2. ปรับความเป็นกรดต่างของสารละลายที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ให้มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4N
3. เตรียมสารละลายอะซิติลอะซิโตน โดยนำสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.25 N ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับอะซิติลอะซิโตน ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ปั่นกวนให้เข้ากันแล้วนำสารละลายอะซิติลอะซิโตนที่ได้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายที่ไฮโดรไลซ์แล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขั้นตอนนี้สารละลายอะซิติลอะซิโตนจะเกิดปฏิกิริยา Acetylation กับสารละลายที่ไฮโดรไลซ์ได้ ผลิตภัณฑ์เป็น Pyrrole intermediate

4. นำสารละลายที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ได้จากการผสมระหว่าง p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) 1.6 กรัม กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้หลังจากเติม Ehrlich's reagent จะเปลี่ยนเป็นสีแดง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Pyrrole intermediate และ p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) และมีฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45-60 นาที สารละลายที่ได้จะเป็นสีม่วงอมแดง (Reddish-Purple color) การเกิดปฏิกิริยาของ Elson-Morgan assay สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.4 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 528 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine เพื่อหาปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ที่มีอยู่ในไฮโดรเจลหลังผ่านการเชื่อมขวาง



รูปที่ 3.4 ปฏิกิริยาของ Elson-Morgan assay [107]

3.4.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลผสมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก ถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM, JSM-6610LV, ญี่ปุ่น) โดยตัดไฮโดรเจลในแนวตัดขวาง (cross-section) จากนั้นนำไฮโดรเจลไปวางบนแท่นเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปเคลือบด้วยทองเพื่อให้ชิ้นงานเกิดการนำไฟฟ้า และส่องด้วยกล้องที่กำลังขยาย 35 และ 100 เท่า

3.4.2.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสมด้วย Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิกก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC โดยตัดไฮโดรเจลก่อนและหลังการเชื่อมขวางขนาด 1.5x1.5x0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer, Perkin Elmer (spectrum one) โดยเทคนิค attenuated total reflectance ที่ช่วงความยาวคลื่น 4000-400 ต่อเซนติเมตร

3.4.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำ (Water absorption) ของไฮโดรเจลผสม

การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก อ้างอิงจากงานวิจัยในปี 2005 ของ Eun S. Gil. และคณะ [43] ทำได้โดย

1. ตัดไฮโดรเจลผสมขนาด 1x1x0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำไปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. หลังจากนั้นนำกระดาษแบบไม่มีขุยไปซับที่ผิวหน้าของชิ้นงานทั้ง 2 ด้าน ด้านละ 10 วินาที และชั่งน้ำหนักไฮโดรเจลที่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อหาน้ำหนัก

เปียกของไฮโดรเจล จากนั้นคำนวณความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอิน ไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก จากสมการ

$$\text{ร้อยละการดูดซับน้ำ} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad \dots 3.3$$

โดยที่ W_s น้ำหนักเปียกของไฮโดรเจลผสมหลังแช่ในสารละลาย PBS
 W_d น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลผสมก่อนแช่ในสารละลาย PBS

3.4.2.5 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* biodegradation) ของไฮโดรเจลผสม

1) การย่อยสลายไฮโดรเจลผสม SFGHA ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV (protease XIV) ในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม อ้างอิงจากงานวิจัยในปี 2014 ของ Gil, E.S., และคณะ [108] สามารถทำได้โดย

1. ชั่งน้ำหนักไฮโดรเจลผสม 5 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 วัน เก็บผลตามเวลาที่กำหนด ได้แก่ 1, 3, 7, 10, และ 14 วัน

2. นำไฮโดรเจลผสมมาล้างน้ำปราศจากไอออน 3 รอบ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและชั่งน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจล คำนวณหาร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของไฮโดรเจลได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad \dots 3.4$$

โดยที่ W_f คือ น้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลผสมหลังแช่ในสารละลายเอนไซม์
 W_i คือ น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของไฮโดรเจลผสมก่อนแช่ในสารละลายเอนไซม์

2) การย่อยสลายไฮโดรเจลผสม SFGHA ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสมสามารถทำได้โดย

1. ชั่งน้ำหนักไฮโดรเจลผสม 5 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 0.1% penicillin-streptomycin (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 วัน เก็บผลตามช่วงเวลาที่กำหนด ได้แก่ 1, 2, 3, 4, 5, 7, และ 10 วัน

2. นำไฮโดรเจลผสมมาล้างน้ำปราศจากไอออน 3 รอบ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและชั่งน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจล คำนวณหาร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของไฮโดรเจลได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad \dots 3.5$$

โดยที่ W_f คือ น้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลผสมหลังแช่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์

W_i คือ น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของไฮโดรเจลผสมก่อนแช่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.4.2.6 การวิเคราะห์ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสมกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast cell line, NIH/3T3)

1. ขั้นตอนการเพาะเซลล์ลงบนไฮโดรเจล

เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast, NIH/3T3) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.นพ.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สั่งซื้อจาก ATCC (#CRL-1658)

1. การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู สามารถทำได้โดย

1.1 เซลล์ NIH/3T3 ได้จากการนำสารแขวนลอยเซลล์ที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ออกมาละลาย และนำปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศา

เซลล์เซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์และของเหลวแยกชั้นออกจากกัน หลังจากนั้นเทของเหลว ออกให้เหลือเพียงตะกอนเซลล์ เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ (DMEM ที่ประกอบด้วย 1.5%vol. fetal bovine serum และ 100 U/ml penicillin/streptomycin) 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการดูดฟันทิ้ง ตะกอนเซลล์กระจายในอาหารเลี้ยงเซลล์ และดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่ อาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร

1.2 นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ประสิทธิภาพของเซลล์เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ จึงนำไปทดสอบในลำดับต่อไป

2. การทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) สามารถทำได้โดย

2.1 ไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิกขนาด 5x5x2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge tube)

2.2 เตรียมสารละลายเซลล์เข้มข้น (concentrated cell suspension) โดยใช้ ความหนาแน่นของเซลล์ต่อปริมาตรของไฮโดรเจลเท่ากับ 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดย การหยดสารละลายเซลล์เข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนของไฮโดรเจลให้ครอบคลุมพื้นที่ ทั้งหมดของไฮโดรเจล

2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เซลล์ยึดเกาะบนไฮโดรเจล จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง

2.4 ย้ายไฮโดรเจลใส่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 6 หลุม แล้วเติมน้ำเลี้ยง เซลล์ 3 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2, 4, 6, 12 ชั่วโมง 1, 2, 3, 5, และ 7 วัน

2.5 เมื่อครบตามเวลาเพาะเลี้ยง ทำการวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ DNA (DNA assay) โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่จะแทรกเข้าสู่ DNA double strands ด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader และคำนวณหาอัตราการเจริญ เติบโตของเซลล์ (growth rate) รวมถึงระยะที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population doubling time) บนไฮโดรเจลผสม

2.6 การเตรียมสารมาตรฐานจากเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู ทำโดยนำสารแขวนลอยเซลล์ 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมในหลอดปั่นเหวี่ยงสารขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วเติม SDS lysis buffer 8 มิลลิลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมา จากนั้นทำการเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้น (serial dilution) ระหว่าง 2.0×10^6 ถึง 1.56×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. การหาจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนไฮโดรเจลผสม

การหาจำนวนเซลล์หลังการยึดเกาะและการเจริญเติบโตสามารถตรวจวัดจากการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (DNA assay) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม cell lysate ของไฮโดรเจลที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ มีดังนี้

1.1 ล้างตัวอย่างไฮโดรเจลด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) (ล้าง 3 รอบโดยพยายามให้ PBS เข้าไปล้างด้านในโครงเลี้ยงเซลล์ให้มากที่สุด เพื่อกำจัดเซลล์ตายที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ออก) ดูด PBS ทิ้ง สำหรับการล้างรอบสุดท้าย

1.2 เติมสารละลาย SDS lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมได้จาก 20 มิลลิกรัมของ SDS ละลายในสารละลาย SSC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 95 มิลลิลิตร) ในเซลล์มาตรฐานและตัวอย่างไฮโดรเจลซึ่งไฮโดรเจลจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับ SDS lysis buffer จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผนังเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์

1.3 ทำการแช่แข็งตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และนำมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ซ้ำ 3 รอบ เพื่อให้เซลล์แตก (ผนังเซลล์แตกเนื่องจากน้ำที่อยู่ภายในและนอกเซลล์เกิดเป็นผลึกน้ำแข็งในขั้นตอนการแช่แข็งทำให้เซลล์บวมและแตก)

2. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวัดปริมาณ DNA มีดังนี้

2.1 การเตรียมเซลล์มาตรฐานและตัวอย่างวัดปริมาณ DNA โดยปิเปต 100 ไมโครลิตรของ cell lysate และเซลล์มาตรฐานที่ได้จากการเตรียมในขั้นตอนที่ได้กล่าวมาแล้ว ใส่ในภาชนะขนาด 96 หลุม (black plate)

2.2 เตรียมสารละลาย Hoechst 33258 โดยการนำ Hoechst 33258 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 19 มิลลิลิตร และ SSC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.3 เตรียมสารละลาย Hoechst 33258 ลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดความเข้ม (intensity) ของฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร (Excitation) และ 460 นาโนเมตร (Emission) [8]

3. การคำนวณร้อยละการยึดเกาะ (% attachment) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time)

คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) และระยะ เวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า หรือเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time) บนไฮโดรเจล จากสมการ

ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) คำนวณจาก

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \dots (3.6)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dX \quad \dots (3.7)$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1 \quad \dots (3.8)$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)} \quad \dots (3.9)$$

โดย x_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

x_2 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

ข) เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT)

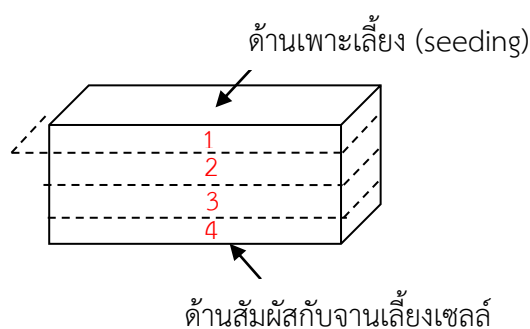
$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \dots (3.10)$$

ค) ร้อยละการยึดเกาะ (Percentage of cell attachment (%))

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะในไฮโดรเจลหลังการเพาะเลี้ยง}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ใส่ในโครงเลี้ยงเซลล์}} \times 100 \dots (3.11)$$

3. การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์บนไฮโดรเจล

การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์บนไฮโดรเจลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) สามารถทำได้โดยล้างไฮโดรเจลที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นเติมสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำการยึดเซลล์ ดูดสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ออก แล้วนำไฮโดรเจลมาผ่านกระบวนการรักษาสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ (serial dilution) เช่น เอทานอล ที่ความเข้มข้น 30, 50, 70, 80, 90, 95, และ 100% โดยปริมาตร โดยแช่ประมาณ 5-10 นาทีต่อชิ้นงาน หลังจากนั้นนำชิ้นงานไปทำแห้งด้วยเทคนิค critical point dry (การใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวไปแทนที่สารละลายอินทรีย์ แล้วทำให้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นแก๊สภายใต้อุณหภูมิและความดันวิกฤติ โดยค่าอุณหภูมิวิกฤติมีค่าเท่ากับ 31 องศาเซลเซียส และค่าความดันวิกฤติเท่ากับ 1,072 psi.) แล้วนำชิ้นงานไปเคลือบด้วยทองเพื่อให้ชิ้นงานสามารถนำไฟฟ้าได้ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด โดยตำแหน่งภาพตัดขวางของไฮโดรเจลที่นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ตำแหน่งภาพตัดขวางของไฮโดรเจล

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยนำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อศึกษาว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติหาความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P\text{-value} < 0.05$)



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการขึ้นรูปไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งแบ่งออกได้ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ไฮโดรเจลผสม SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) และทำการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมด้วยสารเชื่อมขวาง 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) เพื่อศึกษาปัจจัยในการเชื่อมขวาง (ได้แก่ ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง) ที่มีผลต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี รวมทั้งสมบัติทางชีวภาพ เช่น ความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (NIH/3T3 Mouse Embryonic Fibroblasts) ในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาแสดงดังรายละเอียดในหัวข้อต่อไปนี้

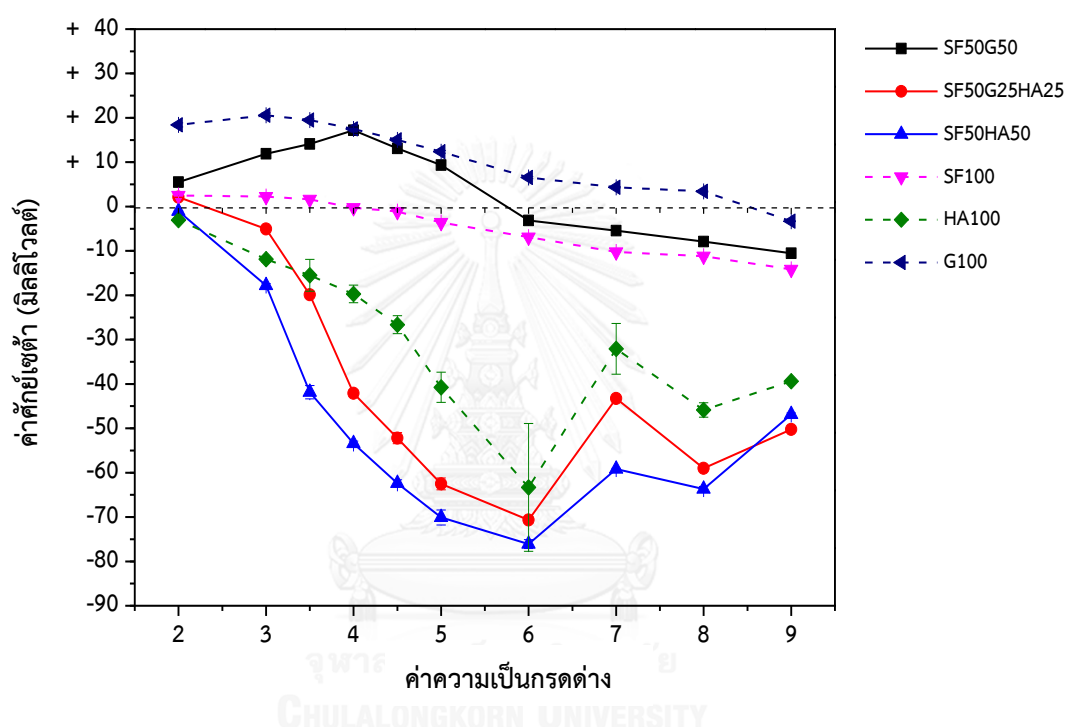
4.1 คุณสมบัติของสารละลายบริสุทธิ์และสารละลายผสม SFGHA

4.1.1. ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) สารละลายเจลาติน (G100) และสารละลายผสม SFGHA

การศึกษาค่าศักย์ゼต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย เจลาตินชนิดเอ กรดไฮยาลูรอนิก และสารละลายผสม SFGHA เพื่อให้ทราบถึงความต่างศักย์ทางไฟฟ้าระหว่างสารละลายกับโมเลกุลที่อยู่ในสารละลาย ค่าศักย์ゼต้าเป็นได้ทั้งค่าบวกและค่าลบขึ้นอยู่กับชนิดของสารละลายและค่าความเป็นกรดต่าง นอกจากนี้ค่าศักย์ゼต้าเป็นค่าที่ใช้บอกแนวโน้มของอนุภาคว่าจะมีการเกาะตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหรือไม่

ผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายและสารละลายผสมที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9 แสดงในรูปที่ 4.1 พบว่า ศักย์ゼต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 3.5 มีค่าเป็นบวกเล็กน้อย และมีค่าเป็นศูนย์เมื่อค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 3.5 ถึง 4.0 ซึ่งเป็นจุดที่แสดงค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มจาก 4 ถึง 9 ค่าศักย์ไฟฟ้ามีค่าเป็นลบประมาณ -14.15 มิลลิโวลต์ ส่วนสารละลายเจลาตินชนิดเอที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 8 มีค่าศักย์ゼต้าเป็นบวกโดยจะมีแนวโน้มเป็นบวกลดลง จนกระทั่งที่ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 8.5 ถึง 8.8 ค่าศักย์ゼต้าจะเป็นศูนย์

ซึ่งเป็นค่า pI ของสารละลายเจลาตินชนิดเอ และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9 ค่าศักย์เซต้าจะเป็นลบเล็กน้อย สำหรับค่าศักย์เซต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีค่าเป็นลบตลอดช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9 เมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าศักย์เซต้ามีแนวโน้มเป็นลบมากขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีทั้งหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิลที่แสดงประจุลบเป็นจำนวนมาก



รูปที่ 4.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายเจลาติน (G100) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายผสม SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 โดยมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9















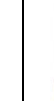








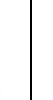







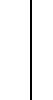
เมื่อพิจารณาค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสม SFGHA พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 6.0 สารละลายผสม SF50G50 มีค่าศักย์เซต้าเท่ากับ +9.34 ถึง -3.21 มิลลิโวลต์ โดยค่าศักย์เซต้าเท่ากับศูนย์ที่ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 5.6 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเมื่อปี 2012 ของ Jetbumpenkun, P. และคณะ [83] พบว่า ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมของไฟโบรอิน

ไหมไทยและเจลาตินชนิดเอที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก (50/50) มีค่าศักย์เซต้าเท่ากับ -0.01 มิลลิโวลต์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.6 ซึ่งค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงถึงค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่มีประจุทางไฟฟ้าเป็นลบสมดุลกับค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายเจลาตินชนิดเอที่มีค่าเป็นบวก ดังนั้นสารละลายทั้งสองชนิดจึงอยู่ร่วมกันด้วยความสมดุลของแรงไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic interactions)

กรณีสารละลายผสมที่เตรียมจากกรดไฮยาลูรอนิก (SF50G25HA25 และ SF50HA50) พบว่า เมื่อค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 2.5 ถึง 9 ค่าศักย์เซต้ามีแนวโน้มใกล้เคียงกับค่าศักย์เซต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งมีค่าเป็นลบตลอดช่วงค่าความเป็นกรดต่าง เนื่องจากโมเลกุลที่อยู่ในสารละลายเกิดแรงผลักกันทำให้ไม่เกิด coacervate เมื่อเทียบกับศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าเข้าใกล้ศูนย์

เมื่อพิจารณาลักษณะของสารละลายผสมในแต่ละชนิดดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า สารละลายผสม SF50G50 ที่ค่าความเป็นกรดต่างจาก 4 ถึง 6 มีลักษณะขุ่น เนื่องจากค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายผสมเท่ากับค่าไอโซอิเล็กทริกของสารละลายไฟโบรอิน (ช่วง 3.5 ถึง 4) ซึ่งมีลักษณะการเกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลของโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 4.3 ทำให้โมเลกุลโปรตีนมีความสามารถในการละลายต่ำ ส่งผลให้สารละลายผสมมีลักษณะขุ่น ในกรณีของสารละลายผสม SF50G25HA25 และ SF50HA50 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 3 ถึง 4 สารละลายผสมมีลักษณะขุ่น เนื่องจากหมู่อะมิโนในโมเลกุลของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายเจลาตินมีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลแบบ Protonate และค่าศักย์เซต้าของกรดไฮยาลูรอนิกในช่วงค่าความเป็นกรดต่างเดียวกันมีค่าเป็นลบ แสดงถึงลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลแบบ Deprotonate ของหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ [109] ส่งผลให้สารละลายผสมทั้งสองเกิดจากการรวมกลุ่มของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ (Complex coacervate) แสดงได้ดังสมการที่ 4.1 [110] เมื่อค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 7 ถึง 9 สารละลายผสม SFGHA ทั้งสามตัวอย่างมีค่าศักย์เซต้าเป็นลบ โมเลกุลของสารเกิดแรงผลักกันจากอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ส่งผลให้สารละลายผสมมีลักษณะใส

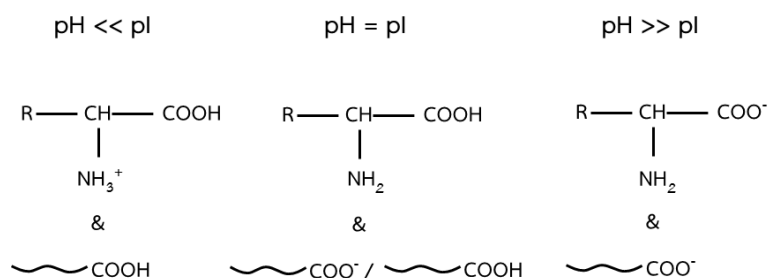


ตัวอย่าง สารละลาย	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
SF50G50	* 	* 	** 	** 	** 	- 	- 	- 
SF50G25HA25	** 	*** 	*** 	- 	- 	- 	- 	- 
SF50HA50	** 	** 	** 	- 	- 	- 	- 	- 
SF100	*** 	*** 	*** 	** 	* 	* 	- 	- 

ระดับความขุ่นที่สังเกตได้ด้วยตา

- หมายถึง สารละลายใส
- * หมายถึง เริ่มขุ่น
- ** หมายถึง ขุ่นปานกลาง
- *** หมายถึง ขุ่นมาก

รูปที่ 4.2 ลักษณะของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) และสารละลายผสม SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 โดยมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9



รูปที่ 4.3 ลักษณะการเกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีนที่มีค่าความเป็นกรดต่าง
ต่าง ๆ กัน [109]

ในปี 2007 Malay, O. และคณะ [110] ได้ทำการศึกษาการเกิด Complex coacervation ระหว่างสารละลายไฟโบรอินและสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก จากค่า Electrophoretic mobility ซึ่งค่านี้มีความสัมพันธ์กับค่าศักย์ゼต้าของสารละลาย โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางทฤษฎีตามสมการของเฮนรี (Henry's law) จากผลการวิจัยพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่า 3.9 ค่า Electrophoretic mobility ของสารละลายไหมไฟโบรอินเป็นบวกและจุดไอโซอิเล็กทริกอยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 3.8 ถึง 4.2 ส่วนค่า Electrophoretic mobility ของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกเป็นลบเมื่อค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 2.5 และเมื่อนำสารละลายผสมกันที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2.5 ถึง 3.9 ทำให้สารละลายผสมมีลักษณะขุ่น แสดงถึงการเกิด Complex coacervation ของสารทั้งสองชนิด เมื่อนำสารละลายผสมไปปั่นเหวี่ยงจะเกิดการแยกชั้น ถ้าเพิ่มสารละลายไฟโบรอินเข้าไปในระบบจะทำให้ชั้นของตะกอน coacervate มีมากขึ้น เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถเกิดอันตรกิริยากับหมู่อะมิโนในโมเลกุลของไฟโบรอินได้มากขึ้น

ในงานวิจัยนี้จึงทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก ให้มีค่าประมาณ 7 และเมื่อนำมาผสมกันในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ กัน สารละลายผสมที่ได้จะมีลักษณะใส ไม่ตกตะกอน ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับกระบวนการขึ้นรูปไฮโดรเจลด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งต่อไป

4.1.2 ค่าความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) สารละลายเจลาติน (G100) สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) และสารละลายผสม SFGHA

การศึกษาความหนืดของสารละลายและสารละลายผสม SFGHA เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสมบัติของไฮโดรเจล โดยค่าความหนืดทำให้ทราบถึงการต้านทานการไหลของสารละลาย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและอุณหภูมิของสารละลาย ในการวิเคราะห์ค่าความหนืดของสารละลายและสารละลายผสม SFGHA สารละลายและสารละลายผสมวัดที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่นำไปใช้งาน นอกจากนี้สารละลายผสมจะวัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปเนื่องจากสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีความหนืดมาก จึงต้องใช้ความร้อนช่วยในการผสมเพื่อให้สารละลายผสมเข้าด้วยกัน โดยมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ผลการวิเคราะห์ค่าความหนืดของสารละลายและสารละลายผสม SFGHA แสดงในตารางที่ 4.1 จากผลการศึกษาพบว่า สารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาตินชนิดเอ และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีค่าความหนืดเท่ากับ 18.57 ± 0.14 , 1.66 ± 0.01 , และ 202.67 ± 0.52 เซนติพอยส์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าความหนืดของสารละลายผสม SF50G50, SF50G25HA25 และ SF50HA50 โดยวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 1.87 ± 0.01 , 64.27 ± 1.03 และ 182.33 ± 8.02 เซนติพอยส์ ตามลำดับ โดยค่าความหนืดของสารละลายผสมมีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนผสมของกรดไฮยาลูรอนิกที่เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความหนืดของสารละลายผสมจะลดลง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายผสม โดยค่าความหนืดของสารละลายผสม SF50G50, SF50G25HA25 และ SF50HA50 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 1.01 ± 0.01 , 44.67 ± 0.52 , และ 160.67 ± 2.25 เซนติพอยส์

ตารางที่ 4.1 ค่าความหนืดปรากฏของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายเจลาติน สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก และสารละลายผสม SFGHA ที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นรวมเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ตัวอย่างสารละลาย	ความหนืด (เซนติพอยส์; cP) ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส	
SF100	18.57 ± 0.14 ^a	
G100	1.66 ± 0.01 ^b	
HA100	202.67 ± 0.52 ^c	
ตัวอย่างสารละลาย	ความหนืด (เซนติพอยส์; cP)	
	อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
SF50G50	1.87 ± 0.01 ^d	1.01 ± 0.01 ^g
SF50G25HA25	64.27 ± 1.03 ^e	44.67 ± 0.52 ^h
SF50HA50	182.33 ± 8.02 ^f	160.67 ± 2.25 ⁱ

(a, b, และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลความหนืดของสารละลายบริสุทธิ์)

(d, e, และ f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลความหนืดของสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส)

(g, h, และ i แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลความหนืดของสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)

4.2 ผลของความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางของไฮโดรเจล

4.2.1. ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจล

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้ในการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสม SFGHA โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้ในการเชื่อมขวางไฮโดรเจล 3 ค่า ได้แก่ 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง คือ 6, 12, และ 24 ชั่วโมง รวมทั้งศึกษาชนิดของไฮโดรเจลผสมที่มีต่อร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลผสมที่หายไป ซึ่งร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปสามารถบ่งบอกความสำเร็จของการเชื่อมขวางด้วย EDC ได้ ผลการศึกษาแสดงได้ดังรูปที่ 4.4 พบว่า

ไฮโดรเจลผสมทุกชนิดก่อนการเชื่อมขวางไม่สามารถคงรูปได้ เนื่องจากเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิกที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรเจลละลายน้ำได้ง่าย ส่งผลทำให้ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปเมื่อไม่ผ่านกระบวนการเชื่อมขวางมีค่าเกือบ 100 ซึ่งมีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยในปี 2012 ของ Jetbumpenkun, P. และคณะ [83] พบว่า ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลผสม SF50G50 ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางมีค่าประมาณ 15 (สารละลายเตรียมที่ความเข้มข้นรวมเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นผลจากสารละลายผสมที่เตรียมมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก น้อยกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่กล่าวข้างต้น ส่งผลทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุน้อย จึงทำให้ร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจล SF50G50 หายไปมาก

เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้ในการเชื่อมขวางต่อร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไป พบว่า ไฮโดรเจลผสมชนิดเดียวกัน ที่เวลาในการเชื่อมขวาง 6, 12, และ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.4 ก-ค) เมื่อความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้ในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลผสมไม่มีความแตกต่างกัน

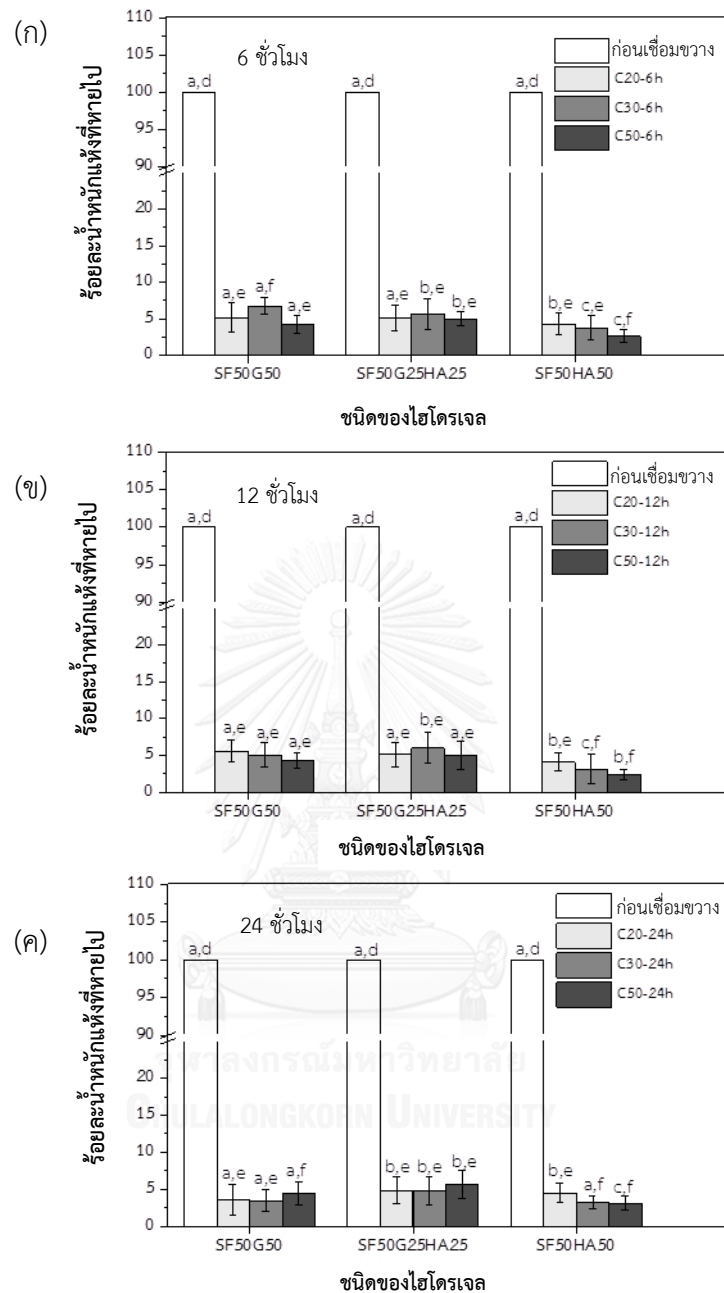
เมื่อพิจารณาผลของชนิดของไฮโดรเจลที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ที่มีต่อร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไป พบว่า เมื่อเชื่อมขวางด้วย EDC ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ และเวลาในการเชื่อมขวางเท่ากัน ไฮโดรเจลผสม SF50G50 และ SF50G25HA25 ที่ได้มีร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อความเข้มข้นของ EDC เพิ่มขึ้นจาก 30 เป็น 50 มิลลิโมลาร์ ร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลผสม SF50HA50 ที่หายไปลดลงเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางต่อร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไป พบว่า เมื่อเชื่อมขวางด้วย EDC ที่ความเข้มข้นเท่ากัน เวลาในการเชื่อมขวางที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อ ร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลทุกชนิดที่หายไปอย่างชัดเจน

จากผลการศึกษาจะเห็นว่า ไฮโดรเจลผสมทุกชนิดที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC มีร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปเมื่อแช่ในสารละลาย EDC ในตัวทำละลายเอทานอลประมาณ 4-5 ซึ่งค่อนข้างต่ำมาก แสดงว่า EDC สามารถเชื่อมขวางระบบชีววัสดุผสมของไฟโบรอิน เจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิกได้สำเร็จ การพิจารณาร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยในการวิเคราะห์หาสภาวะที่ใช้ในการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสม ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันความสำเร็จของการเชื่อมขวางด้วย EDC ในงานวิจัยนี้จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน และปริมาณหมู่ N-acetyl-D-

glucosamine ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกรดไฮยาลูรอนิก ก่อนและหลังการเชื่อมขวาง ผลการศึกษา
แสดงดังรายละเอียดในหัวข้อที่ 4.2.2 และ 4.2.3





รูปที่ 4.4 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปภายหลังจากกระบวนการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วยการแช่ในตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 80:20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่ 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาในการเชื่อมขวาง (ก) 6, (ข) 12, และ (ค) 24 ชั่วโมง (a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบชนิดของไฮโดรเจลที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางเท่ากัน และ d, e, f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่แตกต่างกัน ที่ชนิดของไฮโดรเจลและเวลาในการเชื่อมขวางเหมือนกัน)

4.2.2. ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระคงเหลือในไฮโดรเจลผสม SFGHA และร้อยละหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงภายหลังผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง

ในกระบวนการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสม SFGHA ด้วยสารเชื่อมขวาง EDC หมู่อะมิโนในโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ไม่ถูกเชื่อมขวางในระหว่างกระบวนการเชื่อมขวางสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค TNBS assay ถ้าปริมาณหมู่อะมิโนของไฮโดรเจลผสมภายหลังการเชื่อมขวางลดลง แสดงว่าเกิดการเชื่อมขวางภายในไฮโดรเจล

รูปที่ 4.5 (กราฟด้านซ้าย) แสดงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจล ที่ความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางแตกต่างกัน จากผลการศึกษาพบว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจลผสมทุกชนิดหลังการเชื่อมขวางจะมีค่าน้อยกว่าก่อนการเชื่อมขวาง ซึ่งบ่งบอกถึงหมู่อะมิโนที่ถูกใช้ไปในกระบวนการเชื่อมขวาง เมื่อพิจารณาไฮโดรเจลผสม SF50G50 พบว่า ก่อนการเชื่อมขวางมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้นสูงที่สุด (ประมาณ $1.200 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ มิลลิโมลต่อมิลลิกรัมไฮโดรเจล) รองลงมาคือ ไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 และ SF50HA50 ซึ่งมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเท่ากับ $0.669 \pm 0.04 \times 10^{-3}$ และ $0.283 \pm 0.04 \times 10^{-3}$ มิลลิโมลต่อมิลลิกรัมไฮโดรเจล ตามลำดับ โดยสังเกตได้ว่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้นของไฮโดรเจลผสมมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อมีส่วนประกอบโปรตีนเพิ่มขึ้น

รูปที่ 4.5 (กราฟด้านขวา) แสดงร้อยละหมู่อะมิโนที่ลดลงของไฮโดรเจล ที่ความเข้มข้นของ EDC และเวลาในการเชื่อมขวางแตกต่างกัน จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อพิจารณากรณีไฮโดรเจลที่มีโปรตีนเป็นส่วนผสม 100 เปอร์เซ็นต์ (SF50G50) ความสำเร็จของการเชื่อมขวางด้วย EDC สามารถพิจารณาได้จากร้อยละหมู่อะมิโนที่ลดลงมากที่สุด ซึ่งเห็นได้ชัดว่าร้อยละหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงจะมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง โดยร้อยละหมู่อะมิโนที่ลดลงมากที่สุดมีค่าประมาณ 70 เมื่อใช้ EDC ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ และมีเวลาในการเชื่อมขวาง 24 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณากรณีไฮโดรเจลผสมที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 75 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) พบว่า ร้อยละหมู่อะมิโนที่ลดลงของไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง แต่สำหรับไฮโดรเจลผสม SF50HA50 ที่เวลาในการเชื่อมขวางต่าง ๆ เมื่อเชื่อมขวางด้วย EDC ความ

เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ร้อยละหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจลผสมที่ลดลงจะมีค่ามากที่สุด ซึ่งมีค่าประมาณ 36

จากผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า EDC สามารถเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมแต่ละชนิดแตกต่างกัน เนื่องจาก 2 สาเหตุหลัก ได้แก่ ไฮโดรเจลแต่ละชนิดมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (จำนวน binding sites) แตกต่างกัน กล่าวคือ ไฮโดรเจลผสมที่มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากน่าจะเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยากับ EDC แต่ในกรณีที่ไฮโดรเจลมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระน้อย (SF50HA50) EDC ส่วนเกินจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ N-acylurea ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่อยู่ในรูปเสถียร [111]

ส่วนสาเหตุที่สองเกิดจากกลไกการเชื่อมขวางไฮโดรเจลที่มีโปรตีนเป็นส่วนผสม 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วย EDC แตกต่างจากกลไกการเชื่อมขวางไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 สำหรับกลไกการเชื่อมขวางไฮโดรเจลโปรตีนสามารถอธิบายได้คือ carbodiimide ที่อยู่ในรูป protonate จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของแอสพาร์ติก (aspartic acid) หรือกรดกลูตามิก (glutamic acid) ของโมเลกุลไฟโบรอินไหมไทยหรือเจลาติน เกิดเป็น O-acylisourea intermediate ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่หนึ่ง O-acylisourea intermediate จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของไลซีน (lysine) หรือไฮดรอกซิลไลซีน (hydroxylysine amino acid) ในโมเลกุลของโปรตีนเกิดเป็นพันธะเอไมด์ ในระหว่างกระบวนการเชื่อมขวาง O-acylisourea intermediate อาจจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำกลับไปเป็นหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้น O-acylisourea intermediate จึงมีระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่สั้นและทำให้ผลได้ (yield) จากการใช้ EDC ในการเชื่อมขวางเพียงอย่างเดียวมีค่าต่ำ จึงมีการนำ NHS มาใช้ร่วมกับ EDC ดังรูปแบบที่สอง โดย NHS เข้าทำปฏิกิริยากับ O-acylisourea intermediate เกิดเป็น O-acylisourea ester ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น หลังจากนั้น O-acylisourea ester จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนเกิดเป็นพันธะเปปไทด์ ซึ่งจะได้ยูเรียเป็นผลพลอยได้

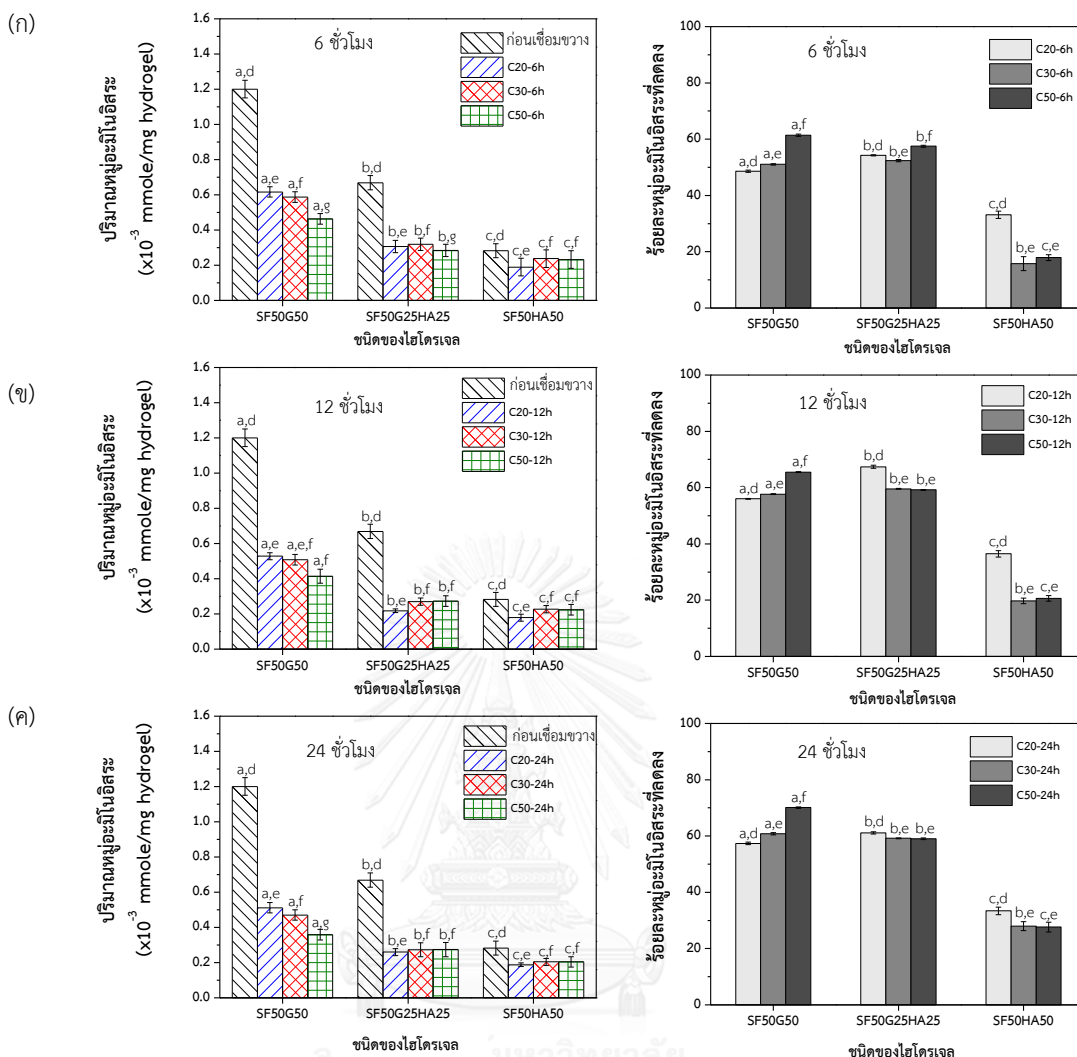
ในกรณีกลไกการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมที่มีโปรตีนและกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ ด้วย EDC อธิบายได้ดังนี้ EDC จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนหรือกรดไฮยาลูรอนิก เกิดเป็น O-acylisourea intermediate จากนั้น O-acylisourea intermediate จะเกิดปฏิกิริยาต่อได้ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบที่ 1 และ 2 ซึ่งนอกจากจะเกิดพันธะเอไมด์ ดังกล่าวไว้ในกลไกการเชื่อมขวางข้างต้น ยังพบว่า O-acylisourea intermediate จะสามารถเชื่อมขวางกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็นพันธะเอสเทอร์ สำหรับรูปแบบที่ 3 O-acylisourea intermediate เกิด

ปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็น acid anhydride จากนั้น acid anhydride จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของโปรตีนหรือหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็นพันธะเอไมด์หรือพันธะเอสเทอร์ ตามลำดับ

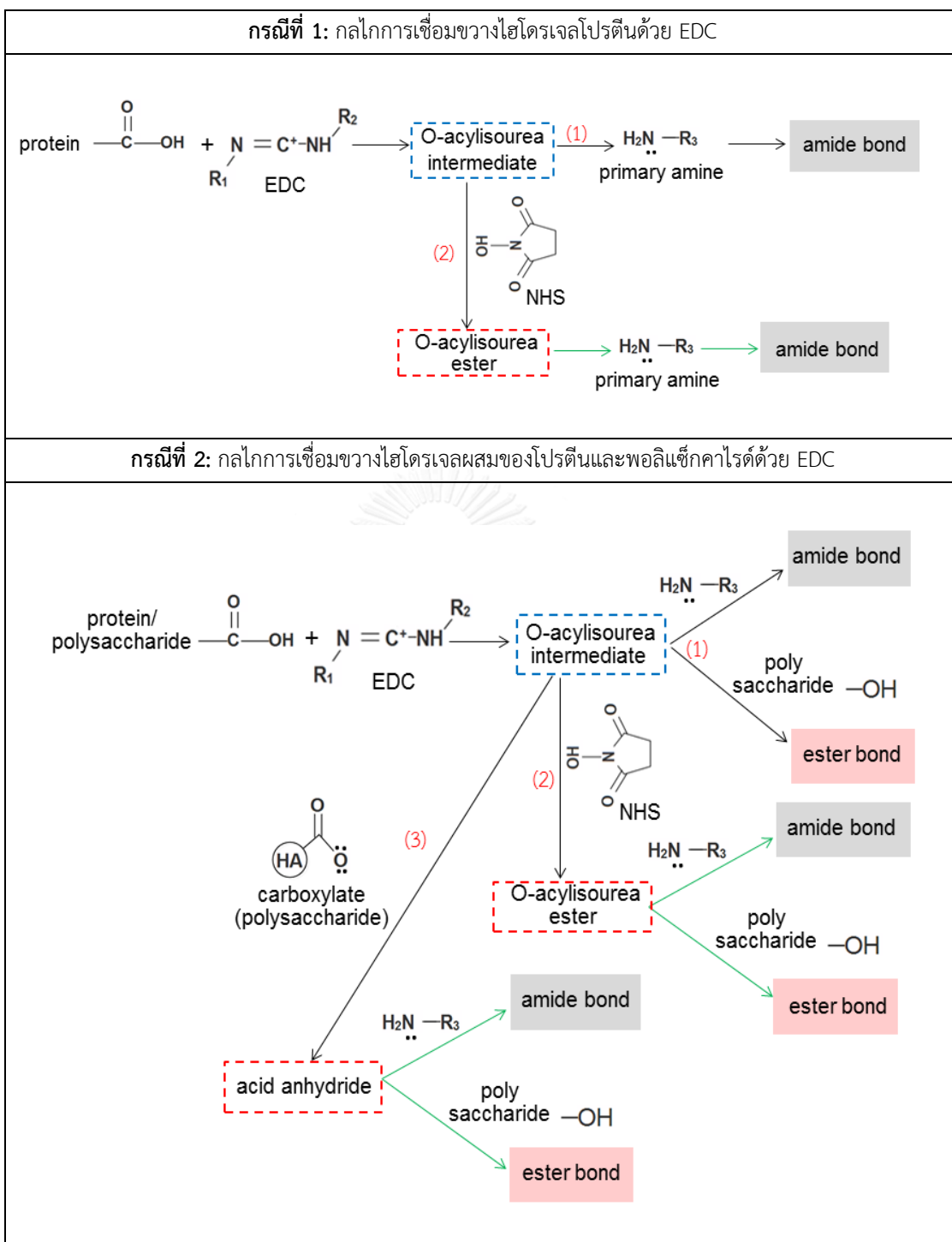
ดังนั้นในการเชื่อมขวางไฮโดรเจลที่มีโปรตีนเป็นส่วนผสม 100 เปอร์เซ็นต์ จึงต้องใช้ความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางมากเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในกรณีที่มีปริมาณเจลาตินลดลง (SF50G25HA25) หรือไม่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบ (SF50HA50) สังเกตเห็นว่า การเชื่อมขวางด้วยหมู่อะมิโนจะเกิดขึ้นได้มาก กรณีใช้ความเข้มข้นของ EDC ต่ำ (20 มิลลิโมลาร์) และไม่ต้องใช้เวลาในการเชื่อมขวางมาก (6 ชั่วโมง)

ในปี 1999 Choi, Y. S และคณะ [112] ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิก (GHA) ที่อัตราส่วนการผสมต่าง ๆ (เช่น GHA91, GHA73, และ GHA55) และเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC ในตัวทำละลายอะซิโตนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้ในการเชื่อมขวางเท่ากับ 0.005-0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการวิเคราะห์หาค่าร้อยละการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค TNBS พบว่า GHA91 ที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการเชื่อมขวางสูงที่สุดเท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสัดส่วนของเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ในปี 2009 Wang, T.- W. และคณะ [113] ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิก โดยใช้ชนิดของคอลลาเจนแตกต่างกัน (คอลลาเจนชนิดที่ I และ II) และสัดส่วนของคอลลาเจนต่อกรดไฮยาลูรอนิก คือ 2:1, 1:1, และ 1:2 จากนั้นทำการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย EDC/NHS อัตราส่วน 5:2 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ผลการวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค TNBS พบว่า ร้อยละการเชื่อมขวางลดลงจาก 90 เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น เนื่องจากหมู่อะมิโนส่วนใหญ่พบได้ในคอลลาเจน เมื่อปริมาณคอลลาเจนลดลงจึงส่งผลให้ร้อยละการเชื่อมขวางลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น



รูปที่ 4.5 ปริมาณหมู่เอมีโนอิสระคงเหลือในไฮโดรเจลผสม SFGHA ชนิดต่าง ๆ (กราฟด้านซ้าย) ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ในตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 80:20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเชื่อมขวางเป็นเวลา (ก) 6, (ข) 12, และ (ค) 24 ชั่วโมง (a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลปริมาณหมู่เอมีโนอิสระ โดยเปรียบเทียบชนิดของไฮโดรเจลที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้เชื่อมขวางเท่ากัน และ d, e, f, g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่แตกต่างกัน ที่ชนิดของไฮโดรเจลและเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางเหมือนกัน) ส่วนกราฟด้านขวา แสดงร้อยละหมู่เอมีโนอิสระที่ลดลงภายหลังการเชื่อมขวาง (a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละหมู่เอมีโนอิสระที่ลดลง โดยเปรียบเทียบชนิดของไฮโดรเจลที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้นของ EDC และเวลาที่ใช้เชื่อมขวางเท่ากัน และ d, e, f, แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่แตกต่างกัน ที่ชนิดของไฮโดรเจลและเวลาที่ใช้เชื่อมขวางเหมือนกัน)



รูปที่ 4.6 กลไกการเชื่อมขวางระหว่างโปรตีนกับโปรตีน และโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์
ด้วยสารเชื่อมขวาง EDC [111]

4.2.3. ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) คงเหลือในไฮโดรเจลภายหลังจากการเชื่อมขวาง

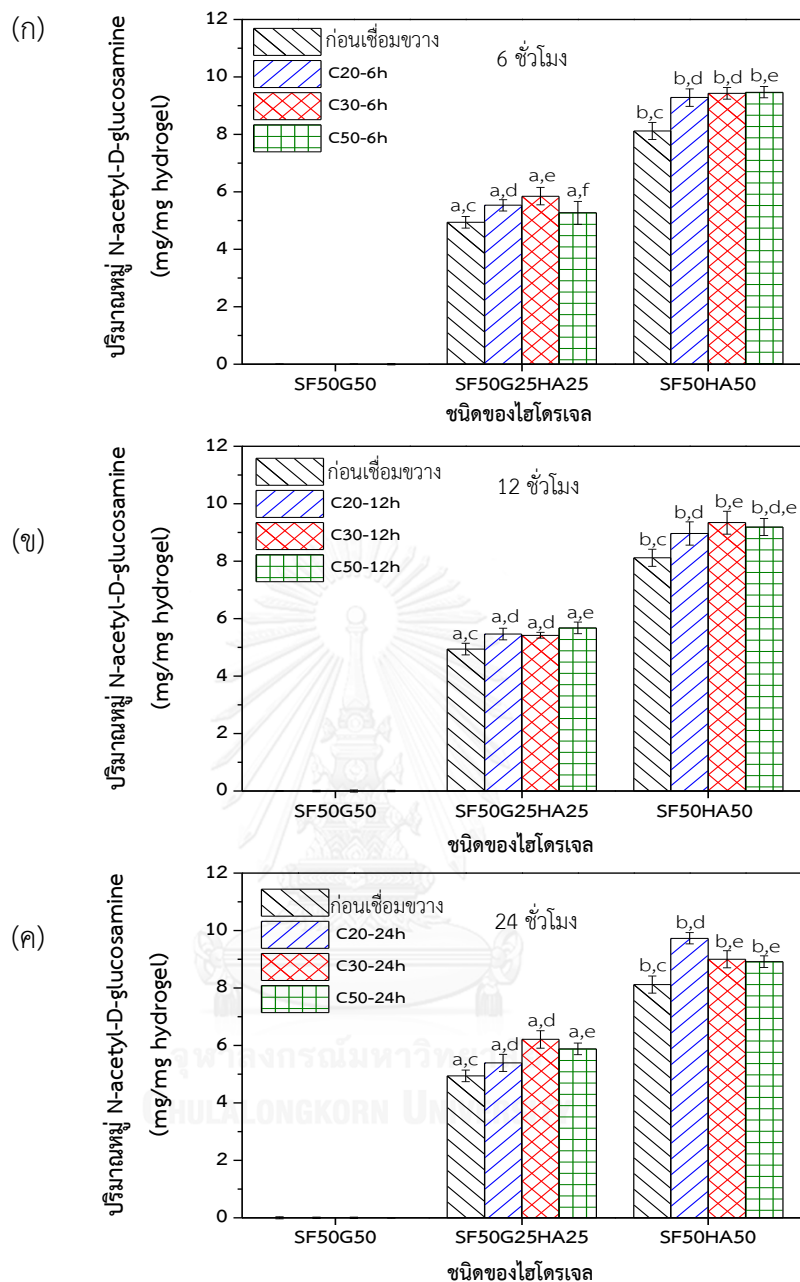
ในงานวิจัยนี้มีการใช้กรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบในการเตรียมไฮโดรเจลผสม จึงได้ทำการศึกษาปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine คงเหลือในไฮโดรเจลภายหลังจากกระบวนการเชื่อมขวาง ซึ่งหมู่ N-acetyl-D-glucosamine เป็นส่วนประกอบในหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูรอนิก ดังนั้นจึงทำให้ทราบว่ากรดไฮยาลูรอนิกถูกเชื่อมขวางด้วย EDC มากน้อยเพียงใด โดยวิเคราะห์หาปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay ผลการศึกษาปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine แสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่า การเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบด้วย EDC สามารถเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการเตรียมได้เกือบทั้งหมด เนื่องจากปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine คงเหลือภายหลังจากการเชื่อมขวางมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ก่อนการเชื่อมขวาง

เมื่อพิจารณาผลของชนิดของไฮโดรเจลผสมที่มีต่อปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine คงเหลือในไฮโดรเจล พบว่า ไฮโดรเจลผสม SF50HA50 มีปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine สูงที่สุด รองลงมาคือ SF50G25HA25 โดยปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine มีค่ามาก เมื่อสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น แต่ในกรณีไฮโดรเจล SF50G50 ซึ่งไม่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบจะไม่พบหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ทั้งก่อนและหลังการเชื่อมขวาง

สำหรับการเลือกไฮโดรเจลผสมภายหลังจากการเชื่อมขวางเพื่อนำไปศึกษาสมบัติทางกายภาพทางเคมี และทางชีวภาพ โดยพิจารณาข้อมูลจากรูปที่ 4.4 ซึ่งแสดงผลร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลผสมภายหลังจากการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6, 12, และ 24 ชั่วโมง สังเกตเห็นว่า ไฮโดรเจลผสมทุกชนิดที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปประมาณ 4-5 ซึ่งมีค่าค่อนข้างต่ำ (ผลการศึกษาในหัวข้อ 4.2.1) โดยร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลที่หายไป คาดว่าน่าจะเป็นโมเลกุลของเจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ละลายในขั้นตอนการล้างน้ำปราศจากไอออนซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายในกระบวนการเชื่อมขวาง ประกอบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและร้อยละหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงภายหลังจากการเชื่อมขวาง (รูปที่ 4.5) ซึ่งจะเห็นว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจลภายหลังจากการเชื่อมขวางด้วย EDC มีค่าลดลง แสดงว่า หมู่อะมิโนถูกใช้

ไปในกระบวนการเชื่อมขวาง จึงทำให้ร้อยละหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงมีค่ามาก และผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ที่คงเหลือในไฮโดรเจลผสม (รูปที่ 4.6) สารเชื่อมขวาง EDC สามารถเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกได้ใกล้เคียงกันในทุกสภาวะ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไปใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป





รูปที่ 4.7 ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine คงเหลือในไฮโดรเจลผสม SFGHA ภายหลังจากการเชื่อมขวางด้วย EDC โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่ 20, 30, และ 50 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาในการเชื่อมขวางเท่ากัน คือ (ก) 6, (ข) 12, และ (ค) 24 ชั่วโมง (a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบชนิดของไฮโดรเจลที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้นของ EDC และเวลาในการเชื่อมขวางเท่ากัน และ c, d, e, f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EDC ที่แตกต่างกัน ที่ชนิดของไฮโดรเจลและเวลาในการเชื่อมขวางเหมือนกัน)

4.3 คุณลักษณะและสมบัติของไฮโดรเจลผสม SFGHA

ผลการศึกษาสมบัติของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยการแช่ในสารละลาย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างเหมาะสม แสดงได้ดังนี้

4.3.1 สมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลผสม SFGHA

4.3.1.1 โครงสร้างพื้นฐานภายในของไฮโดรเจลผสม SFGHA ก่อนและหลังผ่านการเชื่อมขวาง

ลักษณะภายนอกของไฮโดรเจลที่ได้จากการเชื่อมขวางด้วย EDC แสดงในรูปที่ 4.8 ไฮโดรเจลที่ได้มีสีขาวอมเหลืองและเมื่อสัมผัสด้วยมือพบว่า ไฮโดรเจลผสม SF50G50 จะมีลักษณะที่แข็งกว่าไฮโดรเจลผสม SF50G50HA25 และ SF50HA50



รูปที่ 4.8 ลักษณะภายนอกของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

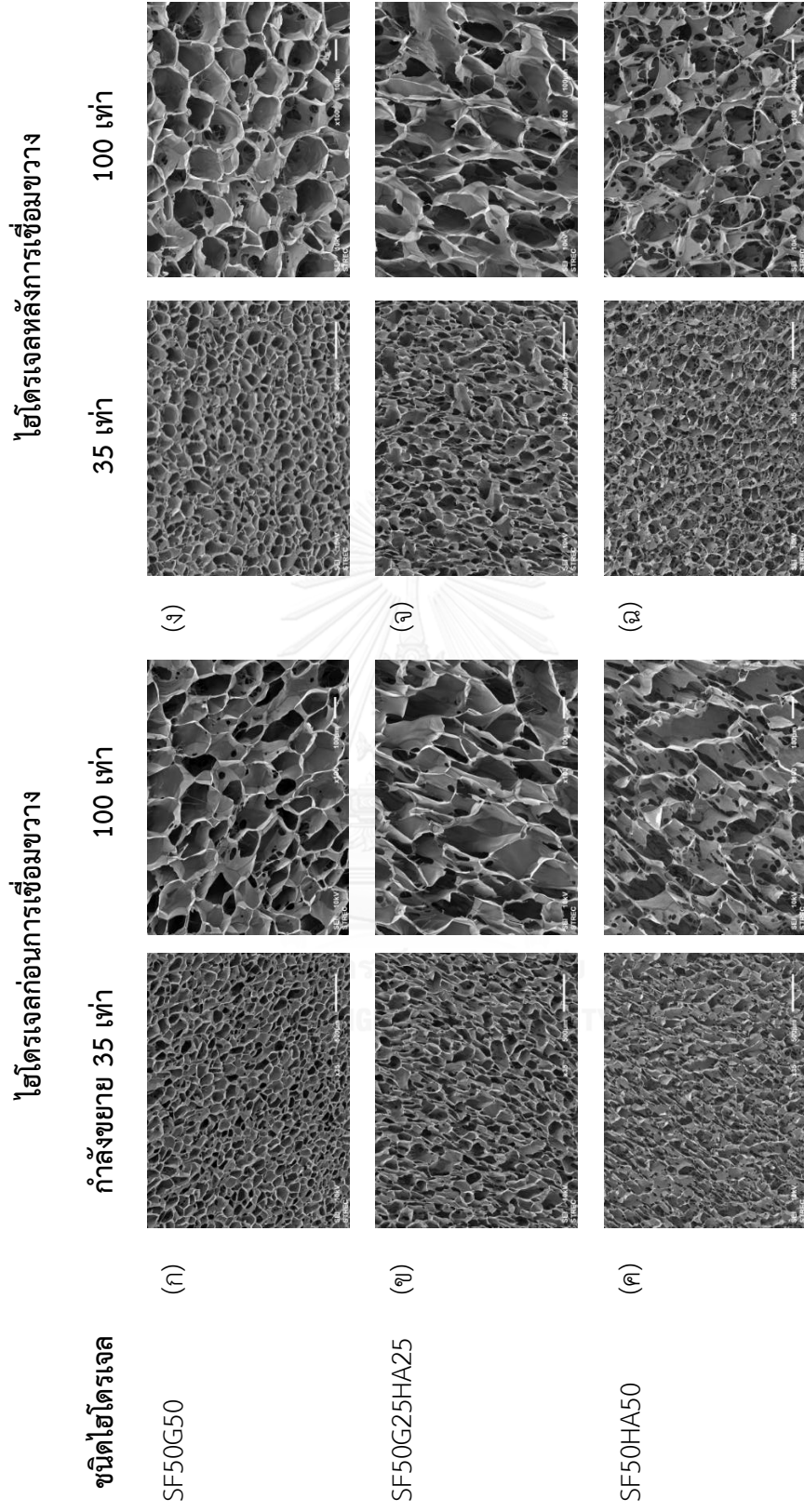
โครงสร้างพื้นฐานภายในของไฮโดรเจลผสม SFGHA แต่ละชนิดก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวาง EDC ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) แสดงในรูปที่ 4.9 ผลการศึกษาพบว่า เมื่อพิจารณาไฮโดรเจลก่อนเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสม SF50G50 มีรูพรุนที่สม่ำเสมอและเชื่อมโยงกันเป็นเครือข่าย โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ย (สรุปในตารางที่ 4.2) มีค่าประมาณ 166 ± 15 ไมโครเมตร ส่วนกรณีไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) ลักษณะรูพรุนจะมีรูปร่างรียาว รูพรุนไม่สม่ำเสมอ มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 222 ± 21 และ 227 ± 19 ไมโครเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มกรดไฮยาลูรอนิกในไฮโดรเจล ทำให้ขนาดรูพรุนเพิ่มขึ้น เนื่องจากในกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

โมเลกุลของน้ำมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดรูพรุนในไฮโดรเจล กรดไฮยาลูรอนิคมีหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำสูง หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้อาจจะรวมตัวกับโมเลกุลของน้ำทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ในขั้นตอนการแช่แข็ง

เมื่อพิจารณาไฮโดรเจลภายหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC พบว่า ไฮโดรเจลผสมทุกชนิด มีลักษณะโครงสร้างสัณฐานและขนาดรูพรุนเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเทียบกับไฮโดรเจลผสมก่อนการเชื่อมขวาง เนื่องจาก EDC สามารถเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมได้สำเร็จ จึงสามารถรักษารูปร่างของไฮโดรเจลไว้ได้

จากรายงานเมื่อปี 1999 ของ Choi, Y. S, และคณะ [112] ได้ศึกษาการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิคชนิดต่าง ๆ (GHA91, GHA73, และ GHA55) ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวาง EDC พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ GHA91 มีรูพรุนขนาดเฉลี่ย ประมาณ 48 ไมโครเมตร และความพรุน 35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูรอนิค ทำให้ความพรุนและขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ GHA55 มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และ 67 ไมโครเมตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ในปี 2009 Ren, Y.-J, และคณะ [114] ได้ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิคที่อัตราส่วนของกรดไฮยาลูรอนิคแตกต่างกัน (3, 6, และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่า ขนาดรูพรุนมีค่าเท่ากับ 123 ± 15 , 133 ± 17 , และ 253 ± 34 ไมโครเมตร เมื่อความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิคเพิ่มขึ้นจาก 3, 6, และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในขณะที่ปี 2009 Wang, T.-W และคณะ [113] ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์กรดไฮยาลูรอนิคร่วมกับคอลลาเจนชนิดที่ I และ II ที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกันด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่า ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิคที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น



รูปที่ 4.9 ลักษณะโครงสร้างดั้งเดิมของไฮโดรเจลผสม SFGHA ชนิดต่าง ๆ ก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดขนาดกำลังขยาย 35 และ 100 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 500 และ 100 ไมโครเมตร) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของไฮโดรเจลผสม SFGHA ก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ชนิดไฮโดรเจล	ขนาดรูพรุนเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	
	ก่อนการเชื่อมขวาง	หลังการเชื่อมขวาง
SF50G50	166.69 ± 15.05 ^{a,b}	170.46 ± 8.92 ^{a,b}
SF50G25HA25	222.52 ± 21.11 ^{a,c}	225.01 ± 17.11 ^{a,c}
SF50HA50	226.97 ± 18.90 ^{a,c}	224.97 ± 20.37 ^{a,c}

(a แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลขนาดรูพรุนเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบก่อนและหลังการเชื่อมขวางที่ไฮโดรเจลผสมชนิดเดียวกัน)

(b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลขนาดรูพรุนเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบก่อนหรือหลังการเชื่อมขวางที่ชนิดของไฮโดรเจลผสมแตกต่างกัน)

4.3.1.2 โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสม SFGHA ก่อนและหลังการเชื่อมขวาง

ผลการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสมก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy โดยใช้เทคนิค Attenuated total reflectance mode (ATR-FTIR) แสดงดังรูปที่ 4.10 พบว่า เมื่อพิจารณาไฮโดรเจลผสมก่อนการเชื่อมขวาง สเปกตรัมค่าการส่องผ่านแสงของไฮโดรเจลผสม SF50G50 จะเกิดพีคชัดเจนอยู่ 3 ตำแหน่ง กล่าวคือ ตำแหน่งพีคที่เลขคลื่น 1643 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะเอไมด์ I (amide I) ที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O (C=O stretching) เลขคลื่น 1533 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะเอไมด์ II (amide II) ที่เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ N-H (N-H bending) และที่เลขคลื่น 1237 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงพันธะเอไมด์ III (amide III) ที่เกิดจากการสั่นของพันธะ C-N (C-N stretching) ซึ่งเป็นลักษณะโครงสร้างแบบ Random coil/ α -helix [115] ส่วนไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) พบหมู่เอไมด์ I, II, และ III ที่เลขคลื่น ดังกล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ยังพบพีคที่เลขคลื่น 1407 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงการสั่นแบบยืดแบบสมมาตรของหมู่ carboxylate salt (symmetric stretching of carboxylate salt)

เลขคลื่น 1150 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงการสั่นแบบยืดแบบสมมาตรของพันธะ C-O-C (symmetric stretching C-O-C; O-bridge) เลขคลื่น 1080 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงการสั่นของพันธะเอสเทอร์ เลขคลื่น 1042 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงการสั่นแบบยืดของพันธะ C-O (C-O stretching) และพีคที่เลขคลื่น 945 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงการสั่นของโครงสร้างแบบวงแบบไม่สมมาตร (asymmetrical out of phase ring vibration) [116] ซึ่งพีคที่เลขคลื่นเหล่านี้เป็นหมู่ฟังก์ชันที่บ่งชี้คุณลักษณะเฉพาะของกรดไฮยาลูรอนิก เมื่อปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกในไฮโดรเจลผสมเพิ่มขึ้น จะเห็นพีคที่เลขคลื่นเหล่านี้ชัดเจนขึ้น

เมื่อพิจารณาไฮโดรเจลผสมทุกชนิดที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้นของ EDC 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะปรากฏไพล์พีคที่เลขคลื่น 1700 ต่อเซนติเมตร แสดงถึงการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O (C=O stretching) ซึ่งจะพบได้ 2 กรณี คือ กรณีแรก เป็นผลจากการเชื่อมขวางด้วย EDC กล่าวคือ EDC เกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนหรือกรดไฮยาลูรอนิก เกิดเป็น O-acylisourea intermediate จากนั้น O-acylisourea intermediate จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็นพันธะเอสเทอร์ โดยหมู่คาร์บอนิลของพันธะเอสเทอร์จะแสดงการสั่นของพันธะที่ตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปี 1996 ของ Tomihata, K. และคณะ [117] ที่ได้เชื่อมขวางฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิก โดยแช่ในตัวทำละลายเอทานอลที่สัดส่วนต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของ EDC 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อปี 2009 Xu, S. และคณะ [11] ได้รายงานพีคที่ตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งพบในกรดไฮยาลูรอนิกที่เชื่อมขวางด้วยการแช่ในสารละลาย EDC ที่ไม่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย กรณีที่สอง เกิดจากตัวทำละลายเอทานอลชักนำให้โครงสร้าง random coil ของไฟโบรอินเปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบ β -sheet ซึ่งไพล์พีคดังกล่าว แสดงถึงโครงสร้างแบบ β -sheet ที่จัดเรียงตัวแบบสวนทางกัน (antiparallel arrangement) ของสายโซ่ไฟโบรอิน [118, 119] อย่างไรก็ตามในปี 2007 Chamchongkaset, J. และคณะ [115] ได้รายงานว่า โครงสร้างเซลล์ผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยการแช่ในสารละลาย EDC ที่ไม่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย ไม่ปรากฏพีคดังกล่าว โดยพบพีคที่แสดงถึงโครงสร้าง random coil ของไฟโบรอิน โดยการเชื่อมขวางด้วย EDC จะทำให้พันธะเอไมด์มีความเสถียรมากขึ้น

ดังนั้น จากผลการศึกษาที่กล่าวข้างต้น สรุปได้ว่า ไพล์พีคจะปรากฏขึ้นเมื่อมีเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมด้วย EDC และมีเอทานอลเป็นองค์ประกอบในตัวทำละลาย

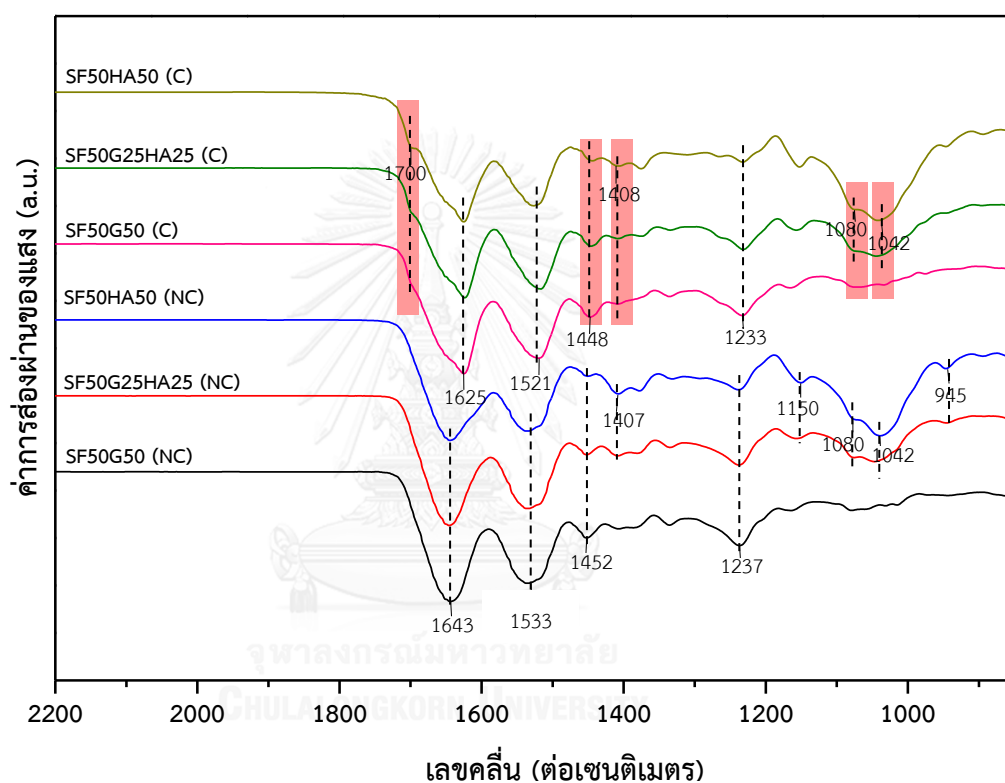
นอกจากนี้ในรูปที่ 4.10 ยังพบตำแหน่งเลขคลื่นที่แสดงหมู่เอไมด์ I และ II ของไฮโดรเจลผสมทุกชนิดภายหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย มีการเลื่อนไปที่ 1625 และ 1521 ต่อเซนติเมตร การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจจะเกิดได้ 2 สาเหตุ คือ สาเหตุที่หนึ่ง เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินด้วยตัวทำละลายเอทานอล เห็นได้จากรายงานเมื่อปี 2012 ของ Liu, R. และคณะ [120] พบว่า เส้นใยไฟโบรอินจากไหมสายพันธุ์ Tussah ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS ในตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ พบโครงสร้างแบบ β -sheet ของเส้นใยไฟโบรอิน (ประมาณ 45.34 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมากกว่าเส้นใยที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง (25.26 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่า การเชื่อมขวางที่มีตัวทำละลายเอทานอลทำให้โครงสร้าง random coil เปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบ β -sheet มากขึ้น ส่วนสาเหตุที่สอง คือ การใช้ EDC ในการเชื่อมขวางทำให้เกิดพันธะเอไมด์ การสั่นของพันธะดังกล่าวแสดงที่เลขคลื่นดังกล่าวเช่นเดียวกัน และยังพบพีคที่เลขคลื่น 1448 ซึ่งแสดงการสั่นของพันธะเอไมด์ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้พีคที่แสดงถึงหมู่เอไมด์ III เป็นการสั่นของพันธะ C-N (C-N stretching) ในไฮโดรเจลผสมก่อนและหลังการเชื่อมขวางจะพบที่ตำแหน่งเดิม

เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย EDC พบว่า ภายหลังการเชื่อมขวาง ค่าการส่องผ่านของพีคที่เลขคลื่น 1408 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงถึงการสั่นแบบยืดแบบสมมาตรของหมู่ carboxylate salt (symmetric stretching of carboxylate salt) ลดน้อยลง เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลถูกใช้ในการเชื่อมขวางด้วย EDC แต่ในกรณีพีคที่เลขคลื่น 1042, 1080 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงการสั่นของพันธะเอสเทอร์ของไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC

ผลของปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย EDC สอดคล้องกับรายงานในปี 2011 ของ Zhang, F. และคณะ [6] พบตำแหน่งพีคที่เลขคลื่น 1625, 1545, และ 1455 ต่อเซนติเมตร ซึ่งเป็นพีคที่แสดงถึงพันธะเอไมด์ของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิกที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่า EDC สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลในเจลาตินหรือกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็น acid anhydride intermediate ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกับหมู่เอมีนของโปรตีนเกิดเป็นพันธะเอไมด์ หรือเกิดปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็นพันธะเอสเทอร์

ในปี 2002 Park, S.- N. และคณะ [80] พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิก จะปรากฏพันธะเอไมด์ (เลข

คลื่น 1655, 1546, และ 1458 ต่อเซนติเมตร) และพันธะเอสเทอร์ (เลขคลื่น 1100 ต่อเซนติเมตร) ได้ชัดเจนขึ้น และพีคที่เลขคลื่น 1406 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงถึงการสั่นแบบยืดแบบสมมาตรของ carboxylate salt (symmetric stretching band of carboxylate salts) มีค่าการดูดกลืนแสงน้อยลง ซึ่งแสดงว่า EDC สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของคอลลาเจนหรือกรดไฮยาลูรอนิก และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกับหมู่เอมีโนของคอลลาเจนหรือหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิก เกิดเป็นพันธะเอไมด์และพันธะเอสเทอร์



รูปที่ 4.10 สเปกตรัมค่าการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของไฮโดรเจลผสม SFGHA ทั้งสามชนิด ก่อน (NC) และหลัง (C) การเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ต่อน้ำที่อัตราส่วน 80:20 เปรอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy โดยเทคนิค Attenuated total reflectance mode (FTIR-ATR)

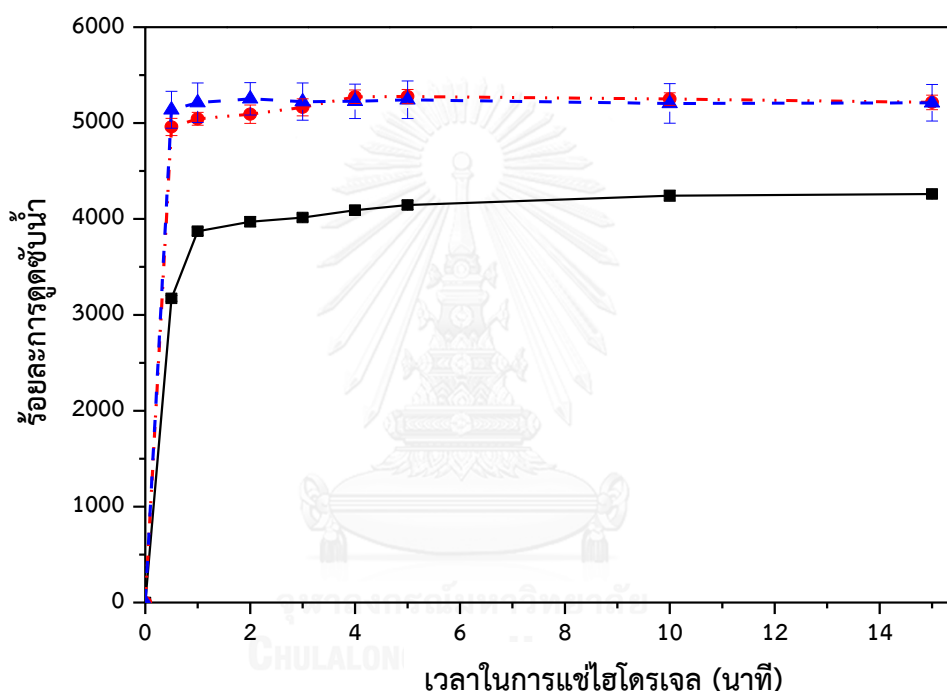
4.3.1.3 ความสามารถในการดูดซับน้ำ (water absorption) ของไฮโดรเจลผสม SFGHA ภายหลังการเชื่อมขวาง

การศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลที่เตรียมได้เป็นสมบัติอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับชีววัสดุ ซึ่งทดสอบโดยการแช่ไฮโดรเจลผสมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline, PBS) ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสมที่ผลิตได้จากร้อยละการดูดซับน้ำ ผลการศึกษาแสดงได้ดังรูปที่ 4.11 ซึ่งพบว่า เมื่อเวลาในการแช่ไฮโดรเจลผสมเพิ่มขึ้น ร้อยละการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้น

ในกรณีไฮโดรเจลผสม SF50G50 มีร้อยละการดูดซับน้ำสูงถึง 4000 หรือประมาณ 40 เท่า ภายใน 1 นาทีแรกของการแช่ จากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและจะเริ่มคงที่ภายในเวลาการแช่ 5 นาที ส่วนไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) พบว่า ไฮโดรเจลผสมทั้งสองชนิด มีร้อยละการดูดซับน้ำสูงสุดภายในเวลาการแช่ 30 วินาที โดยมีค่าประมาณ 5200 (ประมาณ 52 เท่า) หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและจะคงที่ภายในเวลาการแช่ 2 นาที ซึ่งสังเกตเห็นว่า ไฮโดรเจลผสมที่เตรียมจากกรดไฮยาลูรอนิก มีร้อยละการดูดซับน้ำมากกว่าไฮโดรเจลผสมที่ไม่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากธรรมชาติของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถละลายน้ำได้ดี มีสมบัติความชอบน้ำสูง เมื่อเพิ่มกรดไฮยาลูรอนิกในไฮโดรเจล จึงส่งผลให้ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสมเพิ่มขึ้น

ในปี 2009 Wang, T.- W. และคณะ [113] รายงานว่า เมื่อเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูรอนิก ความสามารถในการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างคอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ผสมทุกสัดส่วน (Coll:HA 2:1, 1:1, และ 1:2) สามารถดูดซับน้ำภายในระยะเวลา 30 วินาที และคงที่ภายในระยะเวลาการแช่ 5 นาที ซึ่งโครงเลี้ยงที่สัดส่วนของคอลลาเจนต่อกรดไฮยาลูรอนิก 2:1 มีสัดส่วนการดูดซับน้ำสูงสุดประมาณ 38 เท่า และในปี 2011 Zhang, F. และคณะ [6] ได้ทำการศึกษาร้อยละการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิก พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่งผลทำให้ร้อยละการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งร้อยละการดูดซับน้ำจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาการแช่ 10 นาทีแรก หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยร้อยละการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี

กรดไฮยาลูรอนิคล้วนจะมีค่าสูงสุดถึง 1800 หรือประมาณ 18 เท่า และร้อยละการดูดซับน้ำจะลดลงตามสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิคที่เป็นองค์ประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง รวมทั้งในปี 1999 Choi, Y. S. และคณะ [112] รายงานว่า ร้อยละการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิคเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิค โดยมีร้อยละการดูดซับน้ำสูงสุดประมาณ 40 เท่า เมื่อมีกรดไฮยาลูรอนิคในโครงเลี้ยงเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่กล่าวข้างต้น



รูปที่ 4.11 ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยการแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (—■—) SF50G50, (-●-) SF50G25HA25, และ (-▲-) SF50HA50

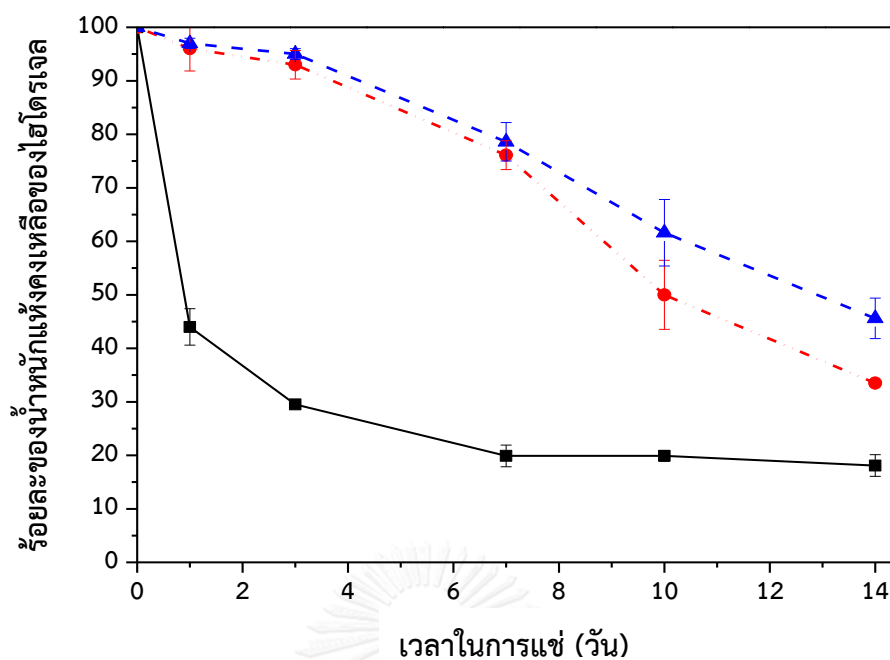
4.3.2 สมบัติทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม SFGHA

4.3.2.1 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม SFGHA ในระดับห้องปฏิบัติการ

1) การย่อยสลายไฮโดรเจลผสม SFGHA ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV (Protease XIV) ในระดับห้องปฏิบัติการ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสม โดยเน้นการย่อยสลายของโมเลกุลไฟโบรอินไหมไทย ซึ่งย่อยสลายได้ยาก เมื่อเทียบกับโมเลกุลของเจลาตินและกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ละลายน้ำได้ง่าย จึงสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว จากรายงานการเปรียบเทียบการย่อยสลายทางชีวภาพของไฟโบรอินโดยใช้เอนไซม์ต่างชนิดกัน ในปี 2011 ของ Zhao., C. และคณะ [121] ซึ่งได้ศึกษาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์และเส้นใยของไหมไฟโบรอินชนิด *Antheraea pernyi* (Ap-SF) ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์ α -chymotrysin, คอลลาจีเนส IA, โปรติเอส XIV ที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟสที่ไม่มีเอนไซม์ พบว่า ภายในระยะเวลา 1 วัน น้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์ทุกชนิดลดลงอย่างรวดเร็ว และที่ระยะเวลาในการแช่ 18 วัน น้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์ α -chymotrysin, คอลลาจีเนส IA, และสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟสที่ไม่มีเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ 20.5, 8.0, และ 77.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ละลายอย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 18 วัน นอกจากนี้ในปี 2013 Wongnarat, C. และคณะ [122] รายงานว่า เส้นใยไฟโบรอินของไหมไทยสายพันธุ์สำโรง และสายพันธุ์นางลาย ที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV และเอนไซม์โปรติเอส XXIII ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 49 วัน มีร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฟโบรอินสายพันธุ์สำโรงที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV และเอนไซม์โปรติเอส XXIII เท่ากับ 27.5 และ 17.5 ตามลำดับ ส่วนร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฟโบรอินสายพันธุ์นางลายที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV และเอนไซม์โปรติเอส XXIII มีค่าเท่ากับ 25 และ 13 ตามลำดับ สังเกตเห็นว่า เส้นใยไฟโบรอินของไหมทั้งสองสายพันธุ์ที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV มีร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปมากกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XXIII แสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV มีความจำเพาะเจาะจงกับไฟโบรอิน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอนไซม์โปรติเอส XIV ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของไฮโดรเจลที่ผลิตได้

ความสามารถในการย่อยสลายของไฮโดรเจลผสมที่ผลิตได้จะพิจารณาจาก ผลของร้อยละ น้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลภายหลังการแช่ไฮโดรเจลในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังแสดง ในรูปที่ 4.12 ซึ่งพบว่า เมื่อผ่านไป 1 วัน ไฮโดรเจลผสมที่มีโปรตีนเป็นส่วนผสม 100 เปอร์เซ็นต์ (SF50G50) มีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ประมาณ 44) แต่ในกรณีไฮโดรเจลผสมอีกสองชนิด (SF50G25HA25 และ SF50HA50) จะถูกย่อยสลายได้ช้าและมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือประมาณ 50 เมื่อเวลาผ่านไป 10 และ 13 วัน ตามลำดับ เนื่องจากว่า เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไม่จำเพาะเจาะจงต่อโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรเจล จึงต้องใช้เวลาในการย่อยสลายไฮโดรเจลนานขึ้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน ไฮโดรเจลผสม SF50HA50 มีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือมากที่สุด ซึ่งมีค่าประมาณ 46 รองลงมาคือ ไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 และ SF50G50 โดยมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือประมาณ 34 และ 18 ตามลำดับ ซึ่งสรุปได้ว่า การย่อยสลายของไฮโดรเจลที่ผลิตได้ภายใต้สภาวะสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV จะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของโปรตีนที่ผสมอยู่ในไฮโดรเจล



รูปที่ 4.12 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังจากแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (—■—) SF50G50, (-●-) SF50G25HA25, และ (-▲-) SF50HA50

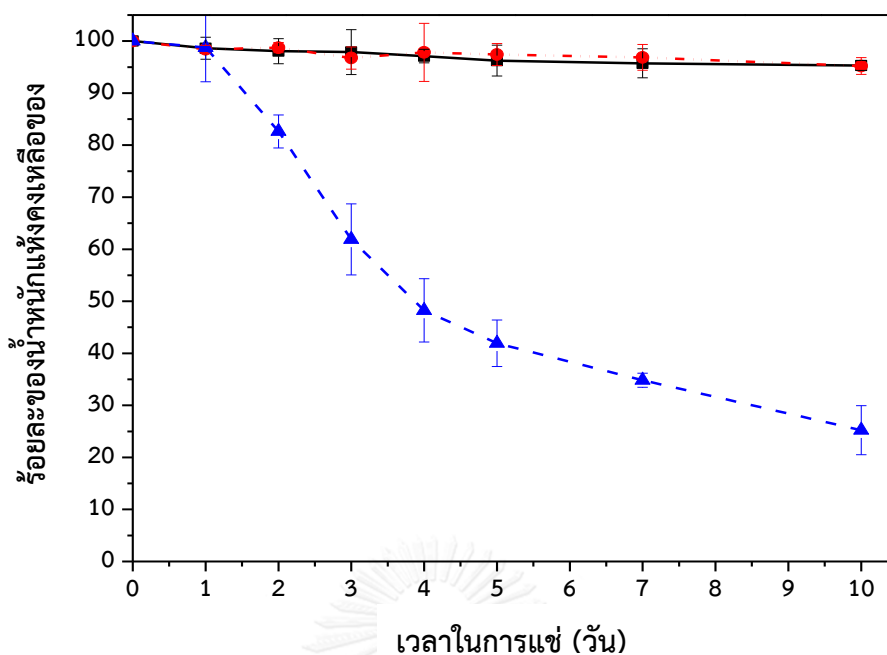
2) การย่อยสลายไฮโดรเจลผสม SFGHA ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ ในระดับห้องปฏิบัติการ

ความสามารถในการย่อยสลายของไฮโดรเจลผสมที่ผลิตได้ โดยการแช่ไฮโดรเจลผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จะพิจารณาได้จากร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลที่ระยะเวลาในการแช่ต่าง ๆ ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่า เมื่อแช่ไฮโดรเจล SF50HA50 เป็นเวลา 4 วัน ไฮโดรเจลผสมมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือประมาณ 50 แต่ไฮโดรเจลผสม SF50G50 และ SF50G25HA25 มีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือเท่ากับ 97.11 และ 97.83 ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 10 วัน พบว่า ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลผสม SF50G50 และ SF50G25HA25 มีแนวโน้มลดลงน้อยมาก (ประมาณ 95.31 และ 95.21 ตามลำดับ)

ส่วนไฮโดรเจลผสม SF50HA50 ไม่สามารถคงรูปได้และมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยมีค่าประมาณ 25.22 ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจาก พันธะเอสเทอร์ที่เกิดจากการเชื่อมขวางของ EDC กับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดยาลูรอนิคมีความเสถียรน้อยกว่าพันธะเอไมด์ที่เกิดการเชื่อมขวางในโมเลกุลของโปรตีน จึงทำให้พันธะเอสเทอร์จึงถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำได้ง่าย

จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของไฮโดรเจลที่ผลิตได้ในสภาวะที่มีเอนไซม์ (รูปที่ 4.12) และไม่มีเอนไซม์ (รูปที่ 4.13) สรุปได้ว่า การย่อยสลายของไฮโดรเจลแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อไฮโดรเจลอยู่ในสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV เอนไซม์จะย่อยโมเลกุลของโปรตีนได้ดี โดยตรงที่ตำแหน่งพันธะไฮโดรเจนของฮิสติดีน (Histidine, His) เบนิลอะลานีน (Phenylalanine, Phe) ทริปโตเฟน (Tryptophane, Trp) ไทโรซีน (Tyrosine, Tyr) ไลซีน (Lysine, Lys) และ อาร์จินีน (Arginine, Arg) [123] แต่ในกรณีไฮโดรเจลอยู่ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ (สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์) โปรตีนไม่ถูกย่อยสลาย จึงเกิดการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ

ดังนั้น จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ทำให้สามารถนำข้อมูลความคงรูปของตัวอย่างไฮโดรเจลผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ไปใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ NIH/3T3 (แสดงผลในหัวข้อถัดไป) กล่าวคือ ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบความเข้ากันได้เป็นระยะเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.13 ร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลผสม SFGHA ที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังจากแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 0.1% Penicillin-streptomycin) ที่สภาวะการเพาะเลี้ยง (ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์) (—■—) SF50G50, (---●---) SF50G25HA25, และ (---▲---) SF50HA50

4.3.2.2 การทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast cell line, NIH/3T3) บนไฮโดรเจลผสม SFGHA

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม ด้วยเทคนิค static culture ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน โดยตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบนไฮโดรเจลผสมด้วย DNA assay และประเมินโครงสร้างพื้นฐานการแผ่ของเซลล์แสดงได้ดังนี้

1) การยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลผสม

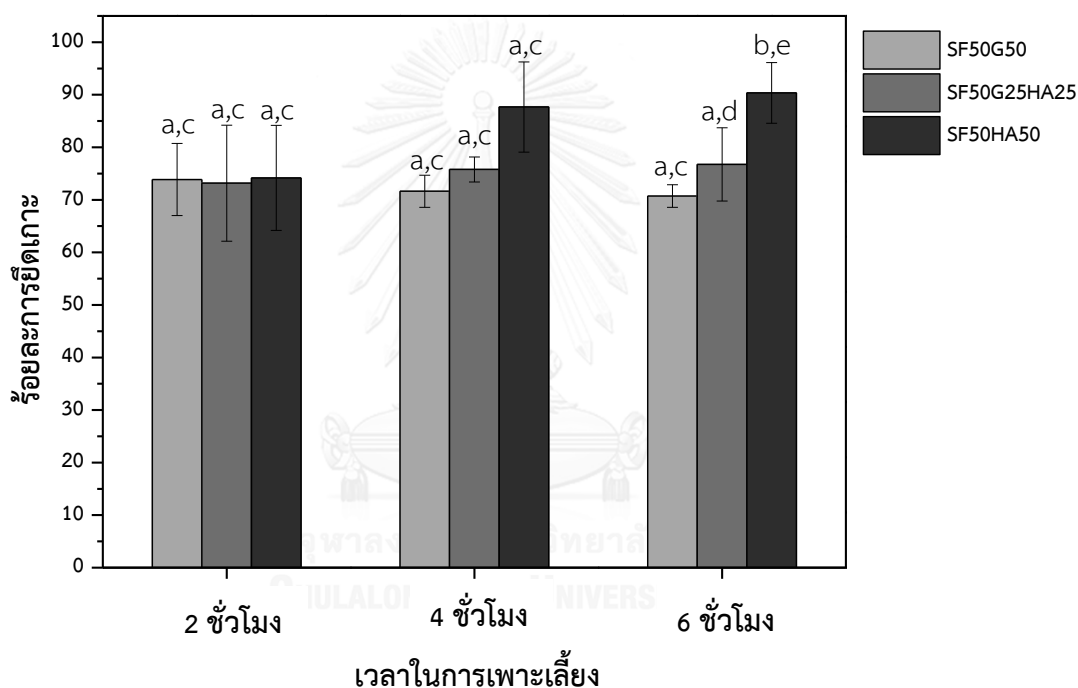
ผลการศึกษาร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมเป็นเวลา 2, 4, และ 6 ชั่วโมง แสดงดังในรูปที่ 4.14 เมื่อพิจารณาเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ พบว่า ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลทุกชนิด ที่เวลาเพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 4 ถึง 6 ชั่วโมง ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยเฉพาะร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลชนิด SF50HA50 เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาผลของชนิดของไฮโดรเจลผสมต่อร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ พบว่า ไฮโดรเจลทุกชนิดที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง มีร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 4 ถึง 6 ชั่วโมง ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) มีค่าสูงกว่าไฮโดรเจลที่ไม่มีกรดไฮยาลูรอนิก (SF50G50) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า กรดไฮยาลูรอนิกมีแนวโน้มที่จะช่วยในการกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์

จากรายงานในปี 2004 ของ Liu, H. และคณะ [124] รายงานว่า กรดไฮยาลูรอนิกซึ่งเป็นสารในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคน มีส่วนช่วยกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (สกัดแยกได้จาก human foreskins) บนโครงเลี้ยงเซลล์ของโคโคซาน เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก โดยกรดไฮยาลูรอนิกสามารถจับกับตัวรับ CD44 (CD44 receptor) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยจะส่งสัญญาณกระตุ้นการยึดเกาะกับเซลล์ได้โดยตรง

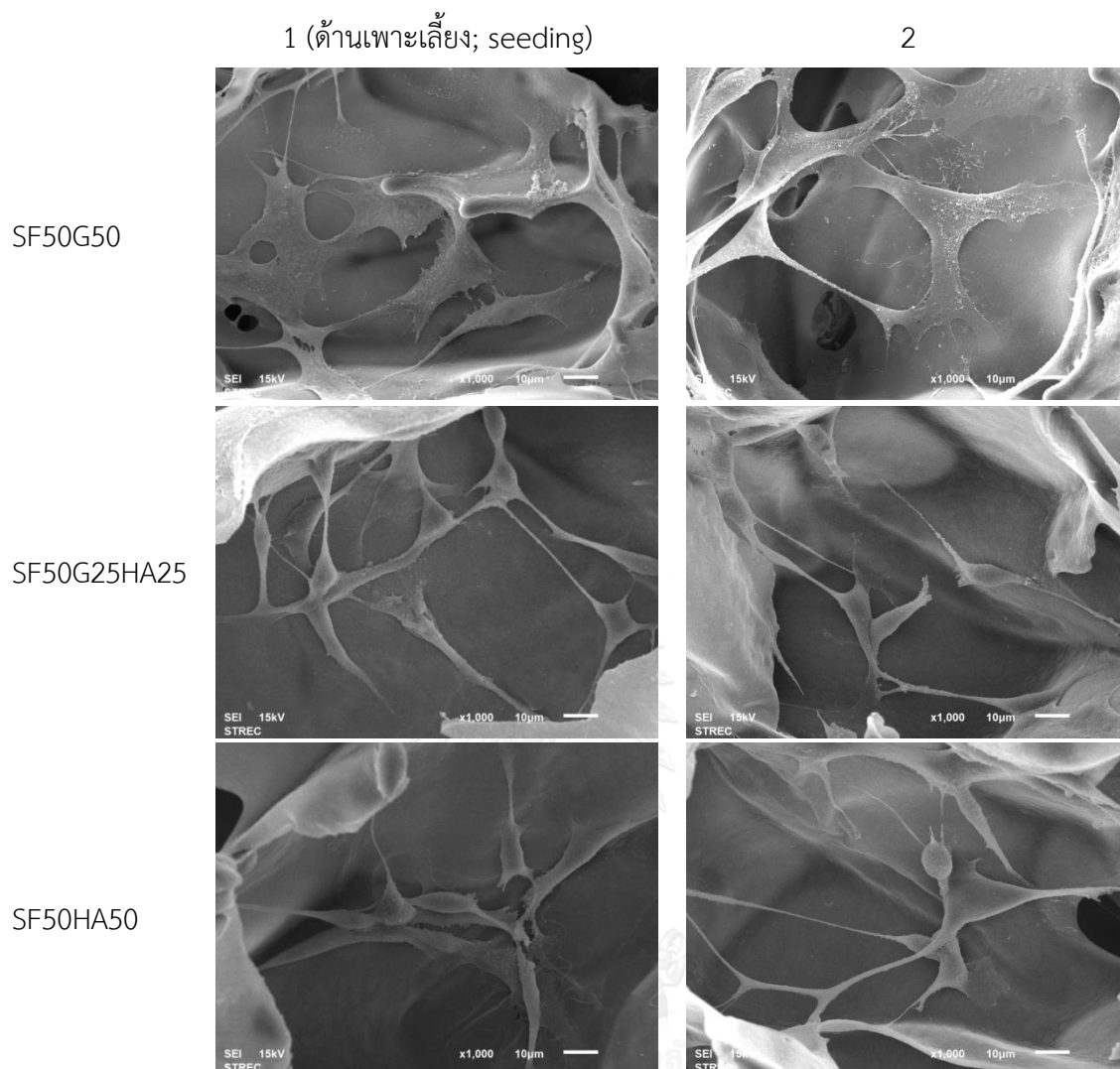
นอกจากนี้การยึดเกาะของเซลล์ยังขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) ของพื้นผิววัสดุและการดูดซับของโปรตีน โดยวัสดุที่มีความชอบน้ำสูงจะส่งเสริมการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว เช่น ไฟโบรเนคติน ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โปรตีนเหล่านี้มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ ซึ่งกรดไฮยาลูรอนิกเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความชอบน้ำสูง ดังนั้นไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) จึงน่าจะส่งเสริมการดูดซับโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเซลล์และกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี

แต่ในกรณีการยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลที่ไม่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ (SF50G50) ไม่พบความแตกต่าง เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มจาก 2 เป็น 6 ชั่วโมง

สำหรับสัณฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50G50 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 4.15) พบว่า มีลักษณะแผ่อย่างชัดเจน ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 จะแผ่ได้น้อย (ค่อนข้างกลม) และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50HA50 จะมีลักษณะกลม ดังนั้นจะสังเกตเห็นว่า ไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ จะทำให้สัณฐานของเซลล์มีลักษณะกลม เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิก จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan, GAGs) ที่มีประจุเป็นลบสูง สอดคล้องกับผลการศึกษาค่าศักย์ゼต้าของสารละลายผสม SF50HA50 (แสดงในหัวข้อ 4.1.1) จึงทำให้ประจุบนพื้นผิวไม่เหมาะสมแก่การแผ่ของเซลล์ซึ่งมีประจุลบบนพื้นผิวเช่นเดียวกัน [125]



รูปที่ 4.14 ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม SFGHA แต่ละชนิด ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, และ 6 ชั่วโมง ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ความหนาแน่นเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (cell seeding) 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบเวลาในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ที่ไฮโดรเจลชนิดเดียวกัน และ c, d, e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบไฮโดรเจลแต่ละชนิด ที่เวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากัน)



รูปที่ 4.15 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SFGHA แต่ละชนิด แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยที่ 1 (ด้านเพาะเลี้ยง; seeding) และ 2 (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)

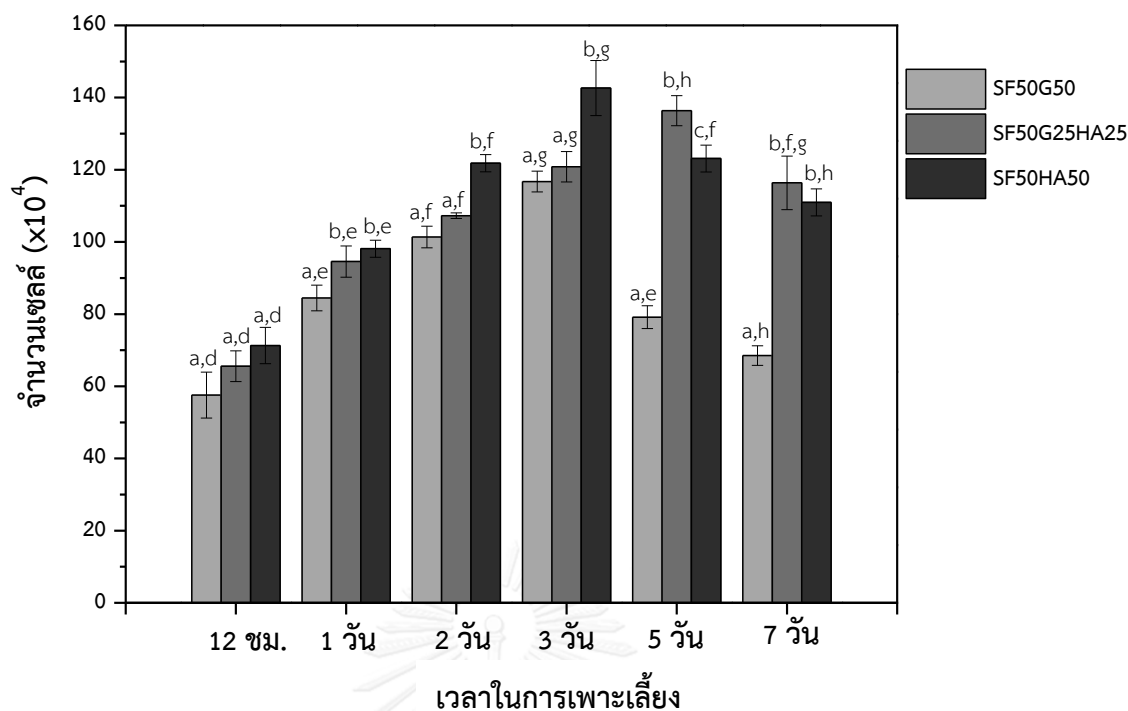
2) การเจริญเติบโตของเซลล์บนไฮโดรเจลผสม

รูปที่ 4.16 แสดงจำนวนเซลล์ NIH/3T3 ที่เจริญเติบโตบนไฮโดรเจล ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งพบว่า จำนวนเซลล์บนไฮโดรเจลผสมชนิด SF50HA50 มีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน (ประมาณ 1.42×10^6 เซลล์) สำหรับไฮโดรเจลผสมชนิด SF50G50 และ SF50G25HA25 มีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าประมาณ 1.17×10^6 และ 1.21×10^6 เซลล์ ตามลำดับ จะสังเกตเห็นว่า ไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนเป็นส่วนผสมมีจำนวนเซลล์ค่อนข้างสูง แสดงได้ว่า กรดไฮยาลูรอน

อาจจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกสามารถจับกับแฟกเตอร์ใน โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) ชนิด basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF) เป็นต้น โดยโกรทแฟคเตอร์เหล่านี้จะช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน เจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้การดูดซับโปรตีนบนพื้นผิวทำให้เซลล์เกาะได้มากกว่า มีการเกิด อันตรกิริยาระหว่างเซลล์ (cell-cell interaction) ซึ่งช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวได้เร็ว [124] นอกจากนี้ ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของไฮโดรเจลอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ กล่าวคือ ไฮโดรเจลที่เตรียมจากกรดไฮยาลูรอนิก มีรูพรุนขนาดใหญ่ (ผลการศึกษแสดงในหัวข้อ 4.3.1.1) อาจจะทำให้ อาหารเลี้ยงเซลล์และโปรตีนสามารถแพร่ผ่านเข้าไปเลี้ยงเซลล์ได้มากกว่า

จากรายงานในปี 1998 ของ Greco, R. M. และคณะ [126] พบว่า เมื่อมีการใช้กรดไฮยาลูรอนิกร่วมกับเมทริกซ์คอลลาเจนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ human fibroblast จะตรวจพบสาร ^3H -thymidine ปริมาณมาก เมื่อเทียบกับเมทริกซ์คอลลาเจนที่ไม่เติมกรดไฮยาลูรอนิก แสดงให้เห็นว่าเซลล์สังเคราะห์ DNA ได้มาก ดังนั้นการเติมกรดไฮยาลูรอนิกในเมทริกซ์คอลลาเจนจะช่วยส่งเสริม การแบ่งตัวของเซลล์ human fibroblast โดยกรดไฮยาลูรอนิกจะช่วยให้สภาพแวดล้อมของของเหลว ภายในเซลล์เหมาะแก่การเคลื่อนที่และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ และยังช่วยทำให้เซลล์จับกับไซโตไคน์ (cytokine) ได้ดียิ่งขึ้น [127]

ทั้งนี้เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 เพิ่มขึ้นจากวันที่ 3 มีจำนวนสูงที่สุด ประมาณ 1.36×10^6 เซลล์ แต่ในกรณีเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมชนิด SF50G50 และ SF50HA50 มีแนวโน้มลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน โดยเฉพาะเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมชนิด SF50G50 ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการเชื่อมโยงกันของรูพรุนภายในไฮโดรเจล (pore interconnection) มีน้อย (ผลการศึกษแสดงในหัวข้อ 4.3.1.1) ทำให้สารอาหารและของเสียแพร่ผ่านได้ไม่ดี นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัด เรื่องการถ่ายเทของเสียของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค static culture กล่าวคือ ออกซิเจนและสารอาหาร รวมทั้งของเสียที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเข้าออกได้ ประกอบกับร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสม SF50G50 มีค่าต่ำ เมื่อเทียบกับไฮโดรเจลอีกสองชนิด (ผลการศึกษในหัวข้อ 4.3.1.3) ซึ่งอาจทำให้ไฮโดรเจลดูดซับโปรตีนหรือสารอาหารในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้น้อยกว่า จึงทำให้มีสารอาหารไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้จำนวนเซลล์ลดลง



รูปที่ 4.16 จำนวนเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม SFGHA ชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบชนิดไฮโดรเจลที่แตกต่างกัน ที่เวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากัน และ d, e, f, g, h แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบไฮโดรเจลชนิดเดียวกัน ที่เวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน)

เมื่อพิจารณาการอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมแต่ละชนิด (การคำนวณแสดงในภาคผนวก) สรุปได้ในตารางที่ 4.3 พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ทุกชนิด (ไฮโดรเจลผสมชนิด SF50G50 พิจารณาที่ช่วงเวลาเพาะเลี้ยง 6 ถึง 24 ชั่วโมง ส่วนไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 และ SF50HA50 ใช้ช่วงเวลา 4 ถึง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.17) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

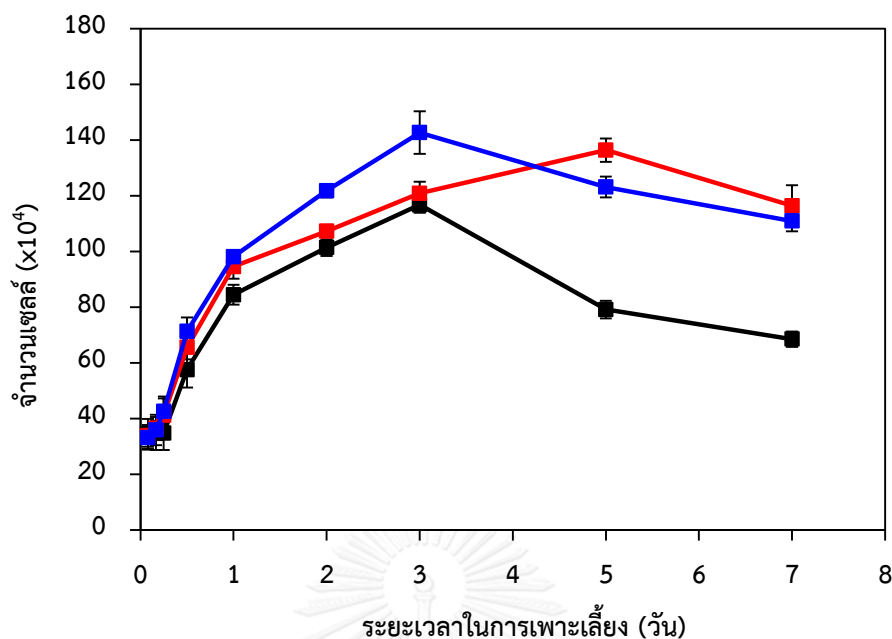
ทั้งนี้เมื่อพิจารณาระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ที่เจริญเติบโตบนไฮโดรเจลชนิด SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 มีค่าประมาณ 12.88 ± 1.97 , 13.97 ± 0.72 , และ 12.85 ± 1.22 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า ระยะเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์บนไฮโดรเจลผสมทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม SFGHA แต่ละชนิด ที่เชื่อมขวางด้วย EDC

ชนิดของไฮโดรเจล	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ , ชม. ⁻¹)	ระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT, ชม.)
SF50G50	$5.5 \times 10^{-2} \pm 0.002^a$	12.88 ± 1.97^b
SF50G25HA25	$5.0 \times 10^{-2} \pm 0.003^a$	13.97 ± 0.72^b
SF50HA50	$5.4 \times 10^{-2} \pm 0.005^a$	12.85 ± 1.22^b

(a แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยเปรียบเทียบชนิดของไฮโดรเจลที่แตกต่างกัน)

(b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ โดยเปรียบเทียบชนิดไฮโดรเจลที่แตกต่างกัน)



รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (—■—) SF50G50, (—■—) SF50G25HA25, และ (—■—) SF50HA50

3) โครงสร้างสัณฐานของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม

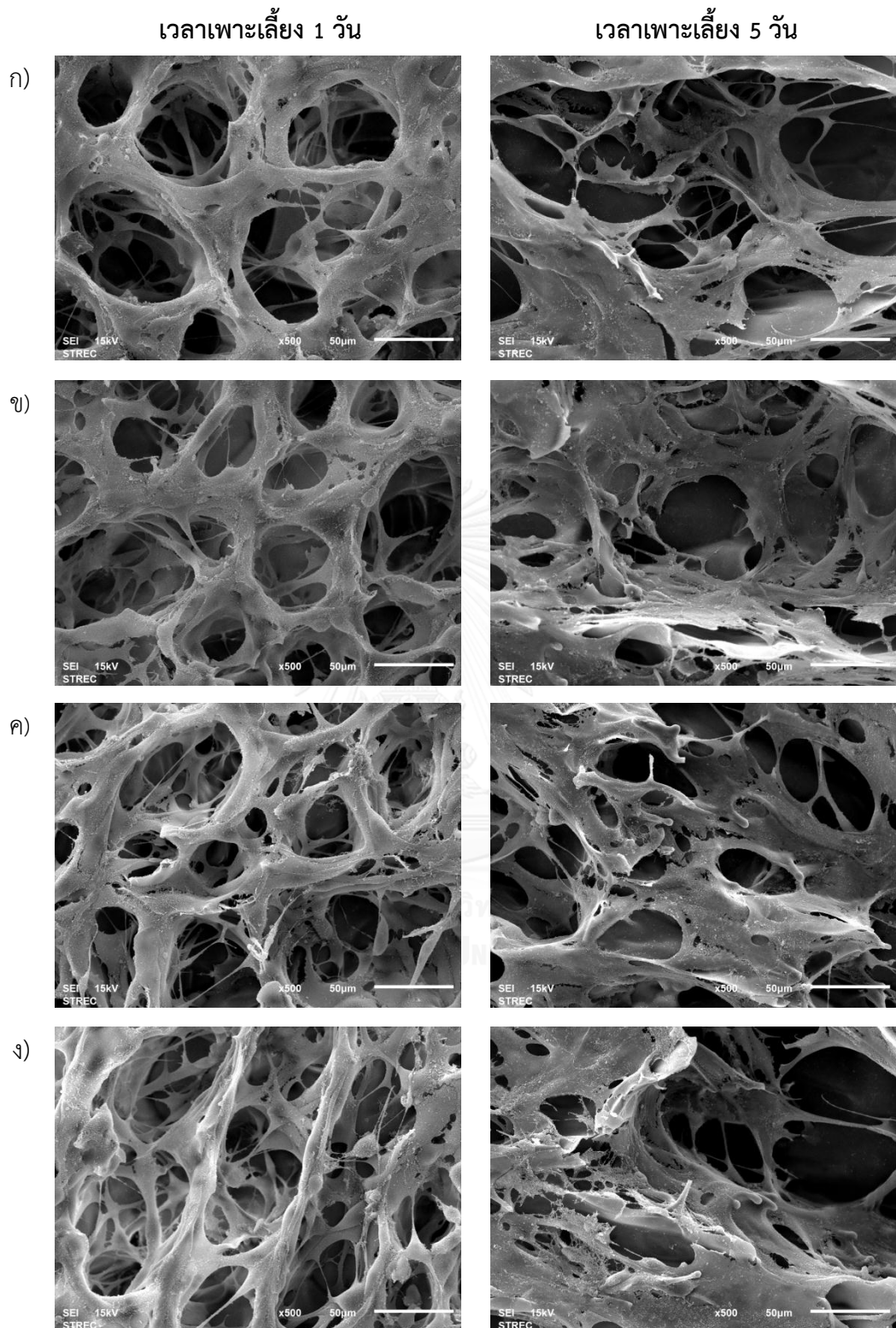
รูปที่ 4.18 ถึง 4.20 แสดงโครงสร้างสัณฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมทั้งสามชนิด เป็นเวลา 1 และ 5 วัน พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจะพบได้ทุกตำแหน่งตั้งแต่ด้านเพาะเลี้ยง (seeding) จนถึงด้านที่ติดกับจานเลี้ยงเซลล์ในไฮโดรเจลผสม (ดังแสดงในรูปที่ 3.5) แสดงว่า เซลล์มีการกระจายได้ทั่วทั้งชิ้นงาน เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 วัน พบว่า สัณฐานของเซลล์บนไฮโดรเจลผสมที่มีสัดส่วนเจลาติน 50 เปอร์เซ็นต์ (SF50G50) มีลักษณะแผ่อย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อเทียบกับไฮโดรเจลผสมอีกสองชนิด (SF50G25HA25 และ SF50HA50) เนื่องจากเจลาตินเป็นสารประกอบสำคัญในเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix; ECM) และเป็นอนุพันธ์ย่อยของคอลลาเจน ซึ่งจะมีลำดับกรดอะมิโน RGD (กรดอะมิโนชนิด (Arginine, Arg) ไกลซีน (Glycine, Gly) และ กรดแอสพาทิก (Aspartic acid, Asp)) ที่มีความสำคัญต่อพฤติกรรมของเซลล์ กล่าวคือ

ส่วนที่เป็นอินทีกรินของเซลล์จะเข้าจับตรงตำแหน่ง RGD ซึ่งเซลล์สามารถจดจำและสร้างพันธะได้ ลำดับกรดอะมิโน RGD จึงมีความสำคัญต่ออันตรกิริยาเริ่มต้นระหว่างเซลล์กับวัสดุ (cell-matrix interaction) [128]

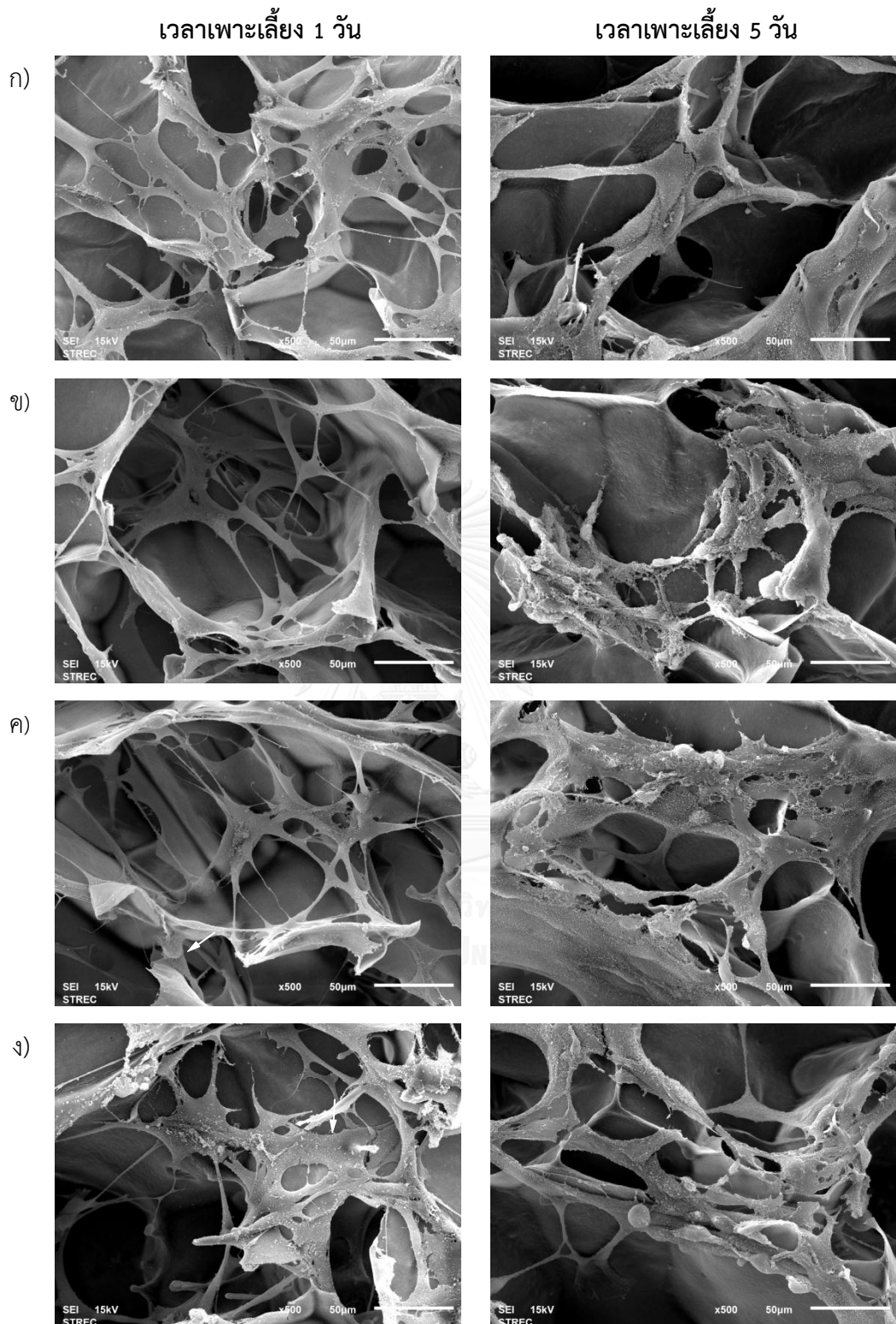
แต่ในกรณีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิก 25 เปอร์เซ็นต์ (SF50G25HA25) พบว่า สัณฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลจะแผ่ได้น้อย สำหรับสัณฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิก 50 เปอร์เซ็นต์ (SF50HA50) พบว่า มีลักษณะค่อนข้างกลม คล้ายกับสัณฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 4.15)

เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 5 วัน พบว่า โครงสร้างสัณฐานของเซลล์บนไฮโดรเจลผสมทุกชนิดมีลักษณะแผ่ขยายเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 1 วัน โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50G50 มีลักษณะแผ่ได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลอีกสองชนิด (SF50G25HA25 และ SF50HA50)

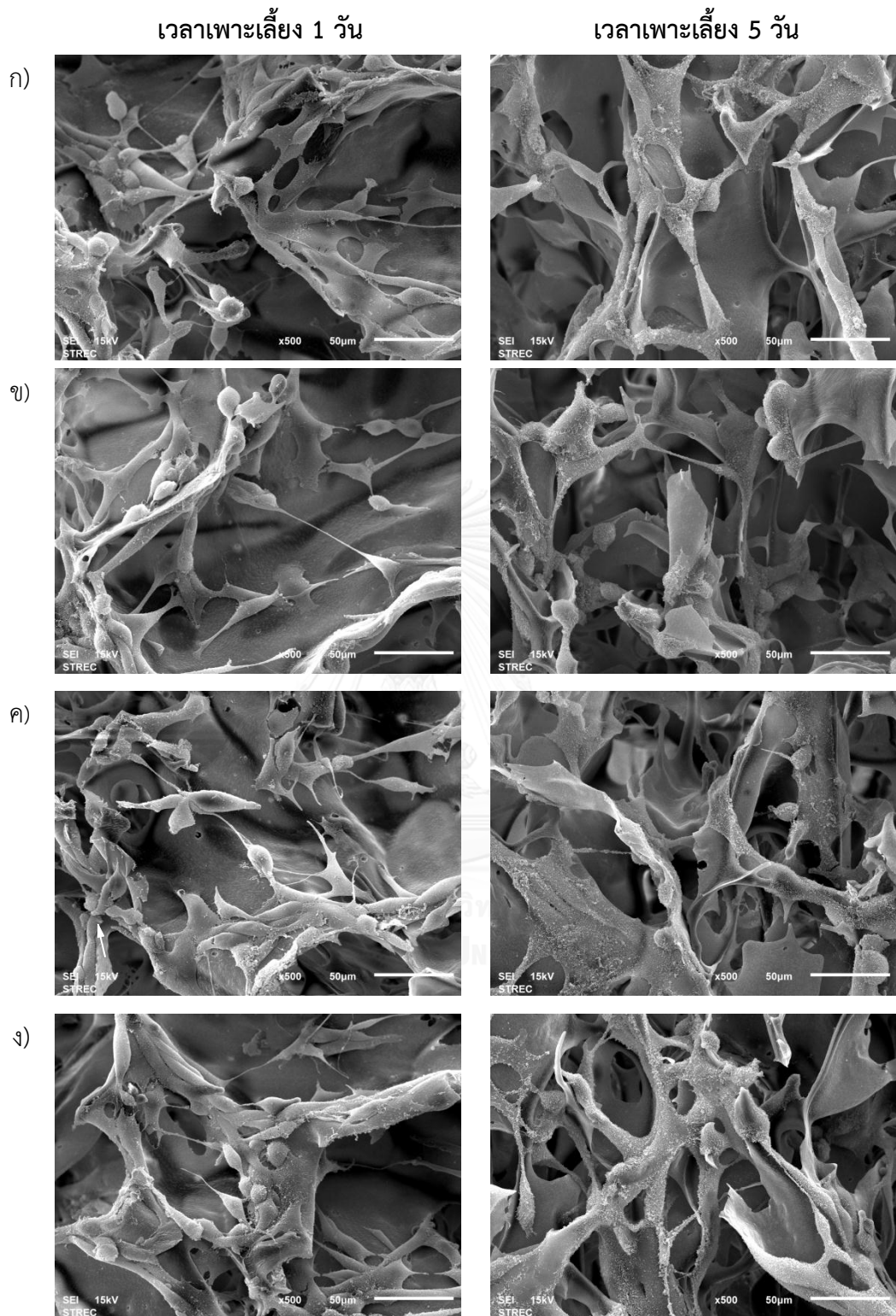
จากผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ไฮโดรเจลผสมที่ผลิตได้มีความเข้ากันทางชีวภาพกับเซลล์ NIH/3T3 และยังพบว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการเตรียมไฮโดรเจลอาจจะมีส่วนช่วยกระตุ้นการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกมีสมบัติอุ้มน้ำสูง ทั้งนี้กรดไฮยาลูรอนิกมีประจุบนพื้นผิวเป็นลบจึงทำให้สัณฐานของเซลล์มีลักษณะกลม



รูปที่ 4.18 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SF50G50 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่ตำแหน่ง ก) 1 (ด้านเพาะเลี้ยง, seeding), ข) 2, ค) 3, และ ง) 4 (ด้านที่สัมผัสกับจานเลี้ยงเซลล์) (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4.19 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่ตำแหน่ง ก) 1 (ด้านเพาะเลี้ยง, seeding), ข) 2, ค) 3, และ ง) 4 (ด้านที่สัมผัสกับจานเลี้ยงเซลล์) (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4.20 ภาพตัดขวางของไฮโดรเจลผสม SF50HA50 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC แสดงโครงสร้างสัณฐานของเซลล์ NIH/3T3 ที่ตำแหน่ง ก) 1 (ด้านเพาะเลี้ยง, seeding), ข) 2, ค) 3, และ ง) 4 (ด้านที่สัมผัสกับจานเลี้ยงเซลล์) (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมโครเมตร)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมไฮโดรเจลผสมของไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกรดไฮยาลูรอนิก ตามสัดส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ได้แก่ SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 โดยขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และทำให้ไฮโดรเจลมีความคงตัวมากขึ้น โดยการเชื่อมขวางด้วย EDC ที่มีเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย

ผลการศึกษาลักษณะของสารละลายผสม สรุปได้ว่า ความหนืดของสารละลายผสมจะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกที่เพิ่มขึ้น และผลการศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารละลายและสารละลายผสมพบว่า ค่าศักย์เซต้าของสารละลายทุกชนิด มีแนวโน้มเป็นลบ เมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกจะมีค่าเป็นลบตลอดช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9 และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าศักย์เซต้ามักมีแนวโน้มเป็นลบมากขึ้นอย่างชัดเจน ส่วนในกรณีของสารละลายผสมพบว่า ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสม SF50G50 มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ (ค่าความเป็นกรดต่าง 5 ถึง 6) ซึ่งเป็นจุดที่เกิดสมดุลของประจุทางไฟฟ้าของสารละลายทั้งสองชนิด ส่วนสารละลายที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นส่วนผสม (SF50G25HA25 และ SF50HA50) ค่าศักย์เซต้ามักมีแนวโน้มใกล้เคียงกับค่าศักย์เซต้าของกรดไฮยาลูรอนิก เนื่องจากประจุลบบนพื้นผิวของโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกมีจำนวนมาก และเมื่อสังเกตลักษณะสารละลายผสมในแต่ละชนิดพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 สารละลายผสมที่ได้จะมีลักษณะใส ไม่ตกตะกอน ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการขึ้นรูปไฮโดรเจลด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

จากการศึกษาผลของสภาวะที่ใช้ในการเชื่อมขวางไฮโดรเจล สามารถสรุปได้ว่า ไฮโดรเจลผสมที่เชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ สามารถเชื่อมขวางไฮโดรเจลทั้งสามชนิดได้สำเร็จ ในระยะเวลาการเชื่อมขวาง 6 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฮโดรเจลภายหลังการเชื่อมขวางมีค่าประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ ประกอบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนพบว่า ไฮโดรเจลผสมภายหลังการเชื่อมขวางจะมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลง แสดงให้เห็นว่า หมู่อะมิโนถูกใช้ในการเชื่อมขวางด้วย EDC

และผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ของไฮโดรเจลก่อนและหลังการเชื่อมขวางมีค่าใกล้เคียงกัน บ่งบอกว่า EDC สามารถเชื่อมขวางโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกได้เกือบทั้งหมด ดังนั้นจึงนำไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสภาวะดังกล่าวมาศึกษาสมบัติทางกายภาพ และสมบัติด้านต่าง ๆ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลที่ผลิตได้ทั้งก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า EDC สามารถเชื่อมขวางไฮโดรเจลได้สำเร็จ จึงสามารถคงรูปร่างของไฮโดรเจลไว้ได้ และไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ (SF50G25HA25 และ SF50HA50) มีรูพรุนขนาดใหญ่กว่าไฮโดรเจลผสมที่มีโปรตีนเพียงอย่างเดียว (SF50G50) เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกมีหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำสูง เมื่อรวมตัวกับโมเลกุลของน้ำจึงส่งผลทำให้รูพรุนที่ได้มีขนาดใหญ่ เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสมก่อนและหลังการเชื่อมขวาง พบว่า โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลผสมทั้งสามชนิดภายหลังจากเชื่อมขวางมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งคาดว่าเกิดจาก 2 สาเหตุหลัก คือ จากการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย กล่าวคือ เอทานอลชักนำเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินและทำให้ตำแหน่งฟิคของไฟโบรอินไหมไทยเปลี่ยนแปลง และจากผลของปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย EDC เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลที่ผลิตได้จากร้อยละการดูดซับน้ำ พบว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการแช่ไฮโดรเจล ร้อยละการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้น โดยไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบจะมีร้อยละการดูดซับน้ำสูงที่สุด เมื่อเทียบกับไฮโดรเจลชนิดที่ไม่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นส่วนผสม

ผลการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสมที่ผลิตได้ ในส่วนของความสามารถในการย่อยสลายในระดับห้องปฏิบัติการของไฮโดรเจลที่ผลิตได้ในสภาวะที่มีเอนไซม์ (โปรติเอส XIV ความเข้มข้นเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ (สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM) พบว่า ไฮโดรเจลผสมที่มีสัดส่วนของโปรตีน 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ในสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV จะถูกย่อยสลายเร็วกว่าไฮโดรเจลที่มีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์โปรติเอส XIV ต่อกรดอะมิโนในโมเลกุลของโปรตีน แต่ในกรณีไฮโดรเจลผสมเมื่อแช่ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ พบว่า ไฮโดรเจลผสมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ 50 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำได้เร็วกว่าไฮโดรเจลผสมอีกสองชนิด และเมื่อพิจารณาผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลผสมที่ผลิตได้กับเซลล์ NIH/3T3

สรุปได้ว่า ไฮโดรเจลผสมทั้งสามชนิดที่ผลิตได้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเฉพาะไฮโดรเจลที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ เซลล์มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ค่อนข้างดี ทั้งนี้ด้วยประจุที่เป็นลบของกรดไฮยาลูรอนิกส่งผลทำให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสมมีลักษณะค่อนข้างกลม

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ไฮโดรเจลผสมภายหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ NIH/3T3 และมีสมบัติเหมาะสมนำไปประยุกต์ใช้เป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการตรวจวัดปริมาณหมู่คาร์บอกซิลของไฮโดรเจลทั้งก่อนและหลังการเชื่อมขวางเพื่อยืนยันผลการเชื่อมขวางด้วย EDC
2. ปรับปรุงวิธีการเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ด้วยเทคนิค การเขย่า (agitation seeding) และควรมีการย้อมสีเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค อิมมูโนสแตนนิง (immunostaining) เพื่อให้เห็นลักษณะการแผ่ของเซลล์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น
3. ควรมีการศึกษาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลในระดับสัตว์ทดลอง (*In vivo*)

รายการอ้างอิง

1. Ma, W., T. Tavakoli, E. Derby, Y. Serebryakova, M. S. Rao, et al., *Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells*. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 90.
2. Necas, J., L. Bartosikova, P. Brauner, and J. Kolar, *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*. Vet Med, 2008. **53**(8): p. 397-411.
3. Laurent, T. C., *In vitro studies on the transport of macromolecules through the connective tissue*. Fed. Proc., 1966. **25**(3): p. 1128-1134.
4. Rychly, J., L. Soltes, M. Stankovska, I. Janigova, K. Csomorova, et al., *Unexplored capabilities of chemiluminescence and thermoanalytical methods in characterization of intact and degraded hyaluronans*. Polym. Degrad. Stab., 2006. **91**(12): p. 3174-3184.
5. Kim, U. -J., J. Park, H. J. Kim, M. Wada, and D. L. Kaplan, *Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2775-85.
6. Zhang, F., C. He, L. Cao, W. Feng, H. Wang, et al., *Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering*. Int J Biol Macromol, 2011. **48**(3): p. 474-81.
7. Zhou, Z., Z. Yang, T. Huang, L. Liu, Q. Liu, et al., *Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Gelatin/Hyaluronic Acid Composite Hydrogels*. Polym. Plast. Technol. Eng., 2013. **52**(1): p. 45-50.
8. Bigi, A. , G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, and N. Roveri, *Mechanical and thermal properties of gelatin "lms at dilent degrees of glutaraldehyde crosslinking*. Biomaterials, 2011. **22**: p. 763-768.
9. Zhang, Y. Z., J. Venugopal, Z. -M. Huang, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, *Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers*. Polymer, 2006. **47**(8): p. 2911-2917.
10. Powell, H. M. and S. T. Boyce, *EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability*. Biomaterials, 2006. **27**(34): p. 5821-5827.

11. Xu, S., J. Li, A. He, W. Liu, X. Jiang, et al., *Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes*. Polymer, 2009. **50**(15): p. 3762-3769.
12. Enrione, J., P. Diaz-Calderon, C. R. Weinstein-Oppenheimer, E. Sanchez, M. A. Fuentes, et al., *Designing a gelatin/chitosan/hyaluronic acid biopolymer using a thermophysical approach for use in tissue engineering*. Bioprocess Biosyst Eng, 2013. **36**(12): p. 1947-1956.
13. Ratanavaraporn, J., R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, *Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats*. Int J Biol Macromol, 2010. **47**(4): p. 431-438.
14. Montazeri, M., S. Karbasi, M. R. Foroughi, A. Monshi, and R. Ebrahimi-Kahrizangi, *Evaluation of mechanical property and bioactivity of nano-bioglass 45S5 scaffold coated with poly-3-hydroxybutyrate*. J. Mater. Sci. Mater. Med., 2015. **26**: p. 53-69.
15. Grumezescu, A., *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials volume 5*. 2016, William Andrew.
16. Palsson, B., *Principles and applications in engineering series: Tissue engineering*. 2003, CRC Press LLC.
17. Martin, J. R., J. F. Johnson, and A. R. Cooper, *Mechanical properties of polymers: the influence of molecular weight and molecular weight distribution*. J Macromol Sci Polymer Rev, 1972. **8**: p. 57-199.
18. Harley, B. A., J. H. Leung, ECCM. Silva, and L. J Gibson, *Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds*. Acta Biomater, 2007. **3**: p. 463-474.
19. Murphy, C. M., M. G. Haugh, and F. J. O'Brien, *The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2010. **31**: p. 461-466.
20. แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์. [Online]. Available from: <http://freezedryinc.com/page.php?id=30>. (2016 April)

21. ปิณณธร ภัทรสถาพรกุล, เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 1). 2547: สมาคมเครื่องทำความเย็นไทย.
22. ขจรินทร์ เตชะพันธุ์, การทำโปรตีนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์. 2542: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมและการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
23. Kang, H.-W. , Y. Tabata, and Y. Ikada, *Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering*. *Biomaterials*, 1999. **20**: p. 1339-1344.
24. Mandal, B. B. and S. C. Kundu, *Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds*. *Biomaterials*, 2009. **30**(15): p. 2956-2965.
25. He, J., D. Li, Y. Liu, B. Yao, B. Lu, et al., *Fabrication and characterization of chitosan/gelatin porous scaffolds with predefined internal microstructures*. *Polymer*, 2007. **48**(15): p. 4578-4588.
26. Vepari, C. and D. L. Kaplan, *Silk as a Biomaterial*. *Prog Polym Sci*, 2007. **32**(8-9): p. 991-1007.
27. Hardy, J. G. and T. R. Scheibel, *Composite materials based on silk proteins*. *Prog. Polym. Sci.*, 2010. **35**(9): p. 1093-1115.
28. Mondal, M. , K. Trivedy, and S. Nirmal Kumar, *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review*. *J. Environ. Sci.*, 2007. **5**(2): p. 63-76.
29. Wongpanit, P. and R. Rujiravanit, *Combinatorial effects of charge characteristics and hydrophobicity of silk fibroin on the sorption and release of charged dyes*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2012. **23**(9): p. 1199-215.
30. Bini, E., David P. Knight, and David L. Kaplan, *Mapping Domain Structures in Silks from Insects and Spiders Related to Protein Assembly*. *J. Mol. Biol.*, 2004. **335**(1): p. 27-40.
31. Min, B. -M., G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, et al., *Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro*. *Biomaterials*, 2004. **25**(7-8): p. 1289-1297.
32. Zhou, C.-Z. , F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, et al., *fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene*. *Nucleic Acids Res.*, 2000. **28**(12): p. 2413-2419.

33. Shimura, K., F. Oyama, and S. Mizuno, *Predominant Synthesis of Fibroin Heavy and Light Chains on the Membrane-Bound Polysomes Prepared from the Posterior Silk Gland of the Silkworm, Bombyx mori*. *J. Biochem*, 1984. **96**(4): p. 1143-1153.
34. Inoue, S., K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, et al., *Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(51): p. 40517-28.
35. Lee, Y. -M., *Silk Reeling and Testing Manual*. 1996, Rome: FAO, Viale delle Terme di Caracalla.
36. ลักษณะแผ่นพับพลิทเบตา (β -Pleated Sheet). [Online]. Available from: <http://www.silkwoodsilk.com/blog/2011/06/22/the-molecular-structure-of-silk>. (2015 December)
37. การเรียงตัวของหมู่อะมิโน. [Online]. Available from: <http://www.cem.msu.edu>. (2015 December)
38. Takasu, Y., H. Yamada, and K. Tsubouchi, *Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002. **66**(12): p. 2715-8.
39. Kundu, S. C., B. C. Dash, R. Dash, and D. L. Kaplan, *Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications*. *Prog. Polym. Sci.*, 2008. **33**(10): p. 998-1012.
40. Wang, Y., H. J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, *Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials*. *Biomaterials*, 2006. **27**(36): p. 6064-82.
41. Yeo, J. H., K. G. Lee, H. C. Kim, Y. L. Oh, A. -J. Kim, et al., *The Effects of PVA/Chitosan/Fibroin (PCF)-Blended Spongy Sheets on Wound Healing in Rats*. *Biot. Pharm. Bull.*, 2000. **23**(10): p. 1220-1223.
42. Santin, M., A. Motta, G. Freddi, and M. Cannas, *In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin*. *J Biomed Mater Res A*, 1999. **46**(3): p. 382-389.

43. Gil, Eun S., David J. Frankowski, Richard J. Spontak, and Samuel M. Hudson, *Swelling Behavior and Morphological Evolution of Mixed Gelatin/Silk Fibroin Hydrogels*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**: p. 3079-3087.
44. Kasoju, N. and U. Bora, *Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin scaffold*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012. **100**(7): p. 1854-66.
45. Reed, R. K. , K. Lilja, and T. C. Laurent, *Hyaluronan in the rat with special reference to the skin*. *Acta Physiol Scand*, 1988. **134**: p. 405-411.
46. Fessler, J. H. and L. I. Fessler, *Electron microscopic visualization of the polysaccharide hyaluronic acid*. *Biochemistry* 1966. **56**: p. 141-147.
47. O'Regan, M., I. Martini, F. Crescenzi, C. D. Luca, and M. Lansing, *Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1994. **16**(6): p. 283-286.
48. Cowman, M. K. and S. Matsuoka, *Experimental approaches to hyaluronan structure*. *Carbohydr. Res.*, 2005. **340**(5): p. 791-809.
49. Laurent, T. C., *Structure of hyaluronic acid*, in: *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*. Vol. 2 (E. A. Balazs, ed.). 1970, Academic Press, New York. p. 703-732.
50. Stern, R. and H. I. Maibach, *Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation*. *Clin Dermatol*, 2008. **26**(2): p. 106-22.
51. Miyazaki, T., C. Yomota, and S. Okada, *Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid*. *Polym. Degrad. Stab.*, 2001. **74**: p. 77-85.
52. Lapcik, L. and L. L. Jr, *Hyaluronan Preparation, Structure, Properties, and Applications*. *Chem. Rev.*, 1998. **98**(8): p. 2663-2681.
53. Fraser, J. R. E. , T. C. Laurent, and U. B. G. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. *J. Intern. Med.*, 1997. **242**: p. 27-33.
54. Ellis, I. R. and S. L. Schor, *Differential Effects of TGF- β 1 on Hyaluronan Synthesis by Fetal and Adult Skin Fibroblasts: Implications for Cell Migration and Wound Healing*. *Exp. Cell. Res.*, 1996. **228**: p. 326-333.

55. Brecht, M., U. Mayer, E. Schlosser, and P. Prehm, *Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis*. *Biochem. J*, 1986. **239**: p. 445-450.
56. Matuoka, K., M. Namba, and Y. Mitsui, *Hyaluronate Synthetase Inhibition by Normal and Transformed Human Fibroblasts during Growth Reduction* *J. Cell Biol.*, 1987. **104**: p. 1105-1115
57. Wang, H. M., Y. T. Chou, Z. H. Wen, C. Z. Wang, C. H. Chen, et al., *Novel biodegradable porous scaffold applied to skin regeneration*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e56330.
58. Hellström, S. and C. Laurent, *Hyaluronan and Healing of Tympanic Membrane Perforations. An experimental study*. *Acta Otolaryngol.*, 2009. **104**(442): p. 54-61.
59. Casada, A., B. Bassetto, B. Azzena, P. Brun, A. De Galateo, et al., *Effect of some chemical substances on wound healing*. 1989, In *Gutaneous Development, Aging and Repair*, Liviana, Padava, Italy. 189-196.
60. King, S.R. , W.L. Hicherson, and K.G. Protor, *Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing*. *Surgery*, 1991. **109**: p. 76-84.
61. Gomez-Guillen, M.C., B. Gimenez, M.E. Lopez-Caballero, and M.P. Montero, *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. *Food Hydrocolloids*, 2011. **25**: p. 1813-1827.
62. Yasuhiko, T. and I. Yoshito, *Protein release from gelatin matrices*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998. **31**: p. 287–301.
63. Schrieber, R. and H. Gareis, *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. 2007, Federal Republic of Germany.
64. Segtnan, V. H. and T. Isaksson, *Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy*. *Food Hydrocolloids*, 2004. **18**(1): p. 1-11.
65. วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, วิทยาศาสตร์เส้นใย. พิมพ์ครั้งที่ 2 ed. 2543, กรุงเทพฯ ฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

66. Mandal, B. B., J. K. Mann, and S. C. Kundu, *Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release*. Eur J Pharm Sci, 2009. **37**(2): p. 160-71.
67. Yan, S., Q. Zhang, J. Wang, Y. Liu, S. Lu, et al., *Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction*. Acta Biomater, 2013. **9**(6): p. 6771-82.
68. Sawatjui, N., T. Damrongrungruang, W. Leeanansaksiri, P. Jearanaikoon, and T. Limpai boon, *Fabrication and characterization of silk fibroin-gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid scaffold for biomedical applications*. Mater. Lett., 2014. **126**: p. 207-210.
69. Han, F., Y. Dong, Z. Su, R. Yin, A. Song, et al., *Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material*. Int. J. Pharm., 2014. **476**(1-2): p. 124-33.
70. Wess, T. J. and J. P. Orgel, *Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration*. Thermochim Acta, 2000. **365**: p. 119-128.
71. Haugh, M. G., C. M. Murphy, R. C. McKiernan, C. Altenbuchner, and F. J. O'Brien, *Crosslinking and mechanical properties significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(9-10): p. 1201-8.
72. Drexler, J. W. and H. M. Powell, *DHT Crosslinking of Electrospun Collagen*. Tissue Eng. Part C Methods, 2010.
73. การสลายตัวของ Co-60. [Online]. Available from: <http://www.nppdo.go.th/node/131>. (2015 November)
74. Srinivas, A. and A. Ramamurthi, *Effects of gamma-irradiation on physical and biologic properties of crosslinked hyaluronan tissue engineering scaffolds*. Tissue Eng., 2007. **13**(3): p. 447-59.
75. Lim, Y. -M. , H. -J. Gwon, I. K. Kwon, J. -S. Park, S. -E. Kim, et al., *Synthesis and properties of hyaluronic acid containing copolymers crosslinked by γ -ray irradiation*. Macromol Res, 2011. **19**(5): p. 436-441.

76. Sionkowska, A., M. Wisniewski, J. Skopinska, and D. Mantovani, *Effects of solar radiation on collagen-based biomaterials*. Int. J. Photoenergy, 2006. **2006**: p. 1-6.
77. Collins, M. N. and C. Birkinshaw, *Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering--a review*. Carbohydr. Polym., 2013. **92**(2): p. 1262-79.
78. Schante, C. E., G. Zuber, C. Herlin, and T. F. Vandamme, *Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications*. Carbohydr. Polym., 2011. **85**(3): p. 469-489.
79. Mojarradi, H., *Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation*. 2011, Uppsala University. p. 1-49.
80. Park, S. -N., J. -C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, and H. Suh, *Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 1205-1212.
81. Zhou, Z. , Z. Yang, T. Huang, L. Liu, Q. Liu, et al., *Characterization of Biocompatible Scaffolds Based on Gelatin and Hyaluronic Acid for Fibroblasts Culture*. Polym. Polym. Compos., 2012. **20**: p. 791-795.
82. Yan, S. -Q, Q Zhang, J. -N. Wang, and M. -Z. Li, *Characterization of Silk Fibroin/Hyaluronic Acid Blend U Films Cross-linked by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*. JFBI, 2010. **3**(2): p. 62-67.
83. Jetbumpenkul, P., P. Amornsudthiwat, S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, *Balanced electrostatic blending approach--an alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold*. Int J Biol Macromol, 2012. **50**(1): p. 7-13.
84. Chen, J., C. Peng, J. Nie, J. F. Kennedy, and G. Ma, *Lyophilization as a novel approach for preparation of water resistant HA fiber membranes by crosslinked with EDC*. Carbohydr. Polym., 2014. **102**: p. 8-11.
85. Hanthamrongwit, M. , R. Wilkinson, C. Osborne, W. H. Reid, and M. H. Grant, *Confocal laser-scanning microscopy for determining the structure of and*

- keratinocyte infiltration through collagen sponges.* J. Biomed. Mater. Res., 1996. **30**: p. 331-339.
86. Collins, M. N. and C. Birkinshaw, *Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications.* J. Appl. Polym. Sci., 2007. **104**(5): p. 3183-3191.
87. Collins, M. N. and C. Birkinshaw, *Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels.* J. Mater. Sci. Mater. Med., 2008. **19**(11): p. 3335-43.
88. Lai, J. -Y., *Relationship between structure and cytocompatibility of divinyl sulfone cross-linked hyaluronic acid.* Carbohydr Polym, 2014. **101**: p. 203-212.
89. Ma, L., C. Gaoa, Z. Maoa, J. Zhoua, J. Shena, et al., *Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineer.* Biomaterials, 2003. **24**: p. 4833-4841.
90. Khor, E., *Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses.* Biomaterials, 1997. **18**(2): p. 95-105.
91. Hayden, R. S., K. P. Quinn, C. A. Alonzo, I. Georgakoudi, and D. L. Kaplan, *Quantitative osteoclast co-culture.* Biomaterials, 2014. **35**: p. 3794-3802.
92. Nayak, S., S. Dey, and SC. Kundu, *Skin equivalent tissue-engineered construct: co-cultured fibroblasts/keratinocytes on 3D matrices of sericin hope cocoons.* PLoS One, 2013. **8**: p. 1-17.
93. โครงสร้างของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู. [Online]. Available from: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Cellules+Nih+3T3&lang=4. (2016 September)
94. Zeltinger, J., J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Mueller, and L. G. Griffith, *Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition.* Tissue eng., 2001. **7**(5): p. 557-572.
95. Watanabe, S., M. Misawa, T. Matsuzaki, T. Sakurai, T. Muramatsu, et al., *A novel glycosylation signal regulates transforming growth factor beta receptors as evidenced by endo-beta-galactosidase C expression in rodent cells.* Glycobiology, 2011. **21**(4): p. 482-492.

96. Chen, M., P. K. Patra, S. B. Warner, and S. Bhowmick, *Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds*. *Tissue Eng.*, 2007. **13**(3): p. 579-87.
97. Miranda, D. G., S. M. Malmonge, D. M. Campos, N. G. Attik, B. Grosogeat, et al., *A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering* *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015: p. 1-11.
98. Bhattarai, S. R., N. Bhattarai, H. K. Yi, P. H. Hwang, D. I. Cha, et al., *Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering*. *Biomaterials*, 2004. **25**(13): p. 2595-2602.
99. Von Recum, A. F., C. E. Shannon, C. E. Cannon, K. J. Long, T. G. Van Kooten, et al., *Surface Roughness, Porosity, and Texture as Modifiers of Cellular Adhesion*. *Tissue Eng.*, 1996. **2**(4): p. 241-253.
100. Gui-Bo, Y., Z. You-Zhu, W. Shu-Dong, S. De-Bing, D. Zhi-Hui, et al., *Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering*. *J Biomed Mater Res A*, 2010. **93**(1): p. 158-63.
101. Moon, B. M., D. -K. Kim, H. J. Park, H. W. Ju, O. J. Lee, et al., *Fabrication and Characterization of Three-Dimensional Silk Fibroin Scaffolds Using a Mixture of Salt/Sucrose*. *Macromol Res*, 2014. **22**(12): p. 1268-1274.
102. Li, X., J. Qin, and J. Ma, *Silk fibroin/poly (vinyl alcohol) blend scaffolds for controlled delivery of curcumin*. *Regen Biomater*, 2015. **2**(2): p. 97-105.
103. Yang, C., X. Wu, Y. Zhao, L. Xu, and S. Wei, *Nanofibrous scaffold prepared by electrospinning of poly(vinyl alcohol)/gelatin aqueous solutions*. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2011. **121**(5): p. 3047-3055.
104. Bubnis, W. A. and C. M. Ofner lii, *The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid*. *Anal. Biochem.*, 1992. **207**(1): p. 129-133.
105. Kang, Y., S. Semones, J. Smith, and M. Frodyma, *Bacillus amyloliquefaciens strain*. 2013, Google Patents.
106. Blix, G., *The determination of hexosamines according to Elson and Morgan*. *Acta Chem. Scand.*, 1948. **2**: p. 467-473.

107. Takahashi, T., M. Ikegami-Kawai, R. Okuda, and K. Suzuki, *A fluorimetric Morgan–Elson assay method for hyaluronidase activity*. *Anal. Biochem.*, 2003. **322**(2): p. 257-263.
108. Gil, E.S., S.H. Park, X. Hu, P. Cebe, and D.L. Kaplan, *Impact of sterilization on the enzymatic degradation and mechanical properties of silk biomaterials*. *Macromol Biosci*, 2014. **14**(2): p. 257-269.
109. Dhosh, A. K. and P. Bandyopadhyay, *Polysaccharide-Protein Interactions and their relevance in food colloids*. 2012: licensee InTech.
110. Malay, O., O. Bayraktar, and A. Batigun, *Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid* *Int. J. Biol. Macromolec.*, 2007. **40**: p. 387-393.
111. Nakajima, N. and Y. Ikada, *Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media* *Bioconjugate Chem.*, 1995. **6**: p. 123-130.
112. Choi, Y. S., S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, M. H. Park, et al., *Studies on Gelatin-Containing Artificial Skin: II. Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin-Hyaluronate Sponge*. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, 1999. **48**: p. 631-639.
113. Wang, T. W. and M. Spector, *Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering*. *Acta Biomater*, 2009. **5**(7): p. 2371-84.
114. Ren, Y. J., Z. Y. Zhou, B. F. Liu, Q. Y. Xu, and F. Z. Cui, *Preparation and characterization of fibroin/hyaluronic acid composite scaffold*. *Int J Biol Macromol*, 2009. **44**(4): p. 372-8.
115. จิตติมา ชำของเกษตร, การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ทำจากไฟโบรอินจากไหมไทยและเจลาติน, คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2550.
116. Wu, Y., *Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment*. *Carbohydr Polym*, 2012. **89**(2): p. 709-12.
117. Tomihata, K. and Y. Ikada, *Crosslinking of Hyaluronic Acid with Glutaraldehyde*. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 1997. **35**: p. 3553-3559.
118. Freddi, G., G. Pessina, and M. Tsukada, *Swelling and dissolution of silk fibroin (Bombyx mori) in N-methyl morpholine N-oxide*. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 1999. **24**: p. 251-263.

119. Nogueira, G. M., A. C. Rodas, C. A. Leite, C. Giles, O. Z. Higa, et al., *Preparation and characterization of ethanol-treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material*. *Bioresour Technol*, 2010. **101**(21): p. 8446-51.
120. Liu, R., J. Ming, H. Zhang, and B. Zuo, *EDC/NHS crosslinked electrospun regenerated tussah silk fibroin nanofiber mats*. *Fibers Polym*, 2012. **13**(5): p. 613-617.
121. Zhao, C., X. Wu, Q. Zhang, S. Yan, and M. Li, *Enzymatic degradation of *Antheraea pernyi* silk fibroin 3D scaffolds and fibers*. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 2011. **48**: p. 249-255.
122. Wongnarat, C. and P. Srihanam, *Degradation behaviors of Thai *Bombyx mori* silk fibroins exposure to protease enzymes*. *Engineering*, 2013. **5**: p. 61-66.
123. Li, M., M. Ogiso, and N. Minoura, *Enzymatic degradation behaviors of porous silk fibroin sheets*. *Biomaterials*, 2003. **24**: p. 357-365.
124. Liu, H., J. Mao, K. Yao, G. Yang, L. Cui, et al., *A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2004. **15**(1): p. 25-40.
125. Klein, E. S., S. S. Asculai, and G. Y. Ben-Ari, *Effects of Hyaluronic Acid on Fibroblast Behavior in Peritoneal Injury*. *J Surg Res*, 1996. **61**: p. 473-476.
126. Greco, R. M., J. A. Iacono, and P. H. Ehrlich, *Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix*. *J. Cell. Physiol.*, 1998. **177**: p. 465-473.
127. Chohen, I. K., R. F. Diegelmann, and M. C. Crossland, *Wound care and wound healing*, ed. 6. 1994, Singapore: Mc Graw-Hill Book Company.
128. Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. *Biomaterials*, 2003. **24**(24): p. 4385-4415.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ค่าศักยภาพของสารละลายและสารละลายผสม

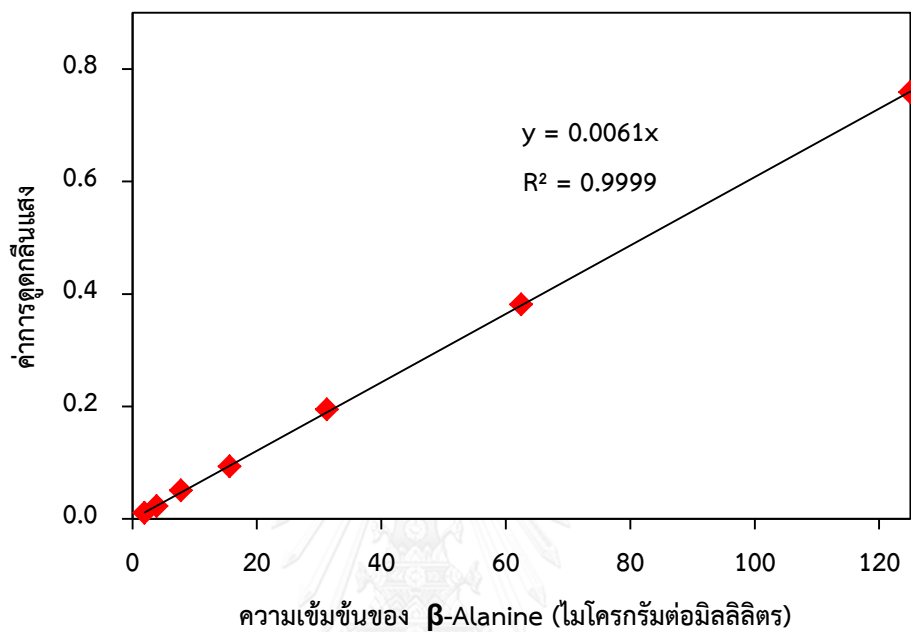
ตารางที่ ก.1 ค่าศักยภาพของสารละลายเฟบรินไทย (SF100) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายเจลาติน (G100) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายกรดไฮยาลูรอนิค ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายผสม SF50G50, SF50G25HA25, และ SF50HA50 โดยมีความเข้มข้นของแข็งรวมเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 9

ตัวอย่าง สารละลาย	ค่าศักยภาพ (มิลลิโวลต์)								
	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9	
SF100	+2.50 ± 0.13	+2.23 ± 0.05	-0.27 ± 0.02	-3.61 ± 0.14	-6.89 ± 0.24	-10.23 ± 0.14	-11.21 ± 0.16	-14.15 ± 0.05	
G100	+18.4 ± 0.46	+20.58 ± 0.52	+17.48 ± 0.18	+12.35 ± 0.31	+6.53 ± 0.24	+4.33 ± 0.12	+3.40 ± 0.10	-3.31 ± 0.08	
HA100	-3.04 ± 0.20	-11.88 ± 0.65	-19.70 ± 1.98	-40.75 ± 3.41	-63.33 ± 14.41	-32.08 ± 5.72	-45.86 ± 1.61	-39.38 ± 0.25	
SF50G50	+5.51 ± 0.73	+11.90 ± 0.51	+17.20 ± 0.69	+9.34 ± 0.21	-3.21 ± 0.17	-5.43 ± 0.29	-7.89 ± 0.16	-10.55 ± 0.44	
SF50G25HA25	+2.11 ± 0.09	-5.04 ± 0.10	-42.10 ± 0.76	-62.53 ± 1.33	-70.68 ± 0.67	-43.25 ± 0.39	-59.03 ± 0.46	-50.25 ± 0.28	
SF50HA50	-1.03 ± 0.01	-17.8 ± 0.42	-53.4 ± 0.51	-70.10 ± 1.70	-76.10 ± 1.00	-59.18 ± 0.16	-63.68 ± 0.58	-46.85 ± 0.31	

ภาคผนวก ข

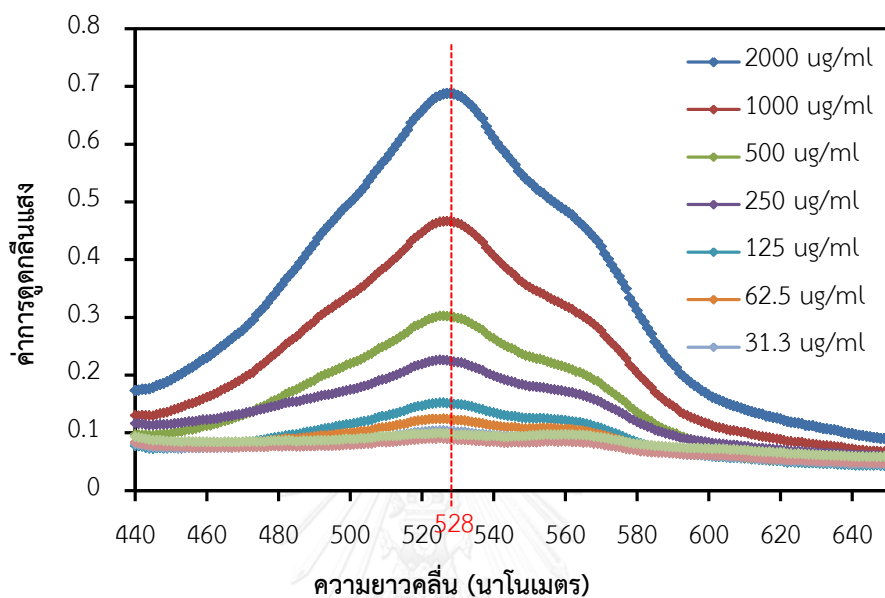
กราฟมาตรฐานของ beta-Alanine

ที่ใช้ในการวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในไฮโดรเจลก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC

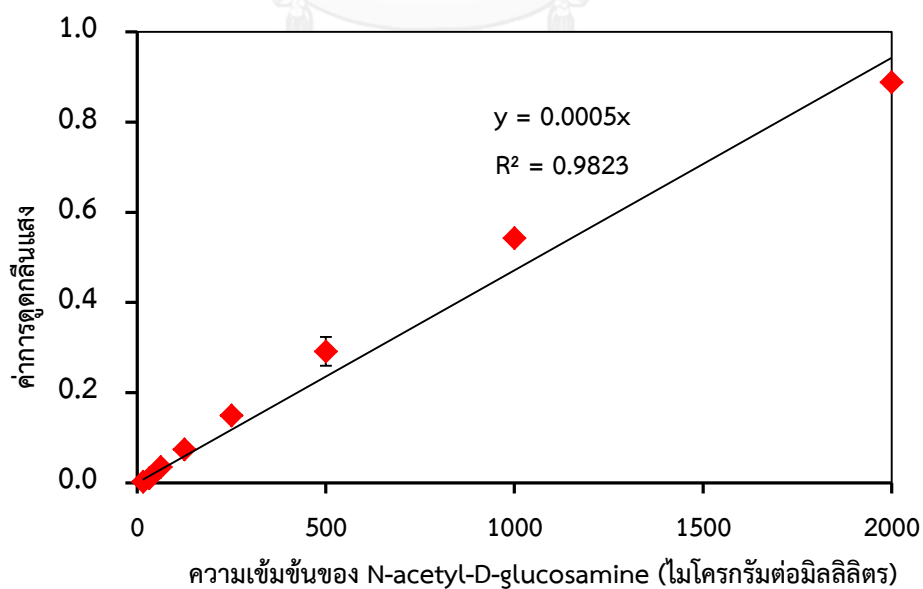


รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -Alanine ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค
 กราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine
 ที่ใช้ในการวัดปริมาณหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ที่คงเหลือในไฮโดรเจลก่อนและหลังการ
 เชื่อมขวางด้วย EDC



รูปที่ ค.1 กราฟสแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดของสารละลาย
 N-acetyl-D-glucosamine



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetyl-D-glucosamine ที่ความยาวคลื่น
 528 นาโนเมตร

ภาคผนวก ง
ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลผสมภายหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC

ตารางที่ ง.1 ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลที่เชื่อมขวางด้วย EDC ภายหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชนิดไฮโดรเจล	ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลภายหลังการแช่ใน PBS ที่เวลาในการแช่ต่าง ๆ								
	30 วินาที	1 นาที	2 นาที	3 นาที	4 นาที	5 นาที	10 นาที	15 นาที	
SF50G50	3171.79±30.35 ^{a,c}	3871.5±42.29 ^{a,c}	3970.99±52.74 ^{a,c}	4014.68±36.21 ^{a,c}	4090.31±52.03 ^{a,c}	4145.64±45.26 ^{a,c}	4241.96±57.61 ^{a,c}	4260.55±41.83 ^{a,c}	
SF50G25HA25	4959.64±89.63 ^{b,d}	5044.43±66.72 ^{b,d}	5092.24±96.08 ^{b,d}	5164.28±88.37 ^{b,d}	5274.17±70.84 ^{b,d}	5276.63±74.52 ^{b,d}	5251.06±65.33 ^{b,d}	5215.44±76.1 ^{b,d}	
SF50HA50	5138.35±192.46 ^{b,d}	5211.92±206.2 ^{b,d}	5252.24±169.22 ^{b,d}	5224.05±194.2 ^{b,d}	5226.74±179.97 ^{b,d}	5242.62±195.9 ^{b,d}	5204.63±206.59 ^{b,d}	5211.45±190.61 ^{b,d}	

(a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล โดยเปรียบเทียบไฮโดรเจลชนิดเดียวกัน ที่เวลาในการแช่ไฮโดรเจลที่ระยะแต่ละแตกต่างกัน)

(c, d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบเวลาในการแช่ไฮโดรเจลเหมือนกัน ที่ไฮโดรเจลต่างชนิดกัน)

ภาคผนวก จ

ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือในไฮโดรเจลหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV
และอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM

ตารางที่ จ.1 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชนิดไฮโดรเจล	ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลาในการแช่ต่าง ๆ				
	1 วัน	3 วัน	7 วัน	10 วัน	14 วัน
SF50G50	44 ± 3.41 ^{a,e}	29.5 ± 0.11 ^{b,e}	19.9 ± 2.02 ^{c,e}	19.9 ± 0.99 ^{c,e}	18.1 ± 2.03 ^{c,e}
SF50G25HA25	96 ± 4.16 ^{a,f}	93 ± 2.67 ^{a,f}	76.1 ± 2.7 ^{b,f}	50 ± 6.46 ^{b,f}	33.5 ± 0.66 ^{c,f}
SF50HA50	97 ± 0.96 ^{a,f}	95 ± 1.02 ^{a,f}	78.6 ± 3.59 ^{b,f}	61.6 ± 6.21 ^{c,f}	45.6 ± 3.78 ^{d,f}

(a, b, c, d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือ โดยเปรียบเทียบไฮโดรเจลชนิดเดียวกัน ที่เวลาในการแช่ไฮโดรเจลที่ระยะแตกต่างกัน)

(e, f, g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือ โดยเปรียบเทียบเวลาในการแช่ไฮโดรเจลเท่ากัน ที่ไฮโดรเจลต่างชนิดกัน)

ตารางที่ จ.2 ร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลที่วางเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

ชนิดไฮโดรเจล	ร้อยละน้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลที่วางเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เวลาในการแช่ต่าง ๆ									
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	7 วัน	10 วัน			
SF50G50	98.68 ± 6.51 ^{a,g}	98.12 ± 7.21 ^{a,g}	97.89 ± 5.89 ^{a,g}	97.18 ± 4.21 ^{a,g}	96.8 ± 4.44 ^{a,g}	95.8 ± 4.3 ^{a,g}	95.4 ± 2.11 ^{a,g}			
SF50G25HA25	98.45 ± 8.13 ^{a,g}	98.6 ± 6.55 ^{a,g}	96.7 ± 7.89 ^{a,g}	97.5 ± 6.34 ^{a,g}	97.34 ± 5.21 ^{a,g}	96.8 ± 3.43 ^{a,g}	95.21 ± 2.78 ^{a,g}			
SF50HA50	98.76 ± 5.34 ^{a,h}	82.36 ± 2.1 ^{b,h}	61.76 ± 4.23 ^{c,h}	48.12 ± 5.95 ^{d,h}	41.15 ± 4.35 ^{d,h}	34.78 ± 5.11 ^{e,h}	25.31 ± 3.56 ^{f,h}			

(a, b, c, d, e, f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละน้ำหนักแห้งเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบไฮโดรเจลชนิดเดียวกัน ที่เวลาในการแช่ไฮโดรเจลที่ระยะแตกต่างกัน)

(g, h แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละน้ำหนักแห้งเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบเวลาในการแช่ไฮโดรเจลเท่ากัน ที่ไฮโดรเจลต่างชนิดกัน)

ภาคผนวก ฉ

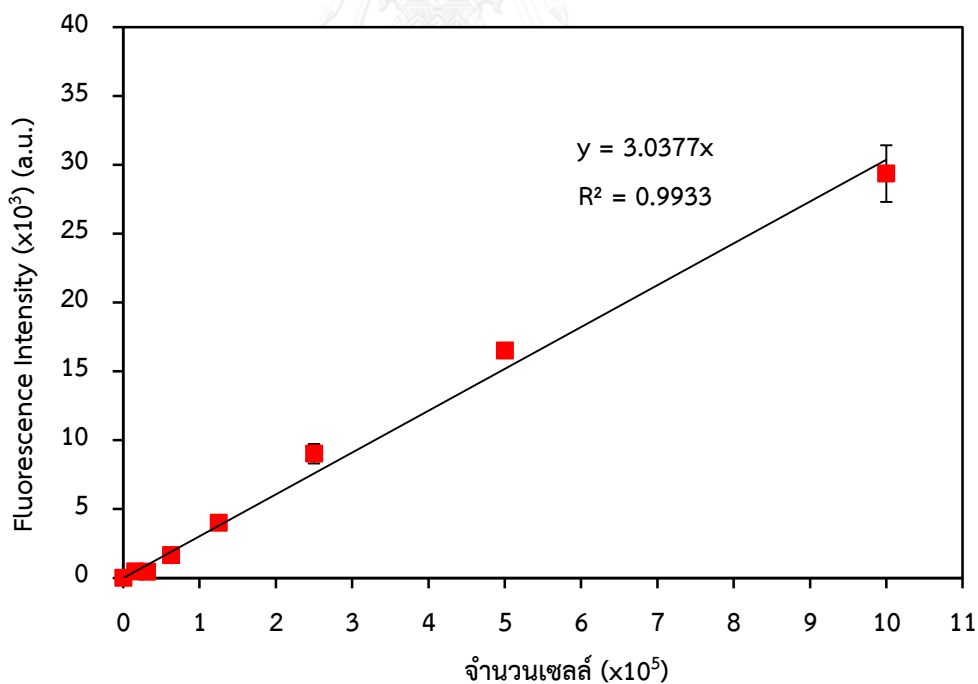
จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (mouse embryonic fibroblast cell line, NIH/3T3)

ขั้นตอนการทดลอง

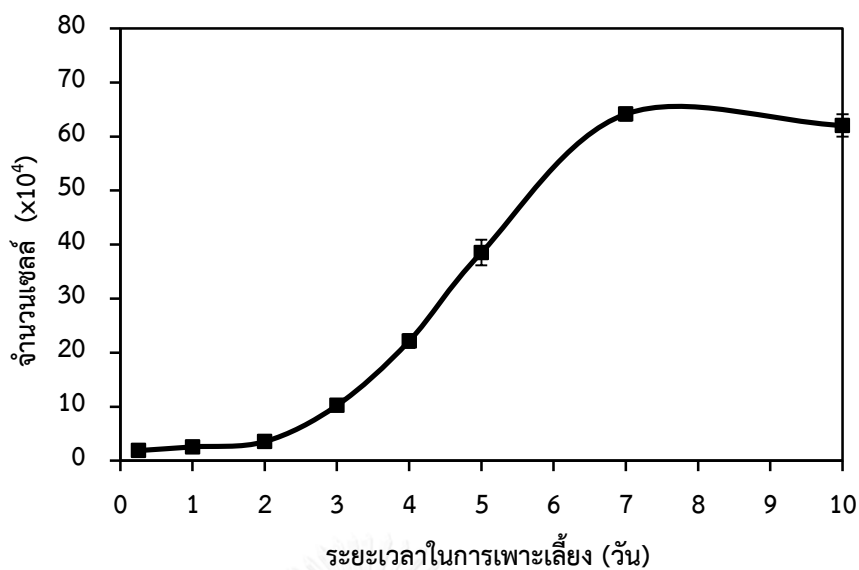
1. เพาะเลี้ยงเซลล์ NIH/3T3 ในจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีน 24 หลุม (24 well-plate) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (20,000 เซลล์ต่อหลุม) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อที่สภาวะความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน

2. ตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์ NIH/3T3 ด้วยวิธี DNA assay ที่ความยาวคลื่น 355 และ 460 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ NIH/3T3



รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ NIH/3T3



รูปที่ ๑.๒ กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NIH/3T3

ตัวอย่างการคำนวณ

1. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ)

คำนวณจาก Log phase (Exponential) ดังสมการต่อไปนี้

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad \dots (๑.๑)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dX \quad \dots (๑.๒)$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1 \quad \dots (๑.๓)$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)} \quad \dots (๑.๔)$$

โดย X_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

X_2 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

จากรูปที่ ๑.๒ คำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในวันที่ 3 ถึง 5 ของการเพาะเลี้ยง

จำนวนเซลล์ วันที่ 3 เท่ากับ 10.23×10^4 เซลล์

จำนวนเซลล์ วันที่ 5 เท่ากับ 38.51×10^4 เซลล์

$$\text{จากสมการ (จ.4)} \quad \mu = \frac{\ln(38.51 \times 10^4) - \ln(10.23 \times 10^4)}{(120 - 72)}$$

$$\mu = 4.35 \times 10^{-3}$$

ดังนั้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 4.35×10^{-3} ต่อชั่วโมง

2. เวลาในการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time; PDT)

$$\begin{aligned} \text{PDT} &= \frac{\ln 2}{\mu} \quad \dots \text{(จ.5)} \\ &= \frac{\ln 2}{4.35 \times 10^{-3}} \\ &= 17.23 \end{aligned}$$

ดังนั้น เวลาในการที่เซลล์แบ่งตัวเท่ากับ 17.23 ชั่วโมง

3. ร้อยละการยืดเกาะ

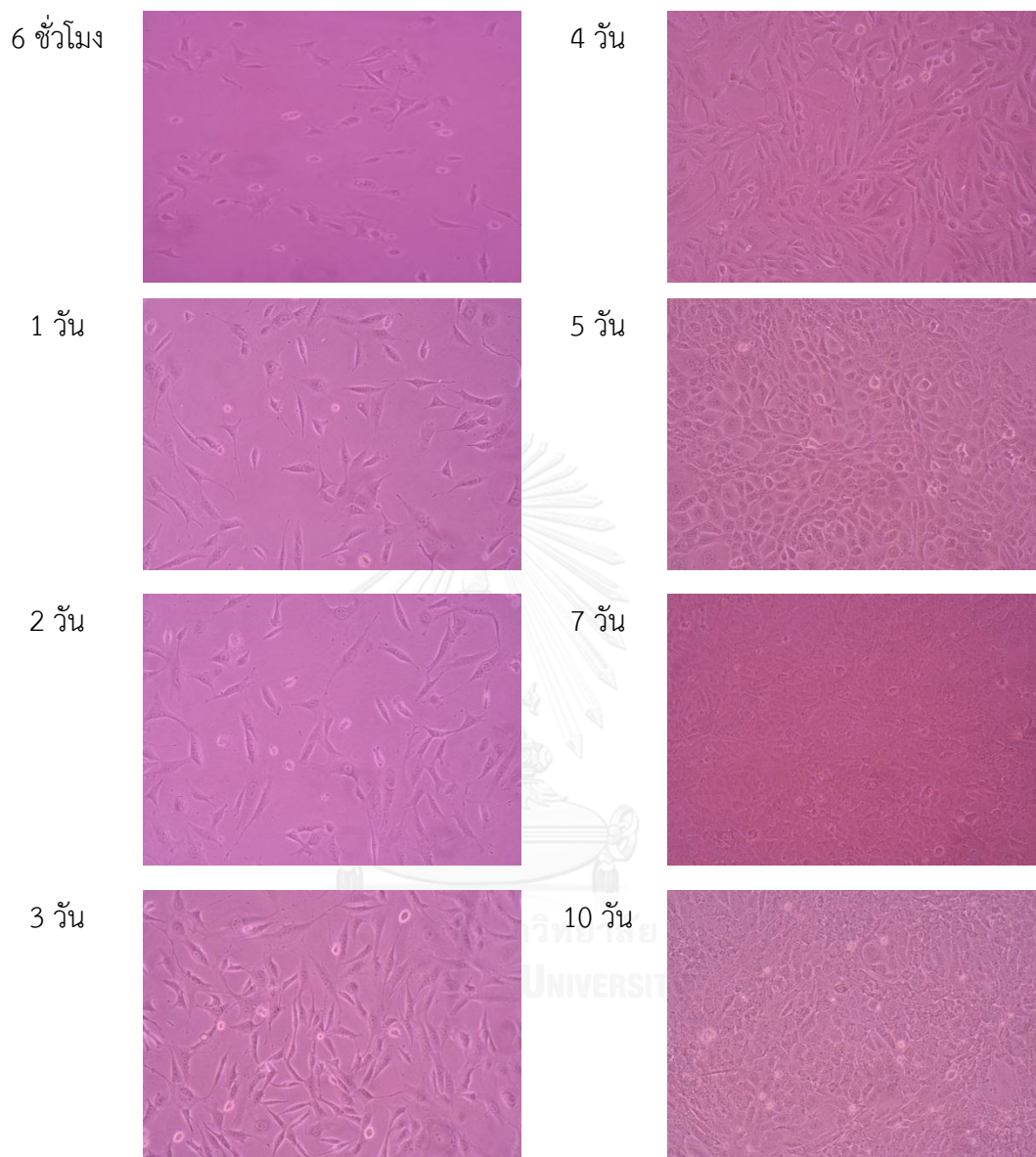
$$\text{ร้อยละการยืดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ยืดเกาะที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}} \times 100 \quad \dots \text{(จ.6)}$$

เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์เริ่มต้น 20,000 เซลล์ต่อ 1.9 ตารางเซนติเมตร และจำนวนเซลล์ที่เวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ 1.88×10^4 เซลล์ต่อ 1.9 ตารางเซนติเมตร

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละการยืดเกาะ} &= \frac{1.88 \times 10^4 \times 100}{20,000} \\ &= 93.86 \end{aligned}$$

ดังนั้น ร้อยละการยืดเกาะของเซลล์เท่ากับ 94

ลักษณะรูปร่างของเซลล์ NIH/3T3 ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีน

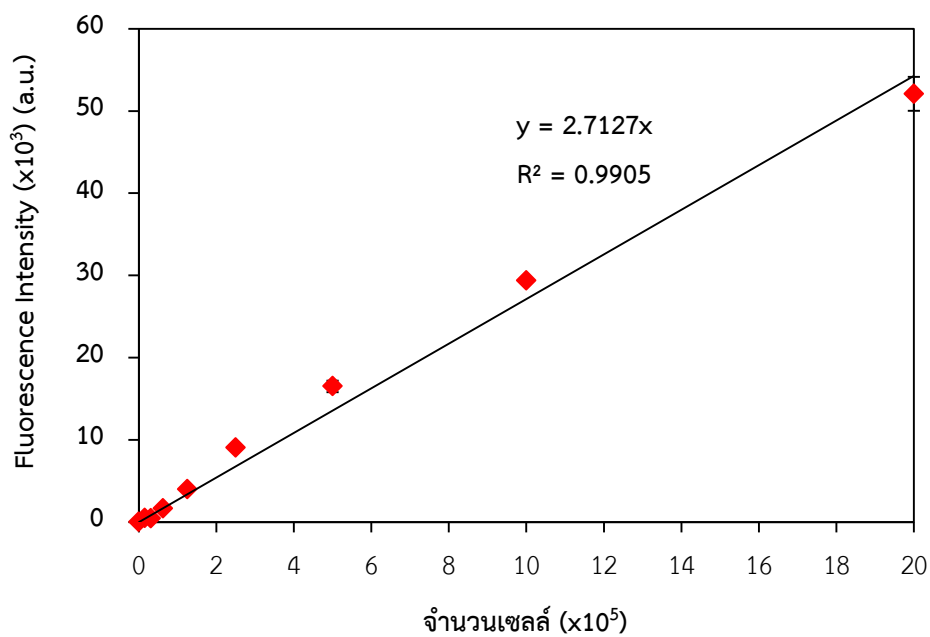


รูปที่ ๓.3 รูปร่างของเซลล์ NIH/3T3 หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ภาคผนวก ข

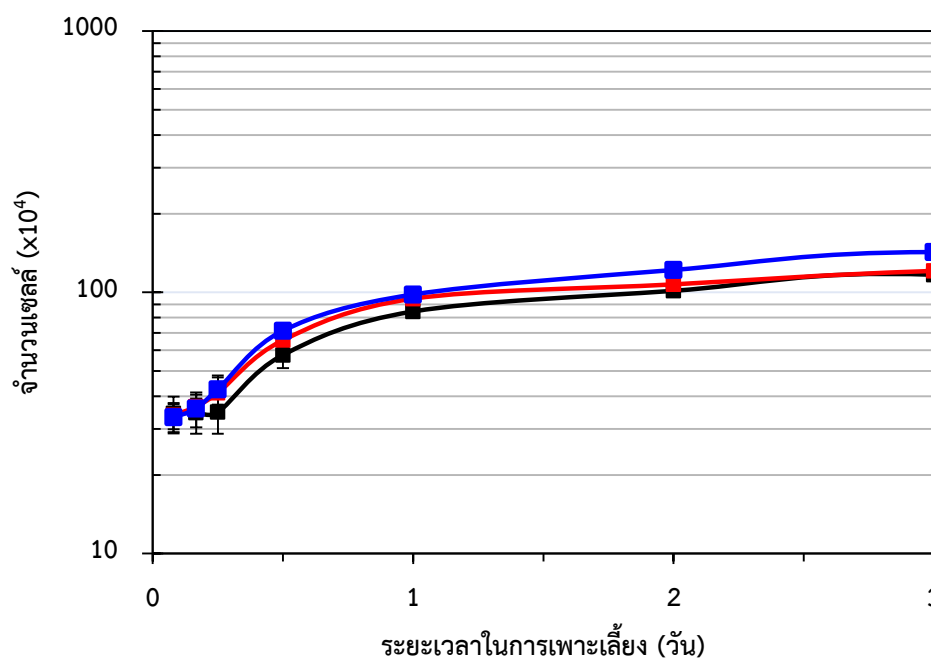
การเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของตัวอ่อนหนู (NIH/3T3) ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SFGHA

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ NIH/3T3



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ NIH/3T3 วัดโดยวิธี DNA

การเจริญเติบโตของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม



รูปที่ ข.2 จำนวนเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (—■—) SF50G50, (—■—) SF50G25HA25, และ (—■—) SF50HA50

ตัวอย่างการคำนวณ

1. ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนไฮโดรเจลทั้งสามชนิดที่เวลา 2, 4, และ 6 ชั่วโมง คำนวณได้ดังสมการ (ฉ.6) และสรุปได้ดังตารางที่ ข.1

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่ระยะเวลา (2, 4, และ 6 ชั่วโมง)}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น (5} \times 10^5 \text{ เซลล์)}} \times 100$$

ตารางที่ ข.1 ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ NIH/3T3 บนไฮโดรเจลผสม

ชนิดไฮโดรเจล	ร้อยละการยึดเกาะ		
	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
SF50G50	73.87 ± 6.87 ^{a,c}	73.18 ± 11.05 ^{a,c}	74.18 ± 10.01 ^{a,c}
SF50G25HA25	71.64 ± 3.06 ^{a,c}	75.79 ± 2.39 ^{a,c}	87.68 ± 8.58 ^{a,d}
SF50HA50	70.72 ± 2.15 ^{a,c}	76.74 ± 6.98 ^{a,c}	90.36 ± 5.78 ^{b,e}

(a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบไฮโดรเจลแต่ละชนิด ที่เวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากัน)

(c, d, e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบเวลาในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ที่ไฮโดรเจลชนิดเดียวกัน)

2. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

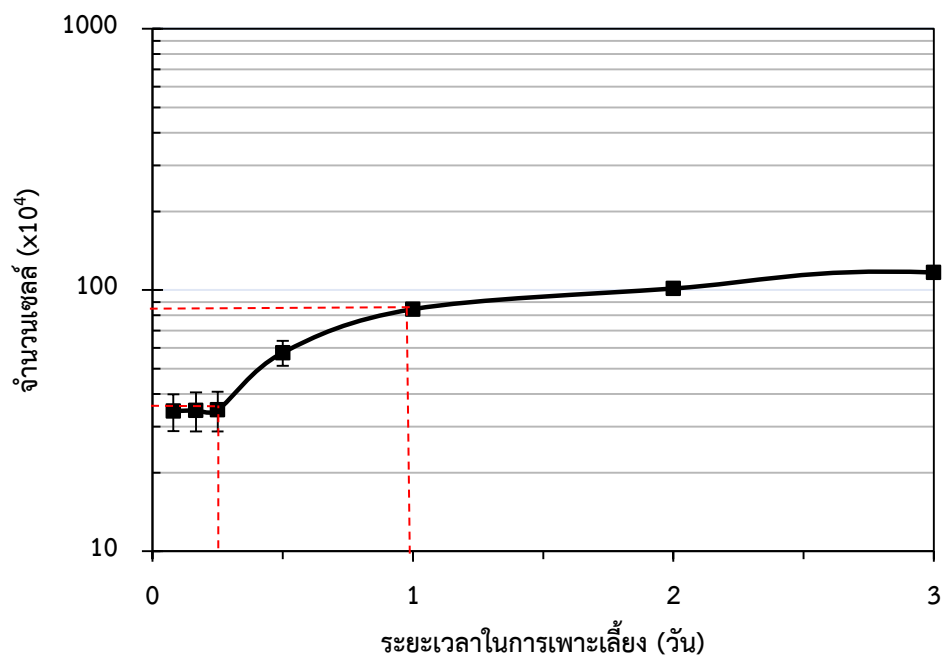
คำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50G50 ในช่วง 6 ถึง 24 ชม.

จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง 6 ชม. เท่ากับ 0.32×10^6 เซลล์

จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชม. เท่ากับ 0.85×10^6 เซลล์

$$\text{จากสมการ (ฉ.4)} \quad \mu = \frac{\ln(0.85 \times 10^6) - \ln(0.32 \times 10^6)}{(24 - 6)}$$

$$\mu = 0.055$$



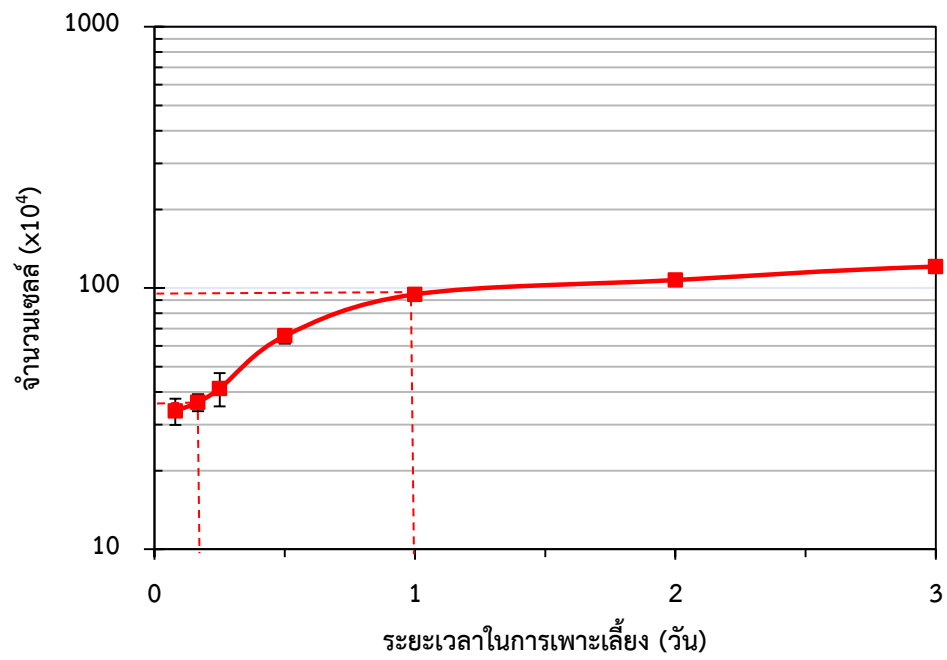
คำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25 ในช่วง 4 ถึง 24 ชม.

จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง 4 ชม. เท่ากับ 0.34×10^6 เซลล์

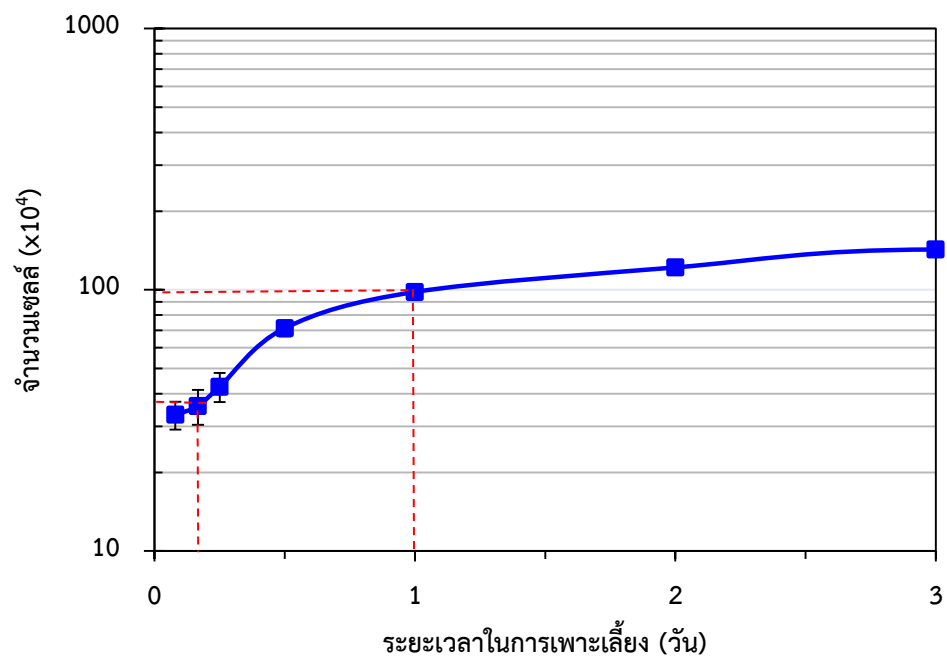
จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชม. เท่ากับ 0.95×10^6 เซลล์

$$\text{จากสมการ (ฉ.4)} \quad \mu = \frac{\ln(0.95 \times 10^6) - \ln(0.34 \times 10^6)}{(24-4)}$$

$$\mu = 0.050$$



คำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลผสม SF50HA50 ในช่วง 4 ถึง 24 ชม.



จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง 4 ชม. เท่ากับ 0.34×10^6 เซลล์

จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชม. เท่ากับ 0.97×10^6 เซลล์

$$\text{จากสมการ (ฉ.4)} \quad \mu = \frac{\ln(0.97 \times 10^6) - \ln(0.34 \times 10^6)}{(24 - 4)}$$

$$\mu = 0.054$$

3. เวลาในการแบ่งตัวทวิคูณ

สำหรับไฮโดรเจลผสม SF50G50

$$\begin{aligned} \text{PDT} &= \frac{\ln 2}{\mu} \\ &= \frac{\ln 2}{0.055} \\ &= 12.88 \end{aligned}$$

ไฮโดรเจลผสม SF50G25HA25

$$\begin{aligned} \text{PDT} &= \frac{\ln 2}{\mu} \\ &= \frac{\ln 2}{0.050} \\ &= 13.97 \end{aligned}$$

ไฮโดรเจลผสม SF50HA50

$$\begin{aligned} \text{PDT} &= \frac{\ln 2}{\mu} \\ &= \frac{\ln 2}{0.054} \\ &= 12.85 \end{aligned}$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอนงค์นาฏ ดวงภักดี เกิดเมื่อวันที่ 21 กรกฎาคม พ.ศ. 2532 ภูมิลำเนาจังหวัดอุดรธานี เข้าศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนปทุมเทพวิทยาคาร จังหวัดหนองคาย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556

ผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Duangpakdee, A., Damrongsakkul, S., Preparation of Thai Silk Fibroin/Gelatin/ Hyaluronic Acid Hydrogels Using Carbodiimide Crosslinking, The International Polymer Conference of Thailand (PCT-6), The Pathumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand, June 30- July 1, 2016.