

การตัดแปลงโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท



นางสาวฟ้าใส วิวัฒน์วงศ์วนา

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

MODIFICATION OF GELATIN SCAFFOLD WITH COLLAGEN HYDROLYSATE



Ms.Fasai Wiwatwongwana

สถาบันวิทยบริการ

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

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

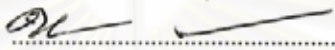
Chulalongkorn University

Academic Year 2006

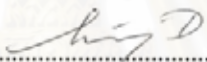
ISBN 974-xx-xxxx-x

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดัดแปลงโครงสร้างเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท
โดย	นางสาวฟ้าใส วิวัฒน์วงศ์วนา
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. โสรดา กนกพานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทญ. ดร. ปิยะมาศ สำเร็จกาญจนกิจ

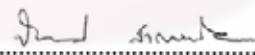
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

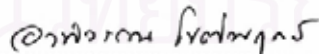

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร คำรงค์ศักดิ์กุล)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. โสรดา กนกพานนท์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทญ. ดร.ปิยะมาศ สำเร็จกาญจนกิจ)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาทิตย์วรรณ โชติพิฤกษ์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ ริมคูสิต)

ฟ้าใส วัฒนวงศ์วนา: การดัดแปลงโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (MODIFICATION OF GELATIN SCAFFOLD WITH COLLAGEN HYDROLYSATE). อ. ที่ปรึกษา: อ. ดร. โสธดา กนกพานนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ทญ. ดร. ปิยะมาศ สำเร็จกาญจนกิจ, 118 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของการปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังด้วยวิธีการผสมและวิธีการดัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซตปริมาณต่างๆ โดยมีการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการใช้ความร้อน (DHT) และสารเคมี (dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide; EDC/NHS) จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมี และทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ต่างกัน โครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบมีรูพรุนต่อเนื่องอย่างสม่ำเสมอและมีขนาดเฉลี่ยที่ 70-200 ไมครอน ค่ามุมสัมผัสน้ำและอุณหภูมิจึงในการเชื่อมสภาพมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซต ค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกปรับปรุงได้โดยใช้สารเคมี EDC/NHS ในการเชื่อมโยงพันธะ การย่อยสลายในสภาพภายนอกร่างกายโดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซต การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 mouse fibroblasts บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกปรับปรุงไม่มีความแตกต่างกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่ไม่ถูกปรับปรุง ดังนั้นการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์จึงไม่ส่งเสริมการเข้ากันได้กับเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตและเชื่อมโยงพันธะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยที่การเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC/NHS สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ แผ่นฟิล์มเจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในโครงเลี้ยงเซลล์ดัดแปลงแบบ 3 มิติ

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต..... ฟ้าใส วัฒนวงศ์วนา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... โสธดา กนกพานนท์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ปิยะมาศ สำเร็จกาญจนกิจ

4770396821: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: GELATIN/ COLLAGEN HYDROLYSATE/ COLLAGEN/ SCAFFOLD/ L929 MOUSE FIBROBLAST

FASAI WIWATWONGWANA: MODIFICATION OF GELATIN SCAFFOLD WITH COLLAGEN HYDROLYSATE. THESIS ADVISOR: SORADA KANOKPANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASST. PROF. PIYAMAS SUMREJKANCHANAKIJ, Ph.D., 118 pp.

Modification of gelatin scaffold for skin tissue engineering were studied by blending or surface crosslinking with various amounts of collagen hydrolysate (CH). The crosslinking techniques, such as dehydrothermal crosslinking (DHT) and chemical crosslinking (dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide; EDC/NHS) were used. Physical, mechanical, chemical and biological properties of scaffolds with different CH contents were studied. All scaffolds had interconnected pore structures with average pore sizes of 70-200 μm . Adding CH decreased water contact angle and degradation temperature of scaffolds. Compressive modulus of scaffolds could be improved by using EDC/NHS as a crosslinking agent. The *in vitro* biodegradation in collagenase solution increased as the CH contents increased. The attachment and proliferation of L929 mouse fibroblasts on all modified scaffolds were similar to those of the unmodified gelatin scaffolds. These results implied that adding CH was not benefit cell compatibility to gelatin scaffolds. However, the different scaffold preparation methods affected cell proliferation. Scaffolds crosslinked using EDC/NHS promoted *in vitro* cell proliferation. The gelatin films with surface modification with collagen could significantly improved L929 mouse fibroblasts proliferation. However, these enhance effects were not found in the 3-D scaffolds of the same materials.

Department Chemical Engineering
Field of study Chemical Engineering
Academic year 2006

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ดร.โสธรา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, ผศ. ทญ. ดร.ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ รศ.ดร. ศิริพร คำรงค์ศักดิ์กุล เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัยได้อย่างถูกต้อง

ขอขอบคุณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์และห้องปฏิบัติการเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี Mektec ในการแนะนำให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณมากๆ สำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการและวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 หนังเทียม (artificial dermis).....	5
2.2 คอลลาเจน	8
2.3 คอลลาเจนไฮโดรไลเสท (collagen hydrolysate)	14
2.4 เจลาติน (gelatin).....	16
2.5 โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold).....	18
2.5.1 ความพรุนและขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์	19
2.5.2 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์	19
2.5.3 สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์	21
2.5.4 ความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์	22
2.5.5 ลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์	24
3. อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.2 วัสดุดิบและสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	34

	หน้า
3.3 วิธีการทดลอง.....	36
3.3.1 การขึ้นรูปโครมเลียงเซลล์.....	36
3.3.1.1 วิธีการขึ้นรูปโครมเลียงเซลล์แบบผสม.....	36
3.3.1.2 วิธีการขึ้นรูปโครมเลียงเซลล์เจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท.....	37
3.3.1.3 วิธีการขึ้นรูปโครมเลียงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS.....	38
3.3.1.4 วิธีการขึ้นรูปโครมเลียงเซลล์เจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจน.....	39
3.3.1.5 วิธีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มสูตรเดียวกับโครมเลียงเซลล์บนกระจกปิดแผ่นสไลด์ (cover glass slip) เพื่อทดสอบผลของวัสดุต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ.....	39
3.3.1.6 วิธีการขึ้นรูปฟิล์มบนกระจกสไลด์ (glass slide) เพื่อทดสอบมุมสัมผัสน้ำ.....	41
3.3.2 ทดสอบลักษณะสมบัติของโครมเลียงเซลล์.....	43
3.3.2.1 ทดสอบลักษณะสมบัติทางกายภาพ.....	43
3.3.2.2 ทดสอบลักษณะสมบัติทางกล.....	44
3.3.2.3 ทดสอบลักษณะสมบัติทางเคมี.....	44
3.3.2.4 ทดสอบลักษณะสมบัติทางชีววิทยา.....	45
3.3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	46
4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	47
4.1 โครมเลียงเซลล์แบบผสม (blend).....	48
4.1.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล.....	48
4.1.2 สมบัติทางเคมี.....	56
4.1.3 สมบัติทางชีววิทยา.....	58
4.2 โครมเลียงเซลล์เจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท.....	64
4.2.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล.....	64
4.2.2 สมบัติทางเคมี.....	69

	หน้า
4.2.3 สมบัติทางชีววิทยา.....	70
4.3 โครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS.....	77
4.3.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล.....	77
4.3.2 สมบัติทางเคมี.....	82
4.3.3 สมบัติทางชีววิทยา.....	83
4.4 โครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจน	89
4.4.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล.....	89
4.4.2 สมบัติทางเคมี.....	94
4.4.3 สมบัติทางชีววิทยา.....	94
4.5 ผลของการเปรียบเทียบกระบวนการขึ้นรูปและการเชื่อมโยงพันธะ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน	98
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	101
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	101
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	102
รายการอ้างอิง.....	103
ภาคผนวก.....	109
ภาคผนวก ก.....	109
ก.1 เทคนิคการเลี้ยงเซลล์	109
ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT	110
ภาคผนวก ข	112
ข.1 การหาค่าการดูดน้ำ	112
ข.2 การหาค่าอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ (T_d)	112
ข.3 การหาค่าความทนทานต่อแรงกด.....	114
ข.4 การหาร้อยละการเชื่อมโยงพันธะ.....	115
ข.5 การหาค่ามุมสัมผัสน้ำ.....	115
ข.6 การหาค่าการย่อยสลายในสภาพภายนอกร่างกาย.....	117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	118

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 แสดงหนังเทียบชนิดต่างๆ ที่มีวางจำหน่ายในต่างประเทศ.....	7
2.2 ส่วนประกอบของคอลลาเจนชนิดต่างๆ.....	12
2.3 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในคอลลาเจนจากหนังปลาและเจลาตินจากหนังหมู.....	13
2.4 ตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของเจลาติน.....	25
3.1 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามสัดส่วนต่างๆ ของเจลาติน/คอลลาเจนไฮโดรไลเสท (ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก)	37
3.2 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท	38
3.3 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท	38
3.4 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจน	39
3.5 การเชื่อมโยงพันธะของแผ่นฟิล์มด้วยวิธีการต่างๆ.....	41
3.6 การเชื่อมโยงพันธะของแผ่นฟิล์มด้วยวิธีการต่างๆ.....	42
4.1 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของ โครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade และคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ.....	50
4.2 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของ โครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินแบบ food grade และคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ	51
4.3 อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม	55
4.4 ค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวของฟิล์มบางแบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจน ไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ.....	58
4.5 ค่าครึ่งชีวิต (half life) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน:คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ	60
4.6 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้น ต่างๆ.....	66
4.7 อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดย ใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	69

ตาราง

4.8	ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มเจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ	70
4.9	ครึ่งชีวิต (haft life) ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	72
4.10	เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS และใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ.....	79
4.11	อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ.....	82
4.12	ค่ามุมสัมผัสของน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทในปริมาณต่างๆ.....	83
4.13	ครึ่งชีวิต (haft life) ของโครงเลี้ยงแบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ.....	84
4.14	เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ.....	91
4.15	อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ	93
4.16	ค่ามุมสัมผัสของน้ำของแผ่นฟิล์มแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ.....	94
4.17	น้ำหนัก ร้อยละการหดตัว การดูดน้ำ ค่าความทนทานต่อแรงกด อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพและค่ามุมสัมผัสน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่เชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างกัน.....	99

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	8
2.2 โครงสร้างแบบ triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	9
2.3 กระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1	11
2.4 ขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin.....	17
2.5 โครงสร้างของเจลาติน.....	18
2.6 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจน กับ EDC และ NHS	20
2.7 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจน กับ glutaraldehyde.....	21
2.8 การวัดค่ามุมสัมผัสน้ำแบบ sessile drop	24
3.1 แผนผังแสดงการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด	32
3.2 แผนการทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	33
4.1 ผังการทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ.....	47
4.2 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ โดยคำนวณให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	49
4.3 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ	50
4.4 การดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ.....	52
4.5 ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์แห้งแบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ.....	54
4.6 ตัวอย่างกราฟการวิเคราะห์อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 และ G64 ที่เตรียมโดยวิธีการขึ้นรูปแบบผสมโดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง Thermogravimetric/ Differential Analyzer (TG/DTA).....	55
4.7 ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท)ต่างๆ.....	57

4.8 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเซส) ต่างๆ ในสารละลายคอลลาจีเนส (0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร).....	59
4.9 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)	61
4.10 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100 และ G82 หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์).....	62
4.11 ภาพถ่ายเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่อัตราส่วน 100:0 (G100), 90:10(G91) และ 80:20(G82) หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน	63
4.12 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	65
4.13 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	66
4.14 การดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ	67
4.15 ความทนทานต่อแรงกด (compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	68
4.16 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายคอลลาจีเนส (0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร).....	71
4.17 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์).....	73
4.18 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100* และ 2CH โดยน้ำหนัก ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)	74

ภาพประกอบ	หน้า
4.19 ตำแหน่งที่มีการถ่ายภาพเซลล์ใน โครงเลี้ยงเซลล์.....	75
4.20 เซลล์ L929 ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วย คอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	75
4.21 เซลล์ L929 ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วย คอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	76
4.22 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลง พื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ.....	78
4.23 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้ คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ.....	79
4.24 การดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้ คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ	80
4.25 ความทนทานต่อแรงกด (compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลง พื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ	81
4.26 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงแบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้ คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายคอลลาจีเนส (0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร)	84
4.27 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงแบบดัดแปลง พื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์).....	85
4.28 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100*-EDC และ 2CH-EDC ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/ โครงเลี้ยงเซลล์).....	86
4.29 เซลล์ในโครงเลี้ยงแบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจน ไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ลักษณะการตัดโครงเลี้ยงเซลล์อธิบายในรูป 4.19).....	87
4.30 เซลล์ในโครงเลี้ยงแบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจน ไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	88
4.31 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลง พื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ.....	90

ภาพประกอบ	หน้า
4.32 ขนาดรูปทรงของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจน ความเข้มข้นต่างๆ.....	90
4.33 การคูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจน ความเข้มข้นต่างๆ.....	92
4.34 ค่าความทนทานต่อแรงกด (compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบ ดัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ	93
4.35 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลง พื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 2 และ 7 วัน	95
4.36 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100* และ 0.2C ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)	96
4.37 รูปเซลล์ (เซลล์ L929) ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อน โดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน	97
4.38 รูปเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนโดยใช้คอลลาเจน ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน	98
4.39 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 (4.1), G100*(4.2) และ G100*-EDC (4.3).....	100

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันมีผู้ป่วยจำนวนมากที่สูญเสียเนื้อเยื่อผิวหนัง อันเกิดจากการทำลายจากเชื้อโรคหรือได้รับอุบัติเหตุ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องใช้ผิวหนังจากส่วนอื่นมาปลูกถ่ายเพื่อสมานแผลที่เกิดจากการทำลายนั้น และผิวหนังที่นำมาปลูกถ่ายหาได้ยากเพราะมักต้องเป็นผิวหนังของตนเอง ซึ่งมาจากส่วนอื่นของร่างกาย งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังจึงได้คิดค้นผลิตวัสดุทดแทนผิวหนังเพื่อใช้ในการฟื้นฟูรักษาบาดแผลและพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังดังกล่าว

โดยธรรมชาติแล้วผิวหนังของมนุษย์แบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ซึ่งสามารถป้องกันอันตรายจากภายนอกและช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากร่างกาย เมื่อผิวหนังชั้นนี้ถูกทำลายจะสามารถงอกกลับได้ด้วยตนเอง (regeneration) และ ชั้นหนังแท้ (dermis) ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ เส้นเลือดที่นำสารอาหารต่างๆ มาเลี้ยงเซลล์ที่ผิวหนัง เส้นประสาท แผลงกำเนิดของเส้นผมต่อมเหงื่อ หากผิวหนังชั้นนี้ถูกทำลายไปจะไม่สามารถงอกกลับได้ด้วยตนเอง (non-regeneration) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการผลิตและพัฒนาวัสดุทดแทนผิวหนังขึ้นในรูปแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับลักษณะการใช้งาน [Jones, I. และคณะ, 2002]

วัสดุที่นำไปปลูกถ่ายบนผิวหนังต้องมีความสามารถในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ของเซลล์ผิวหนังแท้ (fibroblast) โดยวัสดุที่ใช้ควรตอบสนองและเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อบริเวณนั้น (biocompatibility) ร่างกายสามารถทำลายหรือเกิดกระบวนการย่อยสลายพอเหมาะกับการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อโดยไม่เกิดอันตราย อีกทั้งมีอายุการใช้งานนานพอที่จะทำให้ชีวโมเลกุลต่างๆ ที่ร่วมอยู่กันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ คุณสมบัติดังกล่าวมักพบอยู่ในพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด หนึ่งในพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากธรรมชาติที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในขบวนการสมานแผล คือ คอลลาเจน (collagen)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนมากกว่า 1000 โมเลกุล และมีกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันคือ Arg-Gly-Asp (RGD) เป็น cell surface binding domain ซึ่งเป็นพื้นที่ในการชักนำให้เซลล์มายึดเกาะและคอลลาเจนยังมีสมบัติการเข้ากันกับร่างกายได้ดี และให้ความปลอดภัยกับร่างกายที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์จากธรรมชาติชนิดอื่น คอลลาเจนได้ถูกใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ตามธรรมชาติที่มีผลผลิตเพื่อจำหน่ายแล้วในรูปแบบต่างๆ ขึ้นกับประโยชน์ของการใช้งาน ทั้งนี้ความแข็งแรงของโครงสร้างและการย่อยสลายทางชีวภาพขึ้นอยู่กับ การเชื่อมโยงพันธะ แต่มีปัญหาบางประการในการนำคอลลาเจนมาใช้งาน เช่น มีราคาแพง วัตถุดิบเก็บรักษาได้ยาก มีอายุการใช้งานสั้น มีรายงานการติดเชื้อในคนไข้ และมีสมบัติทางกลที่ไม่แข็งแรงคือมีการหดตัว (contraction) [Lee, CH. และคณะ, 2001]

เนื่องจากปัญหาดังกล่าวข้างต้นจึงได้มีการพัฒนาการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นเองภายในประเทศ โดยมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นเจลาติน (gelatin) ซึ่งเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก เจลาตินเป็นโปรตีนที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สกัดได้จากคอลลาเจนโดยขบวนการต่างๆ และได้รับการยอมรับว่าเป็นสารอาหารปลอดภัยและปราศจากสารพิษ [Tabata, Y. และคณะ, 1998] และได้มีการทดลองการเลี้ยงเซลล์ fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ในชั้นหนังแท้ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความเข้ากันกับเซลล์ได้ดี [Lee, SB. 2003]

คอลลาเจนไฮโดรไลเสท (collagen hydrolysate, CH) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากคอลลาเจนโดยขบวนการ hydrolysis ซึ่งใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส ทำให้มีราคาต่ำกว่าคอลลาเจน ปัจจุบันมีการนำคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมฟอกหนังหรืออุตสาหกรรมอาหารทะเลสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์หรือปุ๋ย หรือเป็นวัตถุดิบสำหรับสินค้าโปรตีนต่างๆ และยังมีการใช้ในทางการแพทย์โดยใช้ เป็นยาเกี่ยวกับโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) ของเข่าและสะโพก และโรคกระดูกพรุน [Moskowitz, RW. 2000] ดังนั้นการใช้เจลาตินและ คอลลาเจนไฮโดรไลเสทเพื่อผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์จึงจะทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ได้และเนื่องจากการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสทในประเทศเพื่องานด้านอาหารเสริม และเครื่องสำอางอยู่แล้ว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของสารทั้งสองชนิดนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังโดยใช้เจลาตินเป็นวัสดุหลักและใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทเป็นวัสดุรอง เพื่อความเหมาะสมในการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง โดยศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมี และทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่มีส่วนประกอบของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทด้วย วิธีการผสม (blend) และดัดแปลงพื้นผิว (surface modification)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ต้นแบบโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทเพื่อใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการผลิตผิวหนังเทียม (artificial dermis) ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ
2. เพิ่มมูลค่าและประโยชน์ของ คอลลาเจนไฮโดรไลเสทและเจลาติน
3. ทดแทนโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อชนิดอื่นๆ ที่จำเป็นต้องใช้คอลลาเจน

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยวิธีผสม (blend) และวิธีดัดแปลงพื้นผิว (surface modification) วิธีการผสมมีตัวแปรที่ศึกษาคือ อัตราส่วนเจลาตินต่อคอลลาเจนไฮโดรไลเสทและวิธีการดัดแปลงพื้นผิวมีตัวแปรที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ความเข้มข้นของคอลลาเจน และวิธีการเชื่อมโยงพันธะ
2. ศึกษาลักษณะสมบัติในด้านต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้น ทางกายภาพ ทางกล และทางเคมี ได้แก่ ลักษณะพื้นผิวโดยรวม ขนาดของรูพรุน การดูดน้ำอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ ความทนทานต่อแรงกด ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะ และค่ามุมสัมผัสน้ำ
3. ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ การย่อยสลายทางชีววิทยา (biodegradability) และความสามารถในการเข้ากันได้ของเซลล์กับโครงเลี้ยงเซลล์

(biocompatibility) โดยประเมินการยึดติดของเซลล์ (cell adhesion) และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation)

4. เสนอแนวทางพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินและ คอลลาเจนไฮโดรไลเสท



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หนังเทียม (artificial dermis)

บาดแผลที่ทำลายผิวหนังชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้ ซึ่งชั้นหนังกำพร้าเป็นชั้นที่สามารถงอกกลับได้ด้วยตนเอง ส่วนชั้นหนังแท้เป็นชั้นที่ไม่สามารถงอกกลับคืนได้ด้วยตนเอง หากบาดแผลที่เกิดโดยอุบัติเหตุหรือเชื้อโรค ได้ทำลายผิวหนังชั้นหนังแท้ ทำให้ต้องหาผิวหนังอื่นมาทดแทนเพื่อปิดรอยแผลที่ถูกทำลาย ดังนั้นจึงมีการคิดหาวิธีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่สามารถย่อยสลายทางชีววิทยาได้ โดยมีการนำสารต่างๆ มาใช้ เช่น เจลาติน คอลลาเจน และ chitosan ในการขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในวิศวกรรมผิวหนัง เพื่อให้เกิดความสะดวกและรวดเร็ว แทนที่จะใช้การปลูกถ่ายของผิวหนังของผู้ที่ได้รับบาดเจ็บนั้น และบางทีบาดแผลที่เกิดขึ้นต่อผิวหนังนั้นมีบริเวณกว้าง ทำให้ไม่สามารถจะหาผิวหนังส่วนอื่นมาทดแทนได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อกระตุ้นให้เซลล์บริเวณผิวหนังเข้ามาอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ และทำให้เกิดการพัฒนาบาดแผลดังกล่าว [Huang, Y. และคณะ, 2005; Olsen, D. และคณะ, 2003]






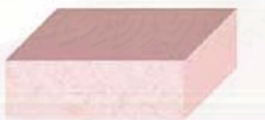


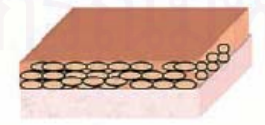
ผิวหนังเทียมหรือผิวหนังสังเคราะห์เป็นวัสดุปิดแผลที่สามารถรักษาบาดแผลที่มีการสูญเสียชั้นหนังแท้โดยมีการย่อยสลายหมดไปเองในร่างกายโดยจะลดการหดตัวของแผลและลดการเกิดแผลเป็นได้ดี หนังเทียมมีการผลิตในระดับการค้าในปัจจุบัน โดยใช้เทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อซึ่งเป็นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหายโดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์มาทดแทนเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหายนั้นเพื่อให้เซลล์บริเวณโดยรอบบาดแผลเคลื่อนที่ (migration) เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ ในต่างประเทศมีผลิตภัณฑ์ผิวหนังเทียมที่ใช้หลักการนี้ออกจำหน่ายเป็นจำนวนมาก โดยสามารถจัดประเภทได้ดังต่อไปนี้ [Jones, I. และคณะ, 2002]

1. หนังเทียมแบบโครงเลี้ยงเซลล์ตามธรรมชาติ หรือ Dermal Regeneration Template (DRT) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคล้ายกับ extracellular matrix (ECM) ของเซลล์ผิวหนังแท้ ได้แก่ คอลลาเจน และ glycosaminoglycan (GAG) ตัวอย่างหนังเทียมประเภทนี้ ได้แก่

- Biobrane: ประกอบไปด้วย Silicone, Nylon Mesh และ คอลลาเจน โดย Silicone และ Nylon Mesh เป็นส่วนที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพแต่จะช่วยเพิ่มความแข็งแรง ช่วยในการรักษาความชุ่มชื้น ป้องกันการติดเชื้อ หรือช่วยในการระบายของเหลวต่างๆจากแผล เช่น น้ำเหลือง หรือน้ำหนอง
 - Integra: ประกอบไปด้วย Silicone, คอลลาเจน และ GAG
2. หนังเทียมแบบ DRT ที่มีการเพาะเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ลงไปเพื่อกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์ผู้ป่วยเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างเช่น
- Transcyte: ประกอบไปด้วย Silicone, Nylon Mesh, คอลลาเจน และ เซลล์ fibroblast โดยทำการเพาะเซลล์ fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ในชั้นหนังแท้ ในชั้นคอลลาเจน
 - Apligraf: ประกอบไปด้วย คอลลาเจน เซลล์ fibroblast และ เซลล์ keratinocytes โดยทำการเพาะเซลล์ fibroblast และเซลล์ keratinocytes ซึ่งเป็นเซลล์ในชั้นหนังกำพร้าในชั้นคอลลาเจน
 - Dermagraft: ประกอบไปด้วย polyglycolic acid (Dexon™) หรือ polyglactin-910 (Vicryl™) และ เซลล์ fibroblast โดยทำการเพาะเซลล์ fibroblast ในชั้น polyglycolic acid (Dexon™) หรือ polyglactin-910 (Vicryl™)
3. ผิวหนังทดแทนที่ใช้ผิวหนังหรือเซลล์ของมนุษย์หรือสัตว์อื่น ได้แก่
- Alloderm: เป็นการนำเอาชั้นผิวหนังมนุษย์ (allograft) มาและทำการกำจัดเซลล์ออก
 - Cadaveric allograft: เป็นนำเอาชั้นผิวหนังของมนุษย์มาแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียสเพื่อคงสถานะของเซลล์ จากนั้นนำไป lyophilize หรือระเหิดเอาน้ำออก และแช่ด้วย glycerol
 - Epicel: ประกอบไปด้วยเซลล์ keratinocytes ของผู้ป่วยเอง (autologous) มาเลี้ยงเพื่อให้เซลล์เหล่านั้นสร้าง ECM ออกมาเองก่อนใช้งาน
 - Laser skin: ประกอบไปด้วยเซลล์ keratinocytes เช่นเดียวกับ Epicel แต่มีการเติม hyaluronic acid และ เจาะรูด้วยเลเซอร์

สรุปภาพรวมของหนังเทียมชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงหนังเทียมชนิดต่างๆ ที่มีวางจำหน่ายในต่างประเทศ

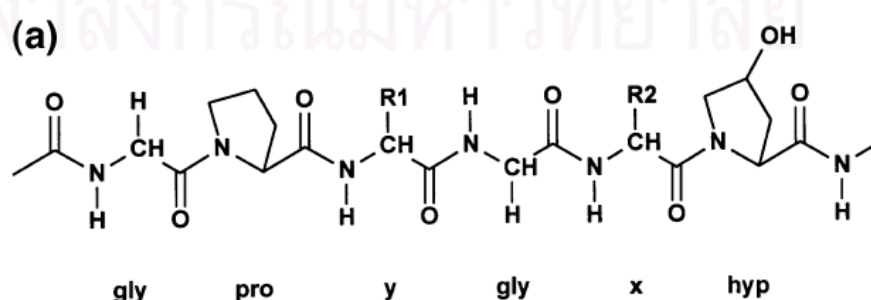
Trade Name	Schematic Representation	Layers	Cost	Cost per cm ²
Biobrane™ (Dow Hickam/Bertek Pharmaceuticals, Sugar Land, TX).		<ol style="list-style-type: none"> 1. Silicone 2. Nylon Mesh 3. Collagen 	5x5cm £12.00	£0.48
Transcyte® (Advanced Tissue Sciences, Inc. La Jolla, California, USA)		<ol style="list-style-type: none"> 1. Silicone 2. Nylon Mesh 3. Collagen seeded with neonatal fibroblasts 	13x9cm £921.15	£7.87
Apligraf® (Organogenesis Inc, Canton, MA and Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ)		<ol style="list-style-type: none"> 1. Neonatal keratinocytes 2. Collagen seeded with neonatal fibroblasts 	7.5 cm diam disc £626.00	£14.20
Dermagraft® (Advanced Tissue Sciences, Inc. La Jolla, California, USA)		<ol style="list-style-type: none"> 1. Polyglycolic acid (Dexon™) or polyglactin-910 (Vicryl™) seeded with neonatal fibroblasts 	5x7.5cm £267.80	£7.14
Integra® (Integra Life Science Corporation, Plainsboro, New Jersey)		<ol style="list-style-type: none"> 1. Silicone 2. Collagen and glycosaminoglycan 	10x25cm £830.00	£3.32
Alloderm® (LifeCell, Woodlands, Texas.)		<ol style="list-style-type: none"> 1. Acellular de-epithelialised cadaver dermis 	4x12cm £283.00	£5.90
Epicel™ (Genzyme tissue repair corporation, Cambridge, MA.)		<ol style="list-style-type: none"> 1. Cultured autologous keratinocytes 	Not yet licensed in UK	
Laserskin™ (Fidia Advanced Biopolymers, Italy) also marketed as Vivoderm™ by ER Squibb & sons Inc,		<ol style="list-style-type: none"> 1. Cultured autologous keratinocytes 2. Hyaluronic acid with laser perforations 	Not yet licensed in UK	
Cadaveric allograft (from not for profit skin banks)		<ul style="list-style-type: none"> • cryopreserved in order to retain viability • lyophilised • glycerolised 	similar price for all three various sizes	£0.60

(ที่มา: Jones, I., 2002; 55:185-193.)

2.2 คอลลาเจน

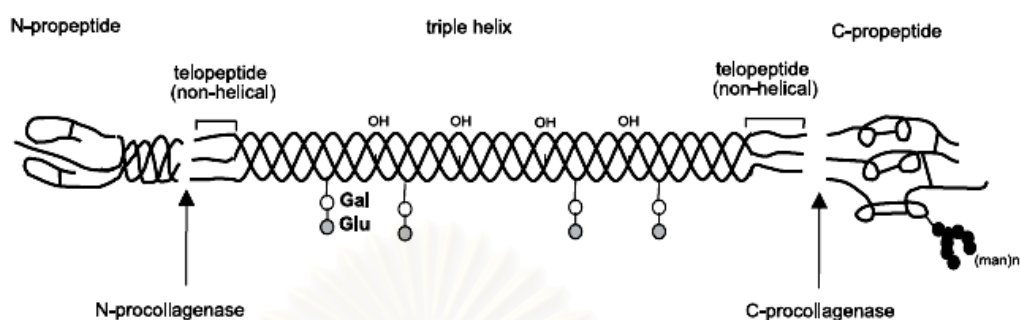
คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในมนุษย์และสัตว์ซึ่งมีประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนในร่างกาย คอลลาเจนเป็นส่วนประกอบของ extracellular matrix (ECM) หรือเรียกว่าเป็นที่อยู่ของเซลล์ ซึ่งทำให้คอลลาเจนทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับอวัยวะต่างๆ เช่น เส้นเอ็น กระดูก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมดและยังคงพบคอลลาเจนในรอยต่อของเนื้อเยื่อที่ประกอบขึ้นเป็นส่วนของอวัยวะ คอลลาเจนช่วยสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อและอวัยวะ ให้มีโครงสร้างที่คงสภาพสมบูรณ์ ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีกลุ่มวิจัยต่างๆ สนใจคอลลาเจนเป็นจำนวนมากและได้แบ่งกลุ่มคอลลาเจนดังแสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งคอลลาเจนในแต่ละกลุ่มจะมีหน่วยซ้ำที่เหมือนกันคือ Gly-X-Y ซึ่ง X แทน proline และ Y แทน 4-hydroxyproline แสดงดังรูปที่ 2.1 คอลลาเจนมีความเข้ากันได้ดีมากกับเซลล์เนื่องจากพบมากตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย มี R-G-D peptide ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมีปฏิกิริยาสร้างภูมิคุ้มกันที่ต่ำ [Friess, W. 1998] โมเลกุลของคอลลาเจนประกอบไปด้วย polypeptide α -chain 3 เส้น ซึ่ง α -chain ทั้ง 3 เส้นพันรวมกันทำให้คอลลาเจนมีโครงสร้างเป็นแบบ triplehelix [Gelse, K. และคณะ, 2003] แสดงดังรูปที่ 2.2

การใช้ประโยชน์จากคอลลาเจนในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีมาก โดยเฉพาะคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งซึ่งนิยมนำมาเป็นวัสดุทดแทนผิวหนังและแผลที่เกิดจากไฟไหม้ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะสมบัติทางกลที่เหมาะสมและมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์ [Rao, KP., 1995] ซึ่งบริษัทที่ผลิตคอลลาเจน เช่น sigma-aldrich และ Johnson&Johnson และงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อยังได้พัฒนาการใช้คอลลาเจนในงานด้านอื่นๆ นอกจากผิวหนัง เช่น การแทนที่ของท่อลำเลียงเลือด ลิ้นปิดหัวใจ และเอ็นยึด เนื่องจากคอลลาเจนแสดงสมบัติที่มีความสามารถในการห้ามเลือด โดยเหนียวน้ำให้เกิดการจับตัวเป็นลิ่มหรือก้อนของเลือด และแสดงความสามารถในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ [Auger, FA. และคณะ, 1998]



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนชนิดที่ 1

(ที่มา: Friess, W., 1998; 45: 113-136.)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างแบบ triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1

(ที่มา: Gelse, K., 2003; 55: 1531–1546.)

กระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 ในร่างกายซึ่งพบมากในส่วนของกระดูก ผิวหนัง เอ็นยึด และกระจกตา ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนหลัก แสดงดังรูปที่ 2.3 ดังนี้ [Gelse, K. และคณะ, 2003]

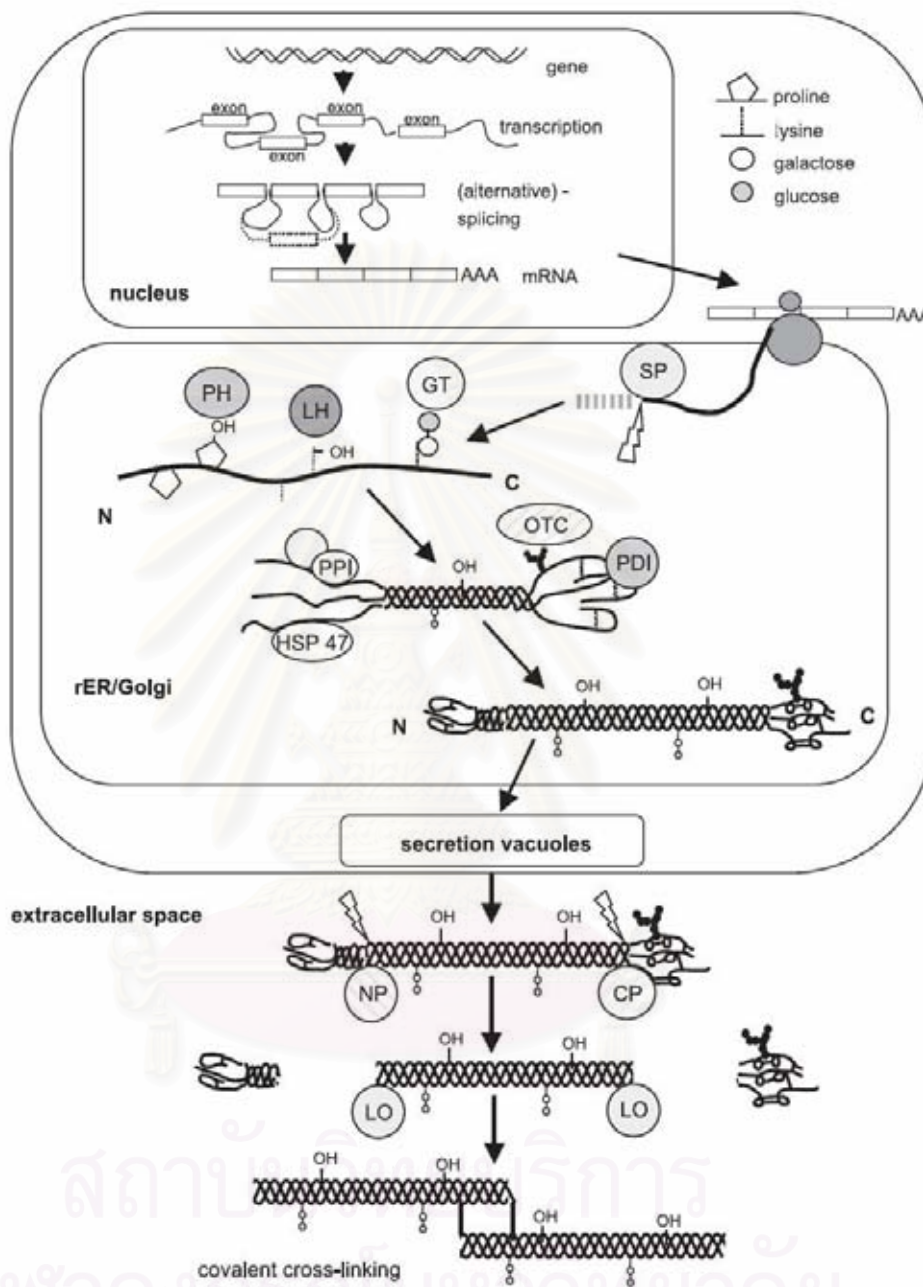
- transcription และ translation เป็นกระบวนการผลิต mRNA ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นนิวเคลียสของระบบ และก่อกำเนิดเป็นคอลลาเจนชนิดต่างๆ
- posttranslational modifications of collagen เป็นกระบวนการชักทอให้เกิดเป็นโปรตีน 3 เส้นพันกันซึ่งมีหัวเป็น C-propeptide และท้ายเป็น N-propeptide
- secretion of collagen เป็นกระบวนการตัดหัวและท้ายของโปรตีนสามเส้นที่พันกัน โดย C-propeptide ถูกตัดโดย C-proteinase และ N-propeptide ถูกตัดโดย N-proteinase
- extracellular processing และ modification เป็นกระบวนการที่สายของโปรตีนทั้ง 3 เส้นเกิดการเชื่อมโยงพันระกันและกัน และกลายเป็นคอลลาเจน

คอลลาเจนเหมาะสำหรับการนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์มนุษย์ เนื่องจากพบมากในส่วนต่างๆ ของร่างกายดังแสดงในตารางที่ 2.2 ทั้งยังมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย มีการต้านต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายที่ต่ำ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ และสามารถเพิ่มความสามารถในการชักนำเซลล์เข้ามายึดเกาะและเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามมีปัญหาบางประการที่นำคอลลาเจนมาใช้งานได้แก่ [Friess, W. 1998 และ Lee, CH. และคณะ, 2001]

- การเตรียม คอลลาเจนชนิดที่หนึ่งให้บริสุทธิ์ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากการสกัดคอลลาเจนจากเนื้อเยื่อเป็นไปได้ยากเนื่องจากโมเลกุลในคอลลาเจนถูกเชื่อมโยงด้วยพันธะโควาเลนต์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุของสิ่งมีชีวิตและชนิดของเนื้อเยื่อที่สกัด
- เนื่องจากคอลลาเจนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สกัดได้จากแหล่งที่ต่างกัน และมีอยู่ตามอวัยวะต่างๆในร่างกาย จึงทำให้คอลลาเจนมีความเป็นเนื้อเดียวกันต่ำ หรือ มีความสม่ำเสมอทางโครงสร้างต่ำ จึงทำให้เกิดความแปรปรวนต่างๆ เช่น ความหนาแน่นในการเชื่อมโยงพันธะ ขนาดของเส้นใย ความบริสุทธิ์ และการย่อยสลาย
- การคงสภาพโครงสร้างโมเลกุลของคอลลาเจนทำได้ยากเนื่องจากคอลลาเจนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อน ต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำและมีการรุกรานของจุลินทรีย์ต่างๆ ง่ายและมีรายงานการติดเชื้อในคนไข้
- คอลลาเจนมีสมบัติทางกลที่ไม่แข็งแรง คือ มีการหดตัว (contraction) ของเส้นใยโดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสารละลายซีรัม

ลักษณะเด่นของคอลลาเจนคือ มีปริมาณกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ที่สูงซึ่งกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophobic protein และมีปริมาณของกรดอะมิโน tyrosine, tryptophan, isoleucine, cystine และ histidine ที่ต่ำ [Neuman, RE. 1949] สรุปรวมปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในคอลลาเจนดังตารางที่ 2.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 กระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 (SP: signal peptidase; GT: hydroxylysyl galactosyltransferase and galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase; LH: lysyl hydroxylase; PH: prolyl hydroxylase; OTC: oligosaccharyl transferase complex; PDI: protein disulphide isomerase; PPI: peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase; NP: procollagen N-proteinase; CP: procollagen C-proteinase; LO: lysyl oxidase; HSP47: heat shock protein 47, colligin1).

(ที่มา: Gelse, K., 2003; 55:1531– 1546.)

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของคอลลาเจนชนิดต่างๆ

Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
<i>Fibril-forming collagens</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
V	$\alpha 1(V),\alpha 2(V),\alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2–q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	cartilage, vitreous body
<i>Basement membrane collagens</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36–q37) COL4A4 (2q36–q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	basement membranes
<i>Microfibrillar collagen</i>			
VI	$\alpha 1(VI),\alpha 2(VI),\alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
<i>Anchoring fibrils</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	skin, dermal–epidermal junctions; oral mucosa, cervix,
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	endothelial cells, Descemet's membrane
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1 (6q21–q22.3)	hypertrophic cartilage
<i>FACIT collagens</i>			
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	cartilage, vitreous humor, cornea
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12–q13)	perichondrium, ligaments, tendon
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$		corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3–11.2)	blood vessel wall
<i>Transmembrane collagens</i>			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1 (10q22)	epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermal–epidermal junctions
<i>Multiplexins</i>			
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1 (9q21–q22)	fibroblasts, smooth muscle cells, kidney, pancreas,
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1 (21q22.3)	lungs, liver

Given are the molecular composition, the genomic localization of the different chains as well as the basic tissue distribution.

(ที่มา: Gelse, K., 2003; 55:1531– 1546.)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในคอลลาเจนจากหนังปลาและเจลาตินจากหนังหมู

กรดอะมิโน	ปริมาณในคอลลาเจน (กรัม/ โปรตีน100 กรัม)	ปริมาณในเจลาติน (กรัม/ โปรตีน100 กรัม)
Glycine	29.60	30.50
Alanine	9.20	9.20
Isoleucine	1.70	1.50
Leucine	3.70	3.20
Valine	2.50	2.70
Serine	5.90	2.90
Threonine	3.50	2.20
Proline	13.70	16.30
Phenylalanine	2.40	2.10
Tyrosine	0.86	0.69
Tryptophan	-	-
Methionine	2.30	0.80
Cystine	0.12	0.09
Histidine	0.94	0.67
Arginine	9.40	8.80
Lysine	5.60	5.10
Aspartic acid	7.10	6.30
Glutamine acid	11.50	11.70

(ที่มา: Neuman, RE., 1949; 289-297.)

2.3 คอลลาเจนไฮโดรไลเซส (collagen hydrolysate)

คอลลาเจนไฮโดรไลเซสเป็นผลผลิตที่ได้จากคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส คอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีราคาต่ำและมีมวลโมเลกุลประมาณ 3,000 ดาลตัน คอลลาเจนไฮโดรไลเซส ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิดเดียวกันกับที่ปรากฏในคอลลาเจนด้วยเหตุนี้จึงทำให้คอลลาเจนไฮโดรไลเซสสามารถใช้เป็นส่วนประกอบที่ใช้ในการเจริญเติบโตของกระดูกได้ในทางอ้อมคดี แต่คอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีค่าทางชีววิทยาต่ำ เนื่องจากมีกรดอะมิโนที่จำเป็นไม่ครบ เช่น ไม่ปรากฏกรดอะมิโน tryptophan และกรดอะมิโน cysteine มีปริมาณที่น้อย [Moskowitz, RW. 2000]

ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซสสามารถทำได้โดยใช้วัตถุดิบจากชิ้นส่วนของหนังสัตว์ หรือ ชิ้นส่วนของกระดูก นำวัตถุดิบเหล่านี้มาผ่านขั้นตอนการสกัดโดยขบวนการ hydrolysis โดยใช้เอนไซม์ จากนั้น ทำให้บริสุทธิ์ ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ทำให้ปราศจากเชื้อโรค และทำให้แห้ง คอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ได้จะมีลักษณะที่เป็นผง สามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้องและไม่เป็นเจล คอลลาเจนไฮโดรไลเซสสามารถทำประโยชน์ได้หลายอย่าง ได้แก่ ใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีม แชมพู และ ครีมนวดผผ เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีสมบัติในการเก็บกักความชุ่มชื้นได้ดี และทางการแพทย์สามารถใช้ในการรักษาโรคกระดูกข้อเสื่อม (osteoarthritis) ของเข่าและสะโพก และโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) โดยมีคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบคอลลาเจนไฮโดรไลเซสในการรักษาโรคข้อกระดูกเสื่อมบริเวณเข่าและสะโพก โดยในปี ค.ศ. 2000 RW. Moskowitz ทำการทดสอบโดยใช้ Pharmaceutical-grade collagen hydrolysate (PCH) ซึ่งสกัดมาจาก Pharmaceutical gelatin โดยขบวนการ hydrolysis โดยให้ผู้ป่วยเป็นโรคไขข้ออักเสบบริเวณหัวเข่า หรือสะโพก โดยบริโภค PCH 10 กรัมทุกวัน จะลดอาการเจ็บปวดได้ และพบว่าความเข้มข้นของกรดอะมิโน hydroxyproline ในเลือดเพิ่มขึ้น และมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยโดยเฉพาะบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการยอมรับว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมีความปลอดภัยสูง (food safety) โดยได้รับ GRAS status จาก US Food and Drug Administration (FDA) จึงเป็นที่น่าสนใจในการรักษาโรคที่หายยาก (chronic disorder) และคอลลาเจนไฮโดรไลเซสได้ถูกนำมาทดลองใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกข้อเสื่อม ซึ่งได้รับการจดสิทธิบัตรโดย European patent No 0254289 [European patent No 0254289 Agents for the treatment of osteoarthritis, 1986, based on a study by Prof Adam]

ในปี ค.ศ. 1995 V. Semrl-kosmac และคณะได้เปรียบเทียบคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ถูกสกัดจากของเสียที่เหลือจากการฟอกหนัง และ condensate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการ

ความแน่นของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส นอกจากนั้นยังมีการนำคอลลาเจนไฮโดรไลเซสและ condensate ปรับสภาพพื้นผิวด้วย ethylene และ propylene oxide แล้วทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีโดยใช้เทคนิค infrared (IR) และ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies และศึกษาคุณสมบัติของพื้นผิวจากแรงดึงผิวของผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองที่ได้เมื่อทดสอบโดยใช้เทคนิค IR คอลลาเจนไฮโดรไลเซสและ condensate ก่อนและหลังจากการปรับสภาพพื้นผิวด้วย ethylene และ propylene oxide พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะที่คล้ายกัน ในส่วนผลของเทคนิค NMR ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ถูกปรับสภาพพื้นผิวด้วย ethylene และ propylene oxide แล้ว ethylene และ propylene oxide ทำปฏิกิริยากับ หมู่ $-NH_2$ ในคอลลาเจนไฮโดรไลเซสโดยสังเกตได้จาก peak ที่ต่ำลงของหมู่ $-NH_2$ ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสหลังจากปรับสภาพพื้นผิวด้วย ethylene และ propylene oxide และจากการทดสอบคุณสมบัติของพื้นผิว ได้ผลการปรับสภาพพื้นผิวด้วย ethylene และ propylene oxide ทำให้พื้นผิวมีคุณสมบัติที่ดีขึ้น โดยพิจารณาจากค่าแรงดึงผิวที่เพิ่มขึ้น หลังจากการปรับสภาพพื้นผิว

นักวิจัยหลายท่านได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน hydroxyproline (Hyp) ในคอลลาเจนไฮโดรไลเซสโดยทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ phenylthiocarbonyl (PTC) ของกรดอะมิโน จากคอลลาเจนไฮโดรไลเซสวิเคราะห์โดย high-performance liquid chromatography (HPLC) และ spectrophotometric detection ซึ่งการใช้วิธีนี้เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน Hyp จากคอลลาเจนไฮโดรไลเซสและ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ราคาไม่แพง และไม่ต้องการเครื่องมือที่ตรวจสอบ gradient และ วัดอุณหภูมิ และในปี ค.ศ. 1989 J. Macek ได้แยกกรดอะมิโน proline และ hydroxyproline จาก คอลลาเจนไฮโดรไลเซสโดยใช้ HPLC ชนิด C_8 column โดยใช้สารละลาย sodium dodecyl sulphate ใน water – n – propanol (pH 2.6) ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที จากการทดลองพบกรดอะมิโน hydroxyproline และ proline ที่เวลา 5 และ 8 นาที ตามลำดับ จาก column ซึ่งจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซสประกอบไปด้วยกรดอะมิโน glutamic acid, hydroxyproline, serine, glycine และ proline เป็นส่วนมาก [Dunphy, MJ., และคณะ, 1987]

ในปี ค.ศ. 2003 P. Alexy และคณะ ได้ทำการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มจากการผสมกันระหว่าง poly (vinyl alcohol) (PVA) และ คอลลาเจนไฮโดรไลเซสซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตหนัง โดยใช้วิธี melt blow extrusion และแผ่นฟิล์มนี้สามารถย่อยสลายทางชีววิทยาได้ จากนั้นได้ทำการทดสอบสมบัติทางกล โดยวัดค่า tensile strength จากผลการทดลองเมื่อเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ที่ปริมาณมากขึ้น ค่า tensile strength มีค่าลดลง และจากการศึกษาการ

ย่อยสลายทางชีววิทยาโดยใช้ anaerobic biodegradation การย่อยสลายเร็วขึ้นเมื่อผสมคอลลาเจนไฮโดรไลเสทใน PVA และภายในปีเดียวกันนี้ P. Alexy และคณะได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีววิทยา และการซึมของน้ำบนแผ่นฟิล์ม จาก PVA ผสมรวมกับคอลลาเจนไฮโดรไลเสท และการเคลือบ glycerol บน PVA โดยเมื่อนำ PVA รวมกับคอลลาเจนไฮโดรไลเสทจะมีค่าการต้านทานการซึมผ่านของน้ำเข้าไปในแผ่นฟิล์มมาก และเมื่อทดสอบการละลายน้ำ แผ่นฟิล์มที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสทนี้จะละลายน้ำได้เป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ไม่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ส่วนการทดสอบการย่อยสลายทางชีววิทยาโดยการวัดค่า organic carbon elimination (เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ แผ่นฟิล์มที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสทและไม่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสทมีการย่อยสลายทางชีววิทยาที่ไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส การย่อยสลายของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่เติมในแผ่นฟิล์มจะมีค่าสูงกว่า แผ่นฟิล์มที่ไม่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสท จากผลการศึกษาลักษณะสมบัติทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเสทช่วยเพิ่มการย่อยสลาย มีค่า tensile strength ที่ต่ำ และมีการละลายสูง

2.4 เจลาติน (gelatin)

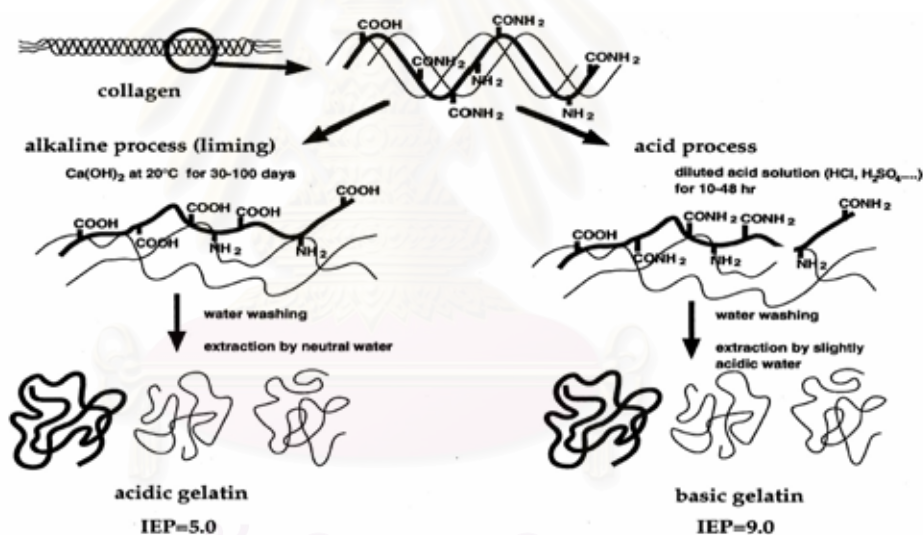
เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติ มีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน ซึ่งสกัดมาจากคอลลาเจนโดยขบวนการ acidic และ alkaline process และนำมาทำให้บริสุทธิ์ ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ผ่านขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อโรค จากนั้นจึงทำให้แห้ง จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาก็คือ Basic gelatin หรือ เจลาตินชนิด A และ Acidic gelatin หรือ เจลาตินชนิด B ซึ่งขั้นตอนการสกัดเจลาตินทั้งสองชนิดนี้ แสดงดังรูปที่ 2.3 โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรมและทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพและมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ [Young, S. และคณะ, 2005]

เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ [Tabata, Y. 1998]

1. Basic gelatin (Type A gelatin): ได้มาจาก acid process แสดงดังรูปที่ 2.4 มีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนและเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

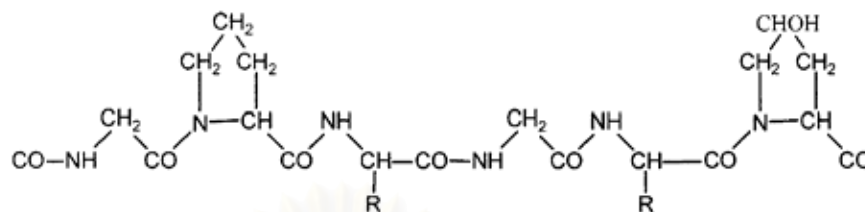
2. Acidic gelatin (Type B gelatin): ได้มาจาก alkaline process ดังรูปที่ 2.4 เป็นขบวนการ hydrolysis กลุ่ม amide ในคอลลาเจนซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่ม carboxyl ปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุลบ และมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส

ลักษณะเฉพาะของเจลาตินคือสารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่มีปริมาณสูง เช่น glycine, proline และ hydroxyproline ซึ่งโครงสร้างของเจลาตินประกอบไปด้วยหน่วยซ้ำของกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันคือ glycine-X-Y ซึ่ง X และ Y คือ proline และ hydroxyproline ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin

(ที่มา: Tabata, Y., 1998; 31: 287-301.)



R = glycine-X-Y triplet

X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเจลาติน
(ที่มา: Lee, SB., 2005; 24: 2503-2511.)

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด และมีปริมาณของกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ที่มากเช่นเดียวกับคอลลาเจนและเนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโน methionine, tyrosine และ cystine ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophilic จึงทำให้เจลาตินละลายน้ำได้ดี [Neuman, RE. 1949] ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในเจลาตินแสดงในตารางที่ 2.3

2.5 โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold)

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โครงเลี้ยงเซลล์ถูกใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ในร่างกายเมื่อเนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านั้นได้รับความเสียหาย โดยโครงเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาปลูกถ่ายที่อวัยวะบริเวณที่มีการสูญเสียเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เซลล์บริเวณโดยรอบเคลื่อนที่เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเซลล์จะทำการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนขึ้น และหลั่งสารต่างๆทำให้เกิดการเคลื่อนตัวเข้ามาของเซลล์เพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และพัฒนากลายเป็นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์โดยมีการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์หมดไปเอง [Ma, PX. 2004]

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อของผิวหนัง มักจะสร้างขึ้นโดยเลียนแบบสภาวะของ Extracellular matrix (ECM) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้ [Badylak, SF. 2004]

- คอลลาเจน: เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุด ใน ECM ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการรองรับการยึดเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์
- proteoglycans (PG): ได้มาจาก collagenous glycoproteins ซึ่งมีสายโซ่ของ glycosaminoglycan (GAG) PG มีหลายชนิด เช่น Decorin, biglycan, fibromodulin, lumican และ epiphykan ทำหน้าที่ในการควบคุมขบวนการ hydration ของ ECM และส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์
- glycoproteins (GP): ได้มาจาก fibronectin (FN) ซึ่งมีกลุ่ม RGD sequence ทำหน้าที่ชักนำให้เซลล์มายึดเกาะและเข้ากันได้ดีกับเซลล์นิยมใช้ในการเคลือบผิวโมเลกุลของชิ้นงาน
- growth factors: มีส่วนสำคัญในการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ เช่น transforming growth factor beta (TGF- β) และ basic fibroblast growth factor (bFGF)

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ควรคำนึงถึงสมบัติดังต่อไปนี้

2.5.1) ความพรุนและขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์

ในปี ค.ศ. 2003 SB. Lee และคณะ รายงานความพรุนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast ควรมีความกว้างร้อยละ 90 โดยปริมาตร เซลล์ fibroblast สามารถยึดเกาะ และกระจายตัวได้ดีที่พื้นผิวรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากเลี้ยงเซลล์ fibroblast เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และขนาดของรูพรุนควรมีค่าเฉลี่ยที่ 100-200 ไมครอน [Freyman, TM. 2001]

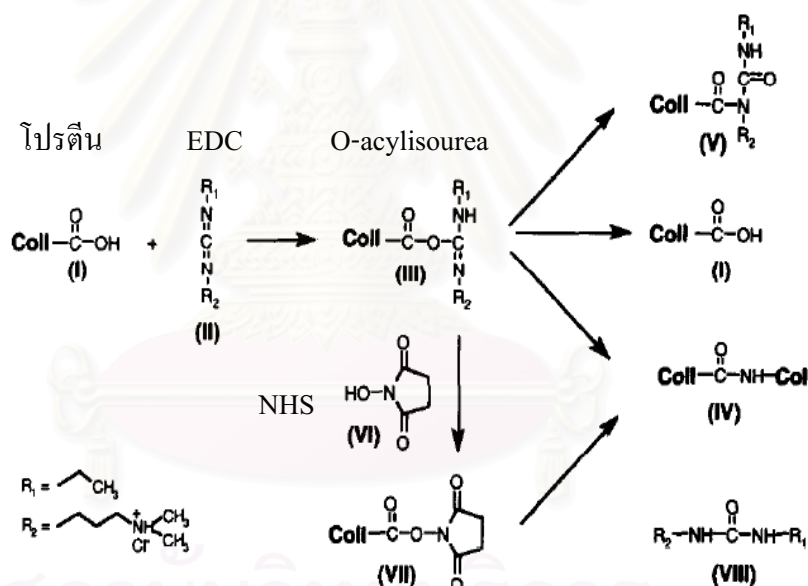
2.5.2) การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์

การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ควรเหมาะสมต่อการเกิดของเนื้อเยื่อใหม่ ในปี ค.ศ. 1994 TA. Shafritz ได้ทำการวิเคราะห์หาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังที่เหมาะสมพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ควรย่อยสลายไปมากกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก (half life) ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ ทั้งนี้การย่อยสลายสัมพันธ์กับการเชื่อมโยงพันธะ (crosslink) ของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยการเชื่อมโยงพันธะและสมบัติทางกลจะแปรผกผันกับการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งการย่อยสลายของวัสดุทดแทนผิวหนังควรจะอยู่ในช่วง 2 ถึง 4 สัปดาห์ [Yannas, IV. 2001]

การเชื่อมโยงพันธะ (crosslink) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนเป็นหลักมีหลายวิธี เช่น การเชื่อมโยงพันธะทางกายภาพได้แก่ การใช้อุณหภูมิหรือ dehydrothermal treatment (DHT)

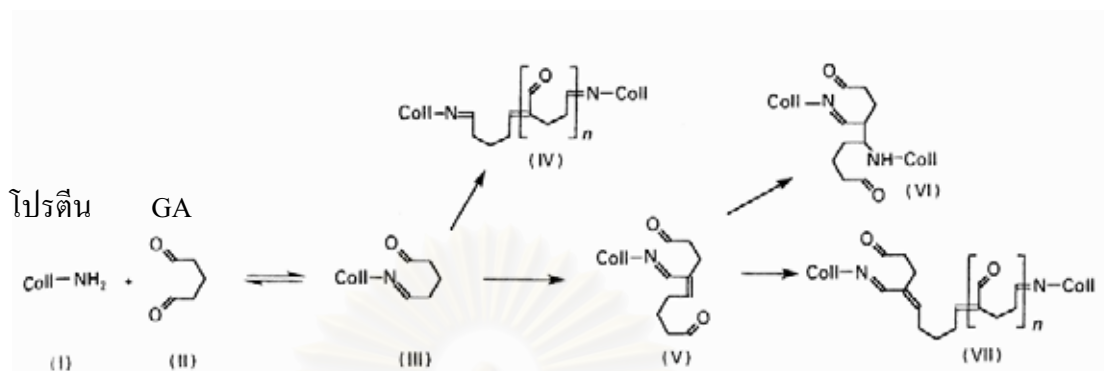
การใช้รังสี เช่น UV-irradiation การเชื่อมโยงพันธะทางเคมี ได้แก่ กลุ่มของ aldehyde (formaldehyde, glutaraldehyde, glyceraldehyde), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), polyepoxides และ isocyanates [Young, S. และคณะ, 2005]

การเชื่อมโยงพันธะด้วย carbodiimide hydrochloride (EDC) จะเกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีน กับ EDC ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือหมู่ O-acylisourea (III) จากนั้น O-acylisourea จะหลุดออก และโปรตีนที่ได้จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของโปรตีนตัวถัดไป ส่วนที่มีการเติม N-hydroxysuccinimide (NHS) (VI) ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราของปฏิกิริยาในการเชื่อมโยงพันธะ โดย NHS จะเข้าไปแทนที่หมู่ O-acylisourea และหลุดออกไป จากนั้นโปรตีนที่ได้จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของโปรตีนตัวถัดไป [Damink, LO. และคณะ, 1996] แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจน กับ EDC และ NHS
(ที่มา: Damink, LO., 1996; 17: 765-773.)

การเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde (GA) จะเกิดระหว่างหมู่ aldehyde ของ GA (II) กับหมู่ ϵ -amine ของกรดอะมิโน lysine หรือ hydroxylysine ในคอลลาเจนชนิดที่ 1 และอาจเกิดการเชื่อมโยงพันธะออกมาได้หลายรูปแบบ (IV), (VI) และ (VII) [Sheu, MT. และคณะ, 2001] แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจน กับ glutaraldehyde

(ที่มา: Sheu, MT., 2001; 22: 1713-1719.)

ข้อแตกต่างระหว่างการใช้ EDC และ GA คือโมเลกุลของ EDC จะไม่ตกค้างอยู่ที่หมู่ที่ถูกเชื่อมโยงพันธะ เนื่องจากผลิตภัณฑ์หลังการเชื่อมโยงพันธะ คือ อนุพันธ์ของยูเรีย หรือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea ที่สามารถกำจัดออกได้โดยการละลายน้ำทำให้ไม่มีสารตกค้างในโมเลกุลคอลลาเจน ด้วยเหตุนี้โครนเลสเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วย EDC จึงมีความเป็นพิษต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม EDC กำลังอยู่ในระหว่างกระบวนการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา [Liu, H. และคณะ, 2004] ส่วนการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ GA จะมี GA จะคงอยู่ที่หมู่ที่ถูกเชื่อมโยงพันธะ ซึ่งมักจะมีการบวกรวมการจัดหมู่ aldehyde ที่ตกค้างอยู่ได้โดยการล้างโครนเลสเซลล์ด้วย glycine เพื่อทำปฏิกิริยากับ GA ที่เกินพอและล้างต่อน้ำหลายรอบ [Ozeki, M., 2004] ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA มีความเป็นเนื้อเดียวกันสูงเนื่องจาก GA มีการกระจายตัวของพันธะทางเคมีอย่างเป็นระเบียบในโมเลกุลซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีสมบัติทางกลที่สูงขึ้น [Goissis, G. และคณะ, 1998] GA ยังได้รับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาจากประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วในปัจจุบัน [U.S. Food and Drug Administration. March 3, 2006]

2.5.3) สมบัติทางกลของโครนเลสเซลล์

สมบัติทางกลที่ทดสอบด้วยวิธี compression test และ tensile test และนำมาคำนวณหาค่า Young Modulus ซึ่งแสดงถึงความแข็งแรงของโครนเลสเซลล์ มีความสำคัญต่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [Naughton, GK. และคณะ, 2002] โดยในปี ค.ศ. 2001 Freyman, TM. และคณะได้

ทำการศึกษา compression test ของโครงเลี้ยงเซลล์ collagen-GAG ที่เตรียมโดยวิธีการทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งพบว่า ค่า Young Modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่า 0.02 กิโลปาสกาล

2.5.4) ความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ควรเข้ากันกับเซลล์ได้ดีและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งการทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์นั้น สามารถทดสอบได้หลายวิธี ได้แก่ [Gatti, AM. 2002]

- Cytotoxicity: เป็นวิธีการที่ง่ายที่สุดในการทดสอบความเป็นพิษซึ่งจะทำการทดสอบภายนอกในร่างกาย (*in vitro*) โดยพิจารณาปฏิกิริยาระหว่างชิ้นงานกับเซลล์ ถ้าชิ้นงานเป็นพิษจะทำให้เซลล์ตาย cytotoxicity สามารถจำแนกออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ การนำชิ้นงานสัมผัสโดยตรงกับเซลล์ (direct contact), การใช้ diffusion layer จำพวก agar เพื่อเป็นชั้นระหว่างชิ้นงานกับเซลล์ (indirect contact) และแบบสุดท้ายเป็นการทำ elution test โดยนำชิ้นงานแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม และนำสารละลายนี้มาเลี้ยงเซลล์ และวิเคราะห์ผลจากความเข้มข้นของสารละลายและปริมาณที่เซลล์ตาย เช่น ถ้าความเข้มข้นของสารละลายน้อยและนำไปเลี้ยงเซลล์และเซลล์ตายแสดงว่า โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก
- Genotoxicity: มักเกิดจากวัสดุหรือชิ้นงานที่ใส่เข้าไปในร่างกายแล้วมีการปลดปล่อยสารบางอย่างออกมาทำให้มีผลกระทบต่อร่างกาย เช่น อาจเกิดการกลายพันธุ์ของยีนส์ซึ่งส่วนใหญ่จะทดสอบภายนอกในร่างกายและใช้เวลาในการทดสอบนาน
- Carcinogenicity: เป็นการฝังชิ้นงานลงในสัตว์ทดลอง เช่น หนู แล้วนำไปเปรียบเทียบกับตัวเปรียบเทียบมาตรฐานซึ่งมักใช้เป็น polyethylene เพราะไม่ทำให้เกิดมะเร็ง ซึ่งผลการทดลองที่ได้ อาจเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าชิ้นงานนั้นอาจทำให้เกิดมะเร็งได้
- Reproductive Toxicity: เป็นการทดลองในเซลล์สัตว์ ช่วงระหว่างที่เซลล์มีการผสมพันธุ์และกลายพันธุ์
- Irritation and Sensitization: เป็นการทดสอบเกี่ยวกับความไวหรือความระคายเคือง ซึ่งมักใช้ patch test และมักใช้ทดลองกับหนูตะเภาเนื่องจากมีพื้นที่ผิวมาก

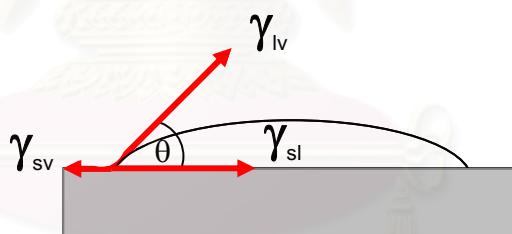
- Systemic Toxicity: โดยทำการทดลองฝังชิ้นงานลงไปในตัวทดลองและดูว่ามีผลกระทบกับอวัยวะส่วนอื่นของร่างกายอย่างไร
- Immune response: เป็นการเกิดความผิดปกติที่มีผลต่อภูมิคุ้มกัน อาจทำให้เกิด Hypersensitive, Chronic inflammation, Immunosuppression, Immunostimulation และ Autoimmunity โดยการตรวจสอบปริมาณของเม็ดเลือดขาว
- Hemocompatibility: ชิ้นงานจะต้องมีความเข้ากันได้กับเลือดโดยทำการทดสอบเมื่อสัมผัสกับเลือดจะไม่เกิดก้อนเลือด หรือ thrombin

โครงเลี้ยงเซลล์ควรชักนำให้เกิดการเกาะยึดของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ควรจะมีกลุ่มของ RGD ซึ่งจะสามารถชักนำการยึดเกาะของเซลล์ โดย RGD จะแสดงในรูปของ integrin receptor ในการชักนำการยึดเกาะของเซลล์ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง integrin receptor กับเซลล์นี้จะส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของเซลล์ [Lee, SB. และคณะ, 2003]

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ จะมีศักยภาพในการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast เพิ่มมากขึ้น [Lee, SB. และคณะ, 2003] โดยอาจเพิ่มศักยภาพในการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินได้ด้วยการเติมพอลิเมอร์ชนิดอื่น เช่น chitosan และ hyaluronic acid ซึ่งผลการทดสอบเลี้ยงเซลล์ fibroblast พบว่ามีการยึดเกาะและกระจายตัวของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ [Liu, H. และคณะ, 2004] และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของเจลาติน chitosan และ hyaluronic acid มาทำการทดสอบเลี้ยงเซลล์ fibroblast พบว่ามีการยึดเกาะของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น [Mao, JS. และคณะ, 2003] และการขึ้นรูปเจลาตินด้วยวิธีที่ต่างกันพบว่าโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีลักษณะที่ต่างกันซึ่งจะมีผลต่อการยึดเกาะ การเคลื่อนที่ และการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ขึ้นรูปด้วยวิธีการ salt-leaching และ วิธีการทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง วิธีการ salt-leaching ให้ผลโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุน และมีรูพรุนต่อเนื่องมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยกระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง [Lee, SB. และคณะ 2005] และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินในการรักษาบาดแผลได้ด้วยการเติม growth factor ชนิดต่างๆ เช่น EGF [Hong, SR. และคณะ, 2001] สรุปผลโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบดังตารางที่ 2.4

2.5.5) ลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์

ลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์สามารถวิเคราะห์โดยวิธีการหาค่ามุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle) ซึ่งวิธีนี้สามารถบ่งบอกถึงความเป็น hydrophobicity และ hydrophilicity ของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งสามารถตรวจสอบ โดยการหยดของเหลวบนพื้นผิวหน้าของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยจะมีกล้องวิดีโอถ่ายไว้และประมวลผลโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งเมื่อของเหลวสัมผัสกับพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์จะเกิดแรงสองแรงคือ แรงที่ดึงดูดกันโมเลกุลของของเหลว (cohesive force) และแรงที่ดึงดูดกันระหว่างโมเลกุลของของเหลวกับพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (adhesive force) หลังจากนั้นจะเข้าสู่สภาวะสมดุลระหว่างแรงสองแรงเมื่อมีค่าพลังงานต่ำสุด โดยจะเกิดสมดุลของสองแรงระหว่างแรงดึงของเหลวกับอากาศ (γ_{lv}) และแรงดึงที่ผิวหน้าของโมเลกุลของเหลวกับพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ (γ_{sl}) ซึ่งสามารถวัดได้ออกมาเป็นค่ามุม contact angle (θ) ของโมเลกุลของของเหลวกับพื้นผิวสัมผัส [Ratner, BD. และคณะ, 2004] แสดงดังรูปที่ 2.8 หากค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์มีค่ามากกว่า 65 องศา แสดงว่าพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophobicity แต่ถ้าหากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophilicity [Vogler, EA. 1998]



รูปที่ 2.8 การวัดค่ามุมสัมผัสน้ำแบบ sessile drop

(ที่มา: Ratner, BD., 2004.)

ข้อควรคำนึงเมื่อใช้วิธีการ contact angle ได้แก่ [Ratner, BD. และคณะ, 2004]

- ชิ้นงานที่มีพื้นผิวหน้าที่หยาบจะมีผลกระทบต่อผลการทดลองที่ได้
- ชิ้นงานที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันจะมีผลกระทบต่อผลการทดลองที่ได้
- สารละลายที่ใช้ อาจเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายโดยทำให้ค่า γ_{lv} ลดลง
- สารละลายที่ใช้ อาจทำให้พื้นผิวชิ้นงานละลายได้

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของเจลาติน

วัสดุหลัก/รอง	ประเภทชิ้นงาน	วัตถุประสงค์ (application)	กระบวนการขึ้นรูปและการครอสลิงค์	ผลการทดลองที่สำคัญ	เอกสารอ้างอิง/ปี
เจลาติน	hydrogel	ระบบนำส่ง Growth factor	ขึ้นรูปแผ่น hydrogel จากเจลาตินกับ glutaraldehyde ที่มีความเข้มข้นต่างกัน ทั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเชื่อมโยงพันธะ และแช่ใน glycine เพื่อกำจัดหมู่ aldehyde ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งที่ 37 องศาเซลเซียส และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง จากนั้นทำการเติม bFGF	ใช้แผ่น hydrogel ในการควบคุมการส่งผ่าน bFGF (basic fibroblast growth factor) bFGF ที่อยู่ใน basic gelatin จะถูกส่งผ่านได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่ bFGF ที่อยู่ใน acidic gelatin จะถูกส่งผ่านได้น้อย และ hydrogel ที่มีค่าการดูดซับน้ำสูงกว่า จะสลายตัวได้เร็วกว่า hydrogel ที่มีค่าการดูดซับน้ำที่ต่ำกว่า	Tabata, Y. (1999)
เจลาติน	hydrogel	ระบบนำส่ง Growth factor	ขึ้นรูปแผ่น hydrogel จาก เจลาติน เชื่อม โยง พันธะ ด้วย glutaraldehyde 12 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และแช่ด้วย glycine ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20, -80 และ N ₂ (l) และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง	โครงสร้างของรูพรุนที่แตกต่างกันทำได้โดยเปลี่ยนอุณหภูมิที่แช่แข็ง แผ่น hydrogel ที่ถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว จะมีโครงสร้างที่เป็น 2 มิติ (two-dimension) ในขณะที่ แผ่น hydrogel ที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะมีโครงสร้างเป็น 3 มิติ รูพรุนจะมีความต่อเนื่องกันมากขึ้น โดยมีขนาดรูพรุนประมาณ 250 ไมครอน ซึ่งเมื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แผ่นจะมีโครงสร้างเป็น 2 มิติ และมีขนาดรูพรุนประมาณ 85 ไมครอน	Kang, HW. (1999)

วัสดุหลัก/รอง	ประเภท ชิ้นงาน	วัตถุประสงค์ (application)	กระบวนการขึ้นรูปและการครอสลิงค์	ผลการทดลองที่สำคัญ	เอกสารอ้างอิง/ปี
เจลาติน/hyaluronic acid	ฟองน้ำ	วัสดุทดแทนผิวหนัง	ผสมเจลาติน(G) และ hyalyronic acid(H) ที่อัตราส่วน9:1 และปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ขึ้นรูปด้วยการแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งที่ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ใน สารละลาย acetone ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่มี EDC 100 มิลลิกรัม เขย่าเบาๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเชื่อมโยงพันธะ หลังจากนั้น ล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่น เพื่อกำจัด EDC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งอีกครั้งหนึ่ง โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้นำมา sterilize ด้วย ethylene oxide gas ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และมีการเติม antibiotic, epidermal growth factor (EGF) และ AgSD	โครงเลี้ยงเซลล์ที่มี antibiotic และ EGF สามารถรักษาบาดแผลให้หายเร็วกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดอื่นที่ใช้เปรียบเทียบ (GH-normal, GH-AgSD, GH-EGF, GH-AgSD และ EGF) เมื่อทดลองกับหนู (Wistar rat) ซึ่งได้ผลเปรียบเทียบและเห็นได้ชัดเจน และปราศจากการติดเชื้อ	Lee, SB. (2003)
เจลาติน/ β -glucan	ฟองน้ำ	วัสดุทดแทนผิวหนัง	ผสมเจลาตินและ β -glucan ในอัตราส่วนต่างๆกันและนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง จากนั้นเชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารเคมีคือ EDC	ได้โครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีรูพรุนที่ต่อเนื่องกัน การยึดเกาะ และการเจริญเติบโต ของเซลล์ fibroblast มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์ เทียบกับงานเพาะเชื้อที่ไม่มีโครงเลี้ยงเซลล์	Hong, SR. (2001)

วัสดุหลัก/รอง	ประเภท ชิ้นงาน	วัตถุประสงค์ (application)	กระบวนการขึ้นรูปและการครอสลิงค์	ผลการทดลองที่สำคัญ	เอกสารอ้างอิง/ปี
เจลาติน/ chitosan/ hyaluronic acid	ฟองน้ำ	วัสดุทดแทน ผิวหนัง	ผสมเจลาติน, chitosan และ hyaluronic acid ในอัตราส่วน 2:7:1 ตามลำดับ และ ขึ้นรูปด้วยการแช่แข็งและทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งและ เชื่อมโยงพันธะด้วย EDC ใน MES(2-morpholinoethane sulphonic acid)	โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสม hyaluronic acid มีค่า water uptake และ retention ability ที่มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม hyaluronic acid ในส่วนของผลการเลี้ยงเซลล์พบว่าการยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม hyaluronic acid เทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม hyaluronic acid	Liu, H. (2004)
เจลาติน/ chondroitin/ hyaluronan	ฟองน้ำ	วัสดุทดแทน ผิวหนัง	ผสม เจลาติน, chondroitin และ hyaluronan (pH 5-6) และ เชื่อมโยงพันธะด้วย EDC 2-3 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแช่แข็งต่อที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ เชื่อมโยงพันธะอีกครั้งด้วย EDC ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง และทำแห้งแข็งอีก 72 ชั่วโมง	พบว่ารูพรุนมีขนาดเท่ากันที่ 180 ไมครอน และมีความเป็นรูพรุนที่ร้อยละ 75 ในส่วนของผลการเลี้ยงเซลล์ใน โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/chondroitin/hyaluronan ใน spinner flask และใน petri dish พบว่าใน spinner flask เซลล์ chondrocyte มีการกระจายตัวอย่างเป็นระเบียบอย่าง สมบูรณ์ในโครงเลี้ยงเซลล์ ส่วนใน petri dish เซลล์เกิดการเกาะตัวรวมกันบนพื้นผิวด้านนอกของโครงเลี้ยงเซลล์	Change, CH. (2003)

วัสดุหลัก/รอง	ประเภท ชิ้นงาน	วัตถุประสงค์ (application)	กระบวนการขึ้นรูปและการครอสลิงค์	ผลการทดลองที่สำคัญ	เอกสารอ้างอิง/ ปี
เจลาติน/chitosan	ฟองน้ำและ แผ่นฟิล์ม	วัสดุทดแทน ผิวหนัง	แบบแรกขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำ โดยการผสม chitosan และเจลาตินและขึ้นรูป ด้วยการทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งโดย ทดลองใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ต่างกัน โดยให้ โครงเลี้ยงเซลล์ วางบน lyophilizing plate โดยตรงที่อุณหภูมิ -56 องศาเซลเซียส, ในตู้แช่ แข็ง ที่ -60 องศาเซลเซียส, -20 องศาเซลเซียส และ -40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงทำ แห้งแข็งและแบบที่สองขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม และทดสอบการย่อยสลายโดยใช้สารละลาย lysozyme	รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำเกิดจากเกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็ก (microparticle) การแช่แข็งที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส ทำให้เกิด โครงเลี้ยงเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสทำให้เกิดโครงเลี้ยงเซลล์สองชั้น (bilayer) การย่อย สลายของโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่แข็งที่ -60 องศาเซลเซียสจะย่อยสลาย ได้เร็วกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่แข็งที่ -20 และ -40 องศาเซลเซียส เนื่องจากเหตุผลที่ว่า การแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้โครงเลี้ยง เซลล์มีพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้น และเมื่อพื้นที่ผิวสัมผัสของโครงเลี้ยง เซลล์สัมผัสกับสารละลาย lysozyme มากเท่าไร ก็จะย่อยสลายได้ มากเท่านั้น และการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มมีค่าต่ำกว่าโครงเลี้ยง เซลล์ชั้นเดียวและโครงเลี้ยงเซลล์สองชั้น	Mao, JS. (2003)
เจลาติน/chitosan	ฟองน้ำ	วัสดุทดแทน ผิวหนัง	นำโครงเลี้ยงเซลล์ chitosan และ เจลาติน โดย วิธีการผสมและทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง มา แช่ในสารละลาย EDC, NHS ใน MES buffer และ hyaluonic acid (HA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น และ ทำแห้งที่อุณหภูมิเยือก แข็งอีกครั้ง	การยึดเกาะของเซลล์ fibroblast มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติบนโครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน/chitosan/hyaluronic acid เทียบกับ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติม hyaluronic acid ส่วนในด้านการ เจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด ให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน	Mao, JS. (2003)

วัสดุหลัก/รอง	ประเภท ชิ้นงาน	วัตถุประสงค์ (application)	กระบวนการขึ้นรูปและการครอสลิงค์	ผลการทดลองที่สำคัญ	เอกสารอ้างอิง/ ปี
เจลาติน	ฟองน้ำ	วัสดุทดแทน ผิวหนัง	เปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากวิธีการ Salt-leaching และโครงเลี้ยงเซลล์จากวิธีการ ทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง	โครงสร้างของเจลาตินที่ได้ โดยวิธี salt-leaching สามารถ ดัดแปลงรูปร่างได้ง่าย มีโครงสร้างของรูพรุนที่กระจายสม่ำเสมอ และเชื่อมต่อกัน มีขนาดของรูโดยเฉลี่ย 350 ไมครอน การย่อย สลายมีค่าต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากวิธีการทำแห้งที่อุณหภูมิ เยือกแข็ง ในส่วนของผลการเลี้ยงเซลล์โดยการเลือกโครงเลี้ยง เซลล์ที่ผ่านกระบวนการ salt-leaching มาเลี้ยงเซลล์เนื่องจาก โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกระบวนการ salt- leaching พบว่ามีลักษณะรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความ พรุน และมีรูพรุนเชื่อมต่อกันมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่าน กระบวนการขึ้นรูปโดยการทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง จากการ ทดลองการเลี้ยงเซลล์พบว่าการยึดเกาะของเซลล์ fibroblast บริเวณรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกระบวนการ salt- leaching และเซลล์มีการเจริญเติบโต และเคลื่อนที่เข้าไปในโครง เลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยวิธีการทำแห้งที่ อุณหภูมิเยือกแข็ง	Lee, SB. (2005)

วัสดุหลัก/รอง	ประเภท ชิ้นงาน	วัตถุประสงค์ (application)	กระบวนการขึ้นรูปและการครอสลิงค์	ผลการทดลองที่สำคัญ	เอกสารอ้างอิง/ ปี
เจลาติน	เส้นใย	วัสดุทดแทนผิวหนัง	เตรียมสารละลายผสมระหว่าง เจลาติน และ TFE (2,2,2-trifluoroethanol) (ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบเป็นเส้นใย (nanofibrous scaffolds) โดยการผ่านเครื่อง electrospin gelatin เชื่อมโยงพันธะโดยใช้ไอของ glutaraldehyde (GA) ในโถดูดความชื้น และทิ้งไว้ในตู้ดูดอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและทำ treatment ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเพื่อกำจัดหมู่ GA ที่เหลือ	การเชื่อมโยงพันธะด้วย GA ช่วยพัฒนาคุณสมบัติทางกลโดยการทดสอบ tensile และเพิ่มความเสถียรทางอุณหภูมิโดยการพิจารณาค่าอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ HDF (Human dermal fibroblast)	Zang, YZ. (2006)
PCL (poly(ϵ -caprolactone)) /เจลาติน	เส้นใย	วัสดุทดแทนผิวหนัง	เตรียมสารละลายผสมระหว่าง PCL, เจลาติน และ TFE โดยการผสม PCL/TFE (ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และ เจลาติน/TFE (ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 50:50 และปั่นกวนเบาๆ และขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบเป็นเส้นใย โดยการผ่านเครื่อง electrospinning และ spin ลงบน polyurethane wound dressing (Tegaderm wound dressing)	การเจริญเติบโตของเซลล์ HDF บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี polyurethane wound dressing ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี polyurethane wound dressing ซึ่งมีการย่อยสลายที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ทดแทนผิวหนัง	Chong, E.J. (2007)

บทที่ 3

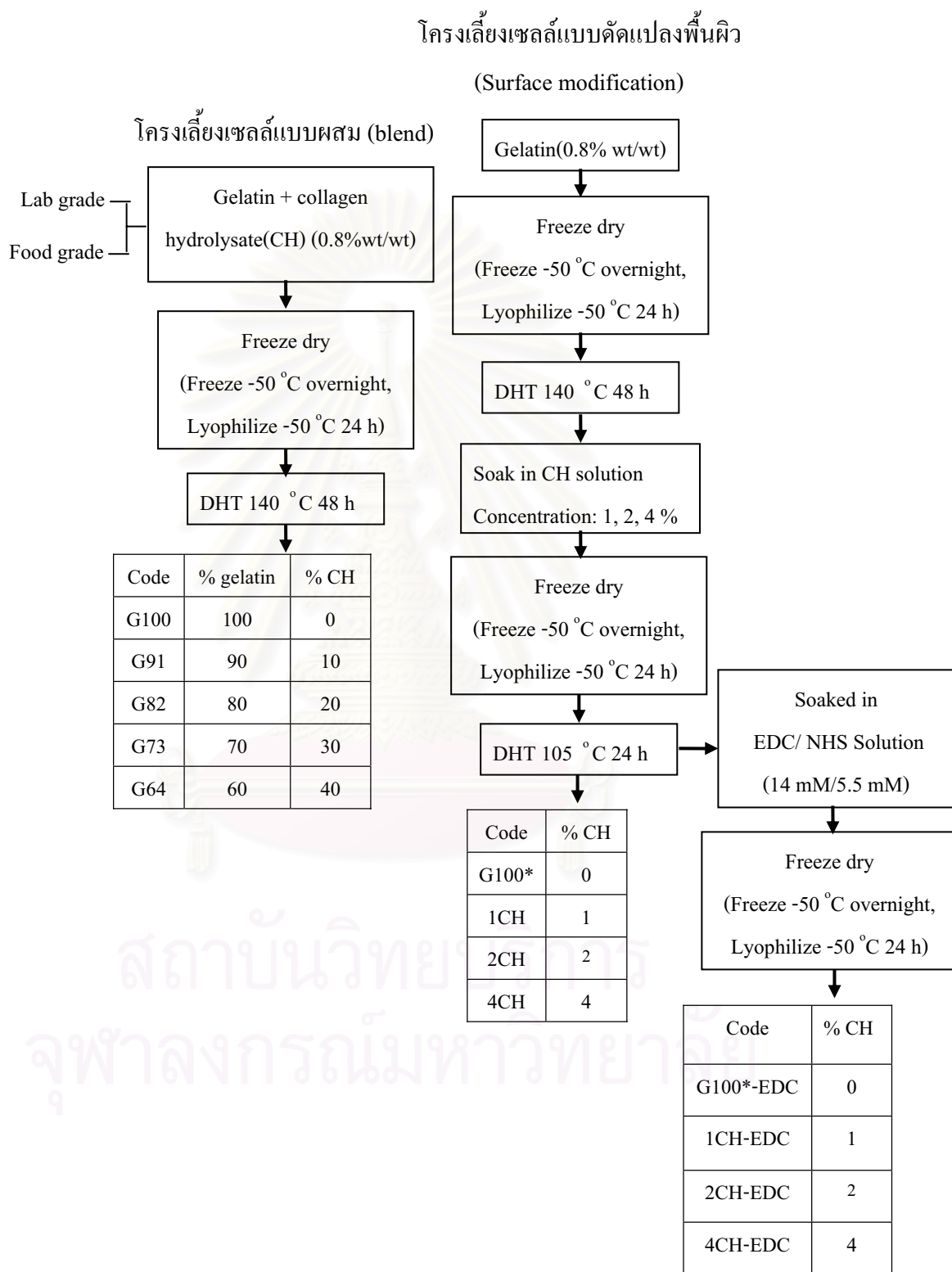
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ ขั้นตอนการขึ้นรูปแบบตัดแปลง โครงเลี้ยงเซลล์ และ ขั้นตอนการทดสอบลักษณะสมบัติของ โครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีวิธีและขั้นตอนการขึ้นรูปเป็นไปตามแผนผังรูป 3.1 และ การทดสอบลักษณะสมบัติมีขั้นตอนตามรูป 3.2

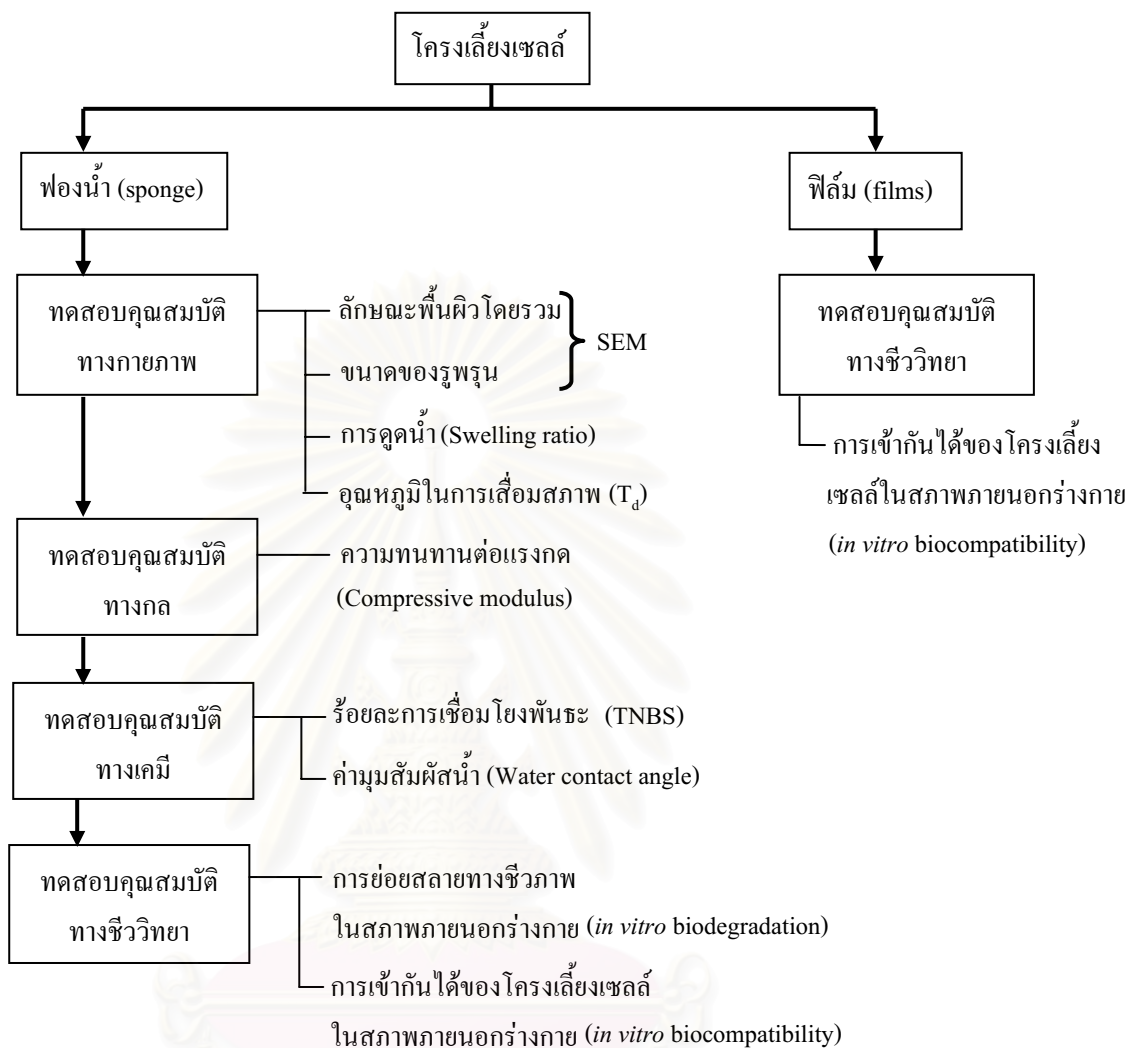
กระบวนการขึ้นรูปแบบตัดแปลง โครงเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท แบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ ได้แก่

- การผสม (blend) เจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท
- การตัดแปลงพื้นผิวด้วย โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท (surface modification)



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด

หมายเหตุ: * DHT: Dehydrothermal treatment คือการอบในเตาอบสุญญากาศ



รูปที่ 3.2 แผนการทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

3.2 วัสดุดิบและสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ก. วัสดุดิบ

- Type A gelatin powder (116g bloom, pH 4.5, pI 9, lab grade, Ajax Finechem, NSW, Australia)
- Type A gelatin (300 bloom, pI 9, food grade, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- collagen solution (pH 3.1, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- collagen hydrolysate (Taming, Thailand)
- 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (nacalai tesque, Japan)
- β-Alanine (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)
- sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3 , 99%, Fluka, Buchs, Germany)
- sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Germany)
- sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma Co., St. Louis, USA)
- dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride (EDC) (nacalai tesque, Japan)
- N-hydroxysuccinimide (NHS) (nacalai tesque, Japan)
- enzyme bacterial collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen Corp., Paisley, UK)
- Glycine ultrapure (Usb Corporation , USA)
- mouse skin fibroblasts (L929 or murine fibroblasts)
- Dulbecco's modified eagle medium, DMEM (10%medium + L-glutamine + AB, Hyclone, Utah, USA)
- trypsin-EDTA (0.25% trypsin with $\text{EDTA} \cdot \text{Na}$, Gibco BRL, Canada)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (USB corporation, Cleveland, OH, USA)

- dimethylsulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, Germany)
- hydrochloric acid (HCl 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, USA)
- ethanol (99.7-100%, VWR International Ltd., Poole Dorset, United Kingdom)
- potassium chloride (Sigma, Germany)
- potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
- sodium chloride (Usb corporation, USA)
- hexamethyldisilazane, HMDS (Sigma-Aldrich, Germany)

ข. อุปกรณ์

- 1-digit balance (Mettler Toledo, Switzerland)
- 4-digit balance (Mettler Toledo, Switzerland)
- magnetic stirrer / hot plate (RCT Basic, Ika labortechnik, Germany)
- autoclave (HVE 25/50, Hirayama, Japan)
- kim-wipe paper (SR Lab, Thailand)
- desiccator (SR Lab, Thailand)
- -40°C freezer (Revco)
- water bath (1235 PC, Shel-Lab)
- lyophilizer (Heto, PowerDry LL3000, USA)
- vacuum oven (VD23, USA)
- Universal Testing Machine (Instron No. 5567, USA)
- Thermogravimetric/Differential Analyzer, TG/DTA (Diamond, Perkin Elmer, USA)
- Contact Angle Meter, CAM (RE0110, UK)
- scanning electron microscopy, SEM (JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
- CO₂ incubator (Series II 3110 water jacketed incubator, Thermo Forma, USA)
- laminar flow hood (BH 18, Labcaire)

- pH meter (professional meter PP-50, Germany)
- polystyrene tissue culture discs (NUNC, Denmark)
- 24-well polystyrene tissue culture plates (NUNC, Denmark)
- Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
- Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

3.3.1.1) วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม

1. เตรียมสารละลายเจลาตินโดยผสมเจลาตินกับน้ำกลั่น pH 3 (ปรับ pH โดยใช้ acetic acid) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินบวมตัวในน้ำกลั่น pH 3 และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เตรียมสารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลสัทโดยผสมคอลลาเจนไฮโดรไลสัทกับน้ำกลั่น pH 3 ซึ่งมี pH สุดท้ายของสารละลายอยู่ในช่วง 4.5-5.0 และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. ผสมสารละลายเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลสัทที่ปริมาณต่างๆ กันของเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลสัทแล้วปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และเปิดใส่จานเพาะเชื้อที่ทำจาก polystyrene แบบ 24 หลุม หลุมละ 0.75 มิลลิลิตร แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส อย่างต่ำ 6 ชั่วโมง ทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งด้วยเครื่อง Lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ทำการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ความดันสูญญากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องอบที่ความดันสูญญากาศ (Vacuum oven) ซึ่งรหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามสัดส่วนต่างๆ ของเจลาติน/คอลลาเจนไฮโดรไลสัท แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามสัดส่วนต่างๆ ของเจลาติน/คอลลาเจนไฮโดรไลเสท (ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก)

รหัสโครงเลี้ยงเซลล์	เจลาติน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	คอลลาเจนไฮโดรไลเสท (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
G100	100	0
G91	90	10
G82	80	20
G73	70	30
G64	60	40

3.3.1.2) วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท

1. เตรียมสารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลเสทโดยผสมคอลลาเจนไฮโดรไลเสท กับน้ำกลั่น pH 3 (ร้อยละ 1, 2 และ 4 โดยน้ำหนัก) และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. นำตัวอย่าง G100 ที่ได้จากวิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม มาจุ่มในสารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้สารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ต่อ G100 1 ชิ้น
3. แห้งแข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส อย่างต่ำ 6 ชั่วโมง แล้วทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งด้วยเครื่อง Lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ทำการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ความดันสูญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องอบที่ความดันสูญญากาศ ซึ่งรหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท

รหัสโครงเลี้ยง เซลล์	ความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
G100*	0
1CH	1
2CH	2
4CH	4

3.3.1.3) วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS

- นำโครงเลี้ยงเซลล์ G100, 1CH, 2CH และ 4CH ที่ได้จากการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อน (หัวข้อ 3.3.1.2) ทำการเชื่อมโยงพันธะโดยการแช่ในสารละลาย EDC ความเข้มข้น 14 มิลลิโมล ผสมกับสารละลาย NHS ความเข้มข้น 5.5 มิลลิโมล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในโถดูดความชื้นที่ความดันสุญญากาศ (vacuum dessicator)
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 1 ชั่วโมง และแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ 1 คืน
- แช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 6 ชั่วโมง แล้วทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งด้วยเครื่อง Lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งรหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท

รหัสโครงเลี้ยง เซลล์	ความเข้มข้นของคอลลาเจน ไฮโดรไลเสท(ร้อยละโดยน้ำหนัก)
G100*-EDC	0
1CH-EDC	1
2CH-EDC	2
4CH-EDC	4

3.3.1.4) วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วย

คอลลาเจน

1. เตรียมสารละลายคอลลาเจนโดยผสมคอลลาเจนกับน้ำกลั่น pH 3 (ร้อยละ 0.05, 0.1 และ 0.2 โดยน้ำหนัก) และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. นำตัวอย่าง G100 ที่ได้จากวิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมมาจุ่มในสารละลายคอลลาเจนในข้อที่ 1 เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้สารละลายคอลลาเจนปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ต่อ G100 1 ชิ้น
3. แช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส อย่างต่ำ 6 ชั่วโมง แล้วทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งด้วยเครื่อง Lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธี Dehydrothermal treatment ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ความดันสูญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องอบที่ความดันสูญญากาศ ซึ่งรหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจน แสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ตามความเข้มข้นต่างๆ ของคอลลาเจน

รหัส โครงเลี้ยง เซลล์	ความเข้มข้นของคอลลาเจน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
G100*	0
0.05C	0.05
0.1C	0.1
0.2C	0.2

3.3.1.5) วิธีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มสูตรเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์บนกระจกปิดแผ่นสไลด์ (cover glass slip) เพื่อทดสอบผลของวัสดุต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

นอกจากความเข้ากันได้ของสารวัตถุดิบ ต่อการยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ลักษณะทางโครงสร้างยังมีผลมาก จึงต้องการทดสอบผลของโครงสร้างทางเคมีของวัตถุดิบเพียงอย่างเดียว ด้วยเหตุนี้จึงมีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มบนกระจกปิดแผ่นสไลด์เพื่อเปรียบเทียบผลของโครงสร้างที่เป็นแบบ 2 มิติ ของแผ่นฟิล์มกับโครงสร้างที่เป็นแบบ 3 มิติของโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำต่อการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทำการทดสอบการเข้ากันได้ของแผ่นฟิล์ม

กับเซลล์ในสภาพภายนอกเซลล์ (*in vitro* biocompatibility) โดยพิจารณาการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มที่เวลา 5 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนการเตรียมแผ่นฟิล์มบน cover glass slip ดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลายชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้
 - สารละลาย เจลาติน (ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยผสมเจลาตินในน้ำกลั่น pH 3 และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินบวมตัว
 - สารละลายผสมระหว่างเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่อัตราส่วน 80:20 (ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในน้ำกลั่น pH 3 และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 - สารละลาย คอลลาเจนไฮโดรไลเสท (ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยผสม คอลลาเจนไฮโดรไลเสท กับน้ำกลั่น pH 3 และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
 - สารละลายคอลลาเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ในน้ำกลั่น pH 3 และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. เทสารละลายชนิดต่างๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงบนกระจกปิดแผ่นสไลด์ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน
3. เชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการต่างๆ ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 การเชื่อมโยงพันธะของแผ่นฟิล์มด้วยวิธีการต่างๆ

รหัสแผ่นฟิล์ม	ชนิดของสารละลาย	การเชื่อมโยงพันธะ
G100	เจลาติน	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
G82	เจลาติน/คอลลาเจน ไฮโดรไลเสท	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
G100*	เจลาติน	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2CH	เจลาติน/คอลลาเจน ไฮโดรไลเสท	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
G100-EDC	เจลาติน	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในสารละลาย EDC/NHS (14 /5.5 มิลลิโมล) ที่ผ่านการกรองเพื่อฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 1 ชั่วโมง และแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ 1 คืน จึงคูดน้ำออก
2CH-EDC	เจลาติน/คอลลาเจน ไฮโดรไลเสท	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในสารละลาย EDC/NHS (14 /5.5 มิลลิโมล) ที่ผ่านการกรองเพื่อฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 1 ชั่วโมง และแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ 1 คืน จึงคูดน้ำออก
0.2C	คอลลาเจน	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ: DHT หมายถึงการเชื่อมโยงพันธะด้วยการอบในเตาอบสูญญากาศที่ความดัน 10^{-4} ความดันบรรยากาศ

3.3.1.6) วิธีการขึ้นรูปฟิล์มบนกระจกสไลด์ (glass slide) เพื่อทดสอบมุมสัมผัสน้ำ

การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มบนกระจกสไลด์ทำเพื่อวิเคราะห์ความเป็น hydrophilicity และ ความเป็น hydrophobicity บนพื้นผิวแผ่นฟิล์ม ด้วยวิธีการวัดค่ามุมสัมผัส โดยเครื่อง Contact Angle Meter (CAM) โดยมีวิธีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มบนกระจกสไลด์ดังต่อไปนี้

1. เทสารละลายปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงบนกระจกสไลด์ซึ่งมีพื้นที่ 2.25 ตารางเซนติเมตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. ปิบน้ำกัลนผ่านกระจกสไลด์เพื่อให้ได้แผ่นฟิล์มที่บางและล้างปริมาณสารส่วนเกินด้วยน้ำกัลน 3 ครั้ง
3. ทำการเชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ ในตารางที่ 3.6
4. ดูดความชื้นในโถดูดความชื้นสูญญากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบวัดค่ามุมสัมผัส

หมายเหตุ: การเตรียมสารละลายและการเชื่อมโยงพันธะทำตามวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้วในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ

ตารางที่ 3.6 การเชื่อมโยงพันธะของแผ่นฟิล์มด้วยวิธีการต่างๆ

รหัสแผ่นฟิล์ม	ชนิดของสารละลาย	การเชื่อมโยงพันธะ
G100,G91 G82,G73, G64	เจลาติน/คอลลาเจน ไฮโดรไลเสท	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
G100*,1CH, 2CH, 4CH	เจลาติน/คอลลาเจน ไฮโดรไลเสท	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
G100*-EDC, 1CH-EDC, 2CH-EDC	เจลาติน/คอลลาเจน ไฮโดรไลเสท	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในสารละลาย EDC/NHS (14 /5.5 มิลลิโมล) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกัลน 3 รอบ รอบละ 1 ชั่วโมง และแช่น้ำกัลนทิ้งไว้ 1 คืน จึงดูดน้ำออก
G100*,0.05C. 0.1C, 0.2C	เจลาติน/คอลลาเจน	DHT 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 ทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

3.3.2.1 ทดสอบลักษณะสมบัติทางกายภาพ

ก) ลักษณะพื้นผิวโดยรวม

พิจารณาลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์โดยรวม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM) โดยพิจารณาลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ตามแนวแกนตั้งและแกนนอน ซึ่งตัดโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้ใบมีด

ข) ขนาดของรูพรุน

ขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลต่อการเคลื่อนที่และการกระจายตัวของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์และมีผลกระทบต่อสมบัติทางกล เช่นเดียวกับความพรุน โดยทั่วไปเมื่อขนาดของรูพรุนเพิ่มขึ้นจะทำให้ความแข็งแรงทางโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง [Karageorgiou, V. 2005]

การหาขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดัดแปลงวิธีของ HW. Kang [Kang, HW. และคณะ, 1999] โดยวัดขนาดของรูพรุนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด 100 รูแบบสุ่มและเส้นผ่านศูนย์กลางที่น้อยที่สุด 100 รูแบบสุ่ม และหาค่าเฉลี่ย

ค) การดูดน้ำ

การดูดน้ำ (swelling) ของโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญในการดูดซับของเหลวในร่างกาย การเคลื่อนที่ของสารอาหารสำหรับเซลล์ และ ขบวนการ metabolite ของเซลล์ ซึ่งการทดสอบการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ SJ. Mao [Mao, SJ. และคณะ, 2003] โดยคำนวณได้จากผลต่างของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ น้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่แห้งสนิทในสารละลาย PBS buffer ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นชั่งโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองด้านด้านละ 10 วินาทีด้วยกระดาษไม่มีขุย และชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ทันที จะได้เป็นค่าน้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถคำนวณการดูดน้ำ (swelling ratio) ได้จากสูตร

$$\text{swelling ratio} = \frac{W_{so} - W_0}{W_0}$$

โดย W_{so} คือน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากที่ถูกดูดซับน้ำ และ W_0 คือน้ำหนักเริ่มต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.1

ง) อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ (Degradation temperature, T_d)

วิเคราะห์อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยเครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer (TG/DTA) ซึ่ง T_d สามารถบ่งบอกถึงความเสถียรทางอุณหภูมิของสาร ในงานวิจัยนี้ทำการทดลองหาค่า T_d เพื่อเปรียบเทียบว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ว่ามีเสถียรภาพทางอุณหภูมิแตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ค่า T_d โดยใช้ค่า onset ของกราฟระหว่างร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่ของวัสดุและค่าอุณหภูมิที่ใช้ดังแสดงในภาคผนวก ข.2

3.3.2.2 ทดสอบลักษณะสมบัติทางกล

โครงเลี้ยงเซลล์ควรจะมีความสามารถในการรับแรงกดได้มาก ทั้งนี้เพื่อคงสภาพรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์ในการส่งผ่านอาหาร และอากาศ สำหรับเซลล์ และไม่มีกรหดตัว เมื่อนำไปใช้งานจริง จึงทำการทดสอบสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์โดยวัดความทนทานต่อแรงกด (compression test) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ SB. Lee (2003) ในการคำนวณค่า Compressive modulus ซึ่งเป็นค่าความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถวัดได้ด้วย Universal testing machine (Instron No.5567, USA) ที่ constant tensile deformation rate (0.5 มิลลิเมตร/นาที) ในสภาพที่แห้งที่ 25 องศาเซลเซียส โดยค่า Compressive modulus สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Compressive modulus} = \frac{\text{stress}(kPa)}{\text{strain}(\%)}$$

ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.3

3.3.2.3 ทดสอบลักษณะสมบัติทางเคมี

ก) ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะ

การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะ (Degree of crosslinking) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ N. Nagai [Nagai, N. และคณะ, 2004] วิเคราะห์โดยใช้ 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS)

TNBS สามารถบ่งบอกถึงปริมาณกรดอะมิโนอิสระหรือ $-NH_2$ ในโมเลกุล เนื่องจากหมู่ $-NH_2$ เป็นองค์ประกอบที่พบในเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลสเสท ซึ่งถ้าปริมาณกรดอะมิโนในโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากการเชื่อมโยงพันธะเหลือน้อยลงแสดงว่าเกิดการเชื่อมโยงพันธะภายในโครงเลี้ยงเซลล์มาก ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบและการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ข.4

ข) ค่ามุมสัมผัสน้ำ

ศึกษาสมบัติทางเคมีของแผ่นฟิล์มโดยการวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle) เพื่อหาความเป็น hydrophobicity และ hydrophilicity ของพื้นผิวแผ่นฟิล์ม โดยขึ้นรูปฟิล์มบางสูตรเดียวกันกับโครงเลี้ยงเซลล์ดังวิธีในหัวข้อ 3.3.1.5 และวัดค่ามุมสัมผัสน้ำด้วยเครื่อง Contact Angle Meter (CAM) (RE0110, UK) ดังแสดงในภาคผนวก ข.5

การวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อพิจารณาความเป็น hydrophobicity และ hydrophilicity ของพื้นผิวชิ้นงาน สามารถพิจารณาจากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้โดยหากค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวชิ้นงานมีค่ามากกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophobicity แต่ถ้าหากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophilicity [Vogler, EA. 1998]

3.3.2.4 ทดสอบลักษณะสมบัติทางชีววิทยา

ก) การย่อยสลายทางชีวภาพในสภาพภายนอกร่างกาย

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้สำหรับผิวหนังควรจะมีการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biodegradation) ในช่วง 2 ถึง 4 สัปดาห์ [Yannas, IV. 2001] การทดสอบหาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เลียนแบบสภาวะในร่างกายโดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) โดยดัดแปลงวิธีของ YS. Pek [Pek, YS. และคณะ, 2003] โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS buffer) ที่ pH 7.4 ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง จึงนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ก่อนที่จะทำให้แห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งและชั่งน้ำหนัก

การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์คำนวณได้จากสูตร

$$\text{การย่อยสลาย} = 100 - \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100$$

โดย W_o เป็นน้ำหนักเริ่มต้น และ W_t เป็นน้ำหนักที่เวลาใดๆ

ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.6

ข) ความเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกร่างกาย

โครงเลี้ยงเซลล์ควรจะมี ความเข้ากันได้กับเซลล์ได้ดีจึงทำการวิเคราะห์การเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biocompatibility) โดยประเมินได้จากการยึดเกาะของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast โดยวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ที่เวลา 5 ชั่วโมง เพื่อประเมินจำนวนเซลล์ยึดเกาะ และ 48 ชั่วโมง เพื่อประเมินจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโต ด้วยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีของ H. Liu (2004) ซึ่งมีขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์แสดงในภาคผนวก ก.1 และการประเมินจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assay แสดงในภาคผนวก ก.2

3.3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

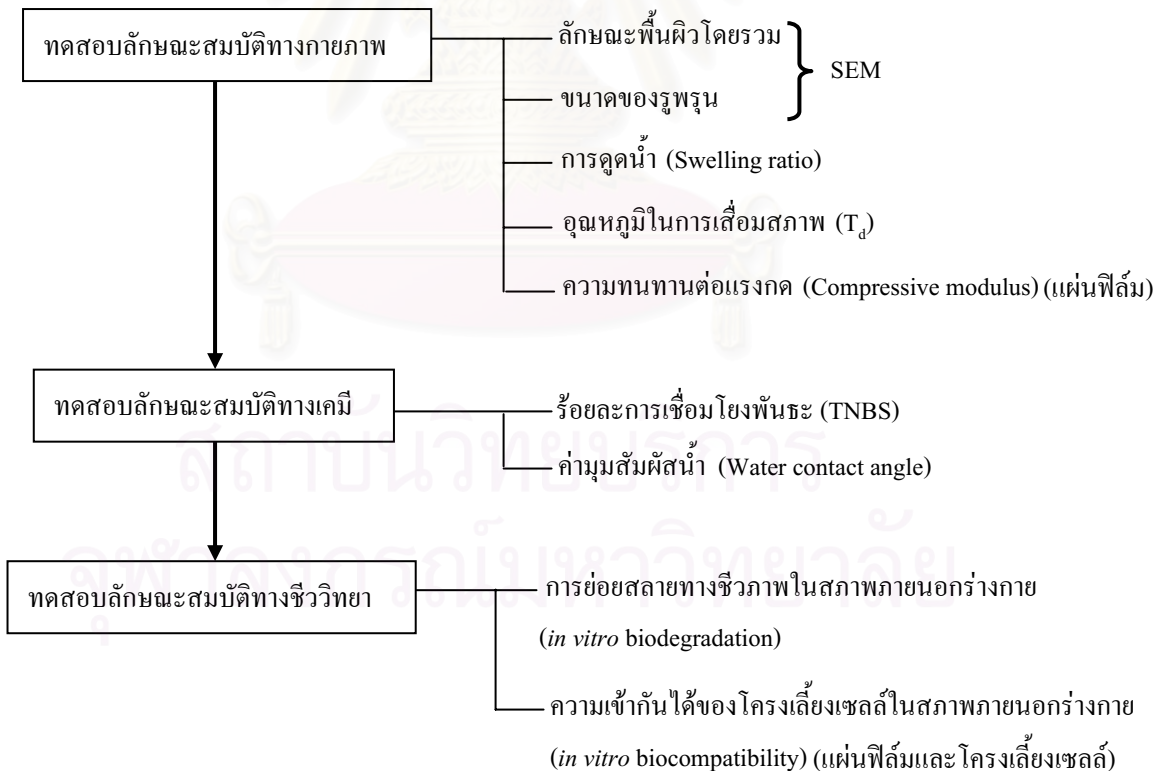
ทุกการทดลองจะมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และมีการเปรียบเทียบความแตกต่างเป็นคู่ๆ โดยใช้ t-test ที่ระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ โดยใช้ผลจากโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินอย่างเดียวเป็นตัวเปรียบเทียบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน/คอลลาเจนไฮโดรไลเซต ที่ขึ้นรูปแบบต่างๆ ได้แก่ แบบผสม แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อน และแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้สารเคมี EDC/NHS แสดงในแผนผังในรูปที่ 4.1 โดยการทดสอบการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำมีการทดสอบกับแผ่นฟิล์มเท่านั้น ไม่สามารถทดสอบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำได้เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีการทดสอบดังกล่าว



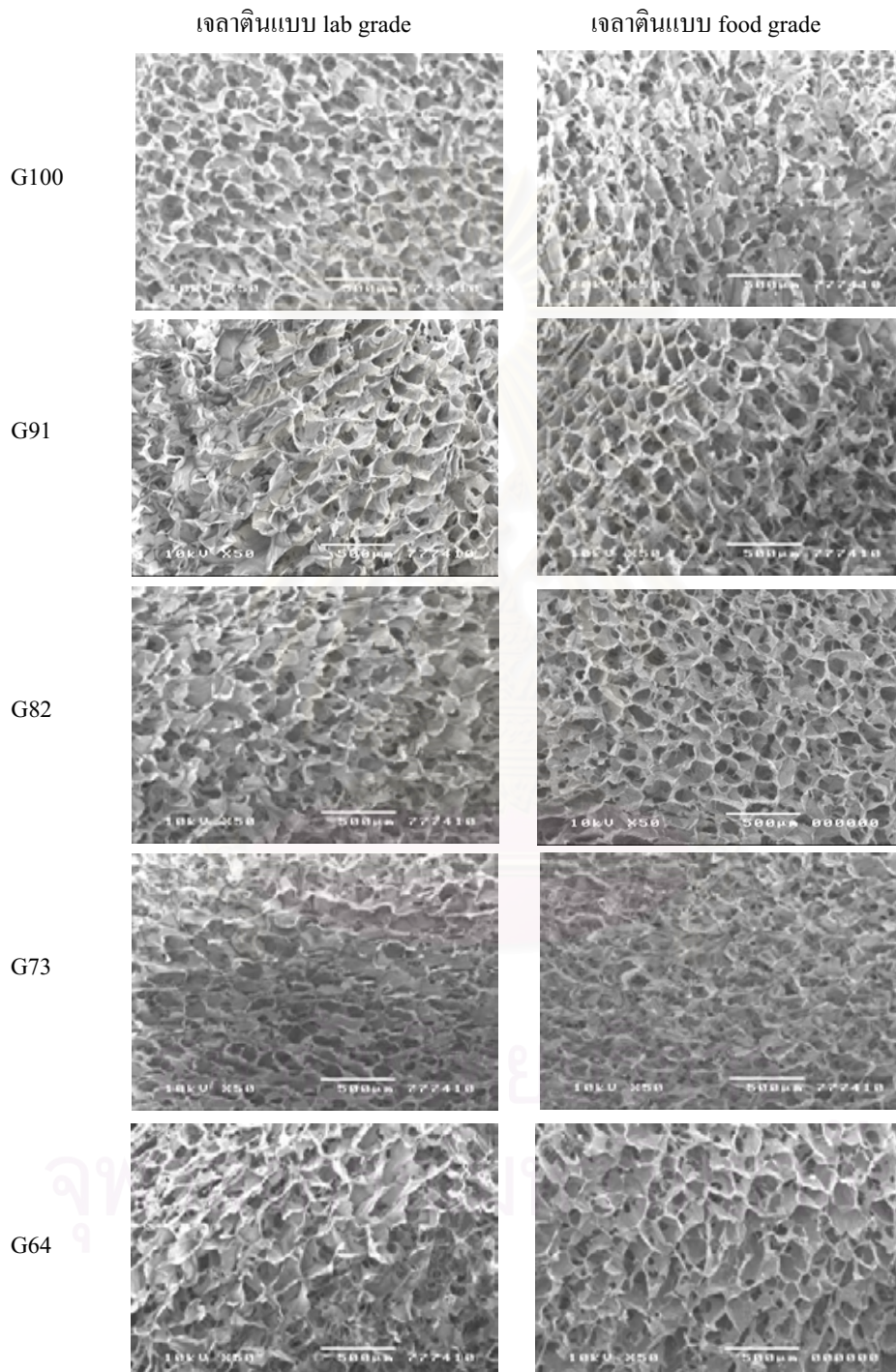
รูปที่ 4.1 แผนผังการทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ

4.1 โคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสม (blend)

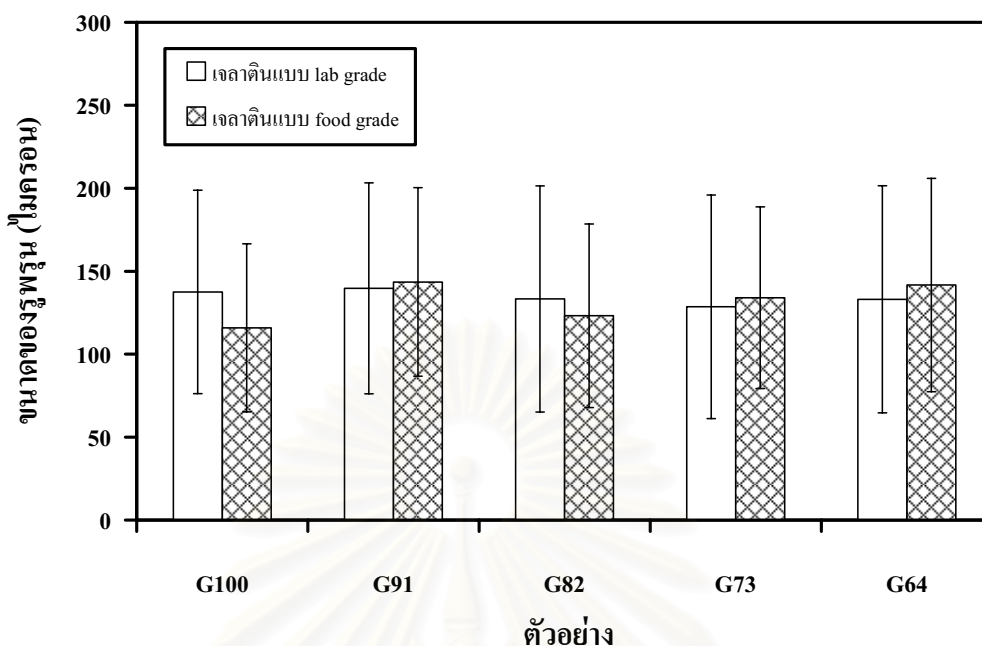
4.1.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล

โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปแบบผสมโดยใช้อัตราส่วนต่างๆกันของเจลาติน และคอลลาเจนไฮโดรไลเสท (ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก) มีพื้นผิวแสดงดังรูปที่ 4.2 พื้นผิวของโคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด ไม่ว่าจะใช้เจลาตินแบบ lab grade หรือ food grade และไม่ว่าจะมีสัดส่วนการใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทเท่าใด โดยมีขนาดของรูพรุนโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 100-150 ไมครอน (รูปที่ 4.3) สำหรับโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังจะมีความหนาของรูพรุนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 100-200 ไมครอน เพื่อที่เซลล์ fibroblast ซึ่งมีขนาดประมาณ 20 ไมครอน สามารถเจริญเติบโตภายในโคร่งเลี้ยงเซลล์ได้ [Freyman, TM. 2001] ซึ่งขนาดรูพรุนของโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ได้จากการทดลองจึงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงสามารถใช้ได้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade, food grade และคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade มีการหดตัวที่แตกต่างกันโดยโคร่งเลี้ยงเซลล์ G91 และ G82 มีการหดตัวร้อยละ 24.8 – 26.6 แต่ G73 และ G64 มีการหดตัวร้อยละ 11.5-12.0 เมื่อเทียบกับปริมาตรของสารละลายที่ใช้ขึ้นรูปก่อนการทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งในตอนเริ่มต้น (0.75 มิลลิลิตร) ซึ่งโคร่งเลี้ยงเซลล์ G73 และ G64 มีการหดตัวลงเกือบครึ่งเท่าเมื่อเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ G91 และ G82 และโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ food grade โดยโคร่งเลี้ยงเซลล์ G82, G73 และ G64 มีการหดตัวร้อยละ 12.0 ซึ่งน้อยกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100 และ G91 เกือบครึ่งเท่าซึ่งมีการหดตัวลงร้อยละ 22.6 อย่างไรก็ตามการหดตัวที่แตกต่างกันของโคร่งเลี้ยงเซลล์ผสมในแต่ละอัตราส่วนที่ผลิตจากเจลาตินต่างชนิดกันไม่ส่งผลต่อขนาดของรูพรุนของโคร่งเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด เนื่องจากขนาดของรูพรุนที่วัดได้ของโคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบมีค่าใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง น้ำหนักของโคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบที่ใช้เจลาตินแบบ lab grade อยู่ในช่วง 6.28-7.24 มิลลิกรัม โดยโคร่งเลี้ยงเซลล์ G73 และ G64 มีน้ำหนักต่ำกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การมีคอลลาเจนไฮโดรไลเสทเป็นองค์ประกอบจำนวนมากในโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปแบบนี้ทำให้เกิดการหดตัวของโคร่งเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าและ การหดตัวของโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade และ food grade ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก และโคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบที่ใช้เจลาตินทั้งสองชนิดมีน้ำหนักอยู่ในช่วง

6.44-6.60 มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโดยเฉลี่ยระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เจลลาตินต่างชนิดกันแล้ว พบว่าน้ำหนักโดยรวมมีค่าที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.2 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ โดยคำนวณให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.3 ขนาดรุกรุ่นของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ (mean \pm SD, n = 200)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเจลาตินแบบ food grade และ lab grade ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade และคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ (mean \pm SD, n = 5)

ตัวอย่าง	เจลาตินแบบ lab grade				
	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ความหนา (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ร้อยละการหดตัว
G100	14.11 \pm 0.12	3.58 \pm 0.30	6.66 \pm 0.11	0.55 \pm 0.04	26.66 \pm 1.33
G91	14.34 \pm 0.11*	3.57 \pm 0.15	6.38 \pm 0.42	0.57 \pm 0.02	24.88 \pm 2.77
G82	14.35 \pm 0.22	3.53 \pm 0.27	7.04 \pm 0.61	0.56 \pm 0.03	24.88 \pm 3.35
G73	14.68 \pm 0.27*	3.88 \pm 0.33	6.28 \pm 0.08*	0.65 \pm 0.06*	12.00 \pm 3.52*
G64	14.53 \pm 0.16*	4.03 \pm 0.12*	6.28 \pm 0.08*	0.66 \pm 0.02*	11.55 \pm 3.35*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

หมายเหตุ: 1) ปริมาตรเริ่มต้นในการขึ้นรูป = 0.75 มิลลิลิตร

2) มีการคำนวณเบื้องต้นให้โครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาตรของแข็งรวมทั้งหมดร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินแบบ food grade และคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ (mean \pm SD, n = 5)

ตัวอย่าง	เจลาตินแบบ food grade				
	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ความหนา (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ร้อยละการหดตัว
G100	14.19 \pm 0.11	3.55 \pm 0.25	6.60 \pm 0.10	0.56 \pm 0.04	22.66 \pm 2.66
G91	14.32 \pm 0.21	3.73 \pm 0.43	6.44 \pm 0.26	0.59 \pm 0.07	22.66 \pm 3.52
G82	14.28 \pm 0.17	3.88 \pm 0.25*	6.58 \pm 0.04	0.62 \pm 0.04*	12.00 \pm 2.66*
G73	14.48 \pm 0.08*	4.12 \pm 0.38*	6.50 \pm 0.14	0.67 \pm 0.06*	12.00 \pm 2.03*
G64	14.73 \pm 0.19*	3.66 \pm 0.54	6.54 \pm 0.05	0.62 \pm 0.09	12.00 \pm 2.66*

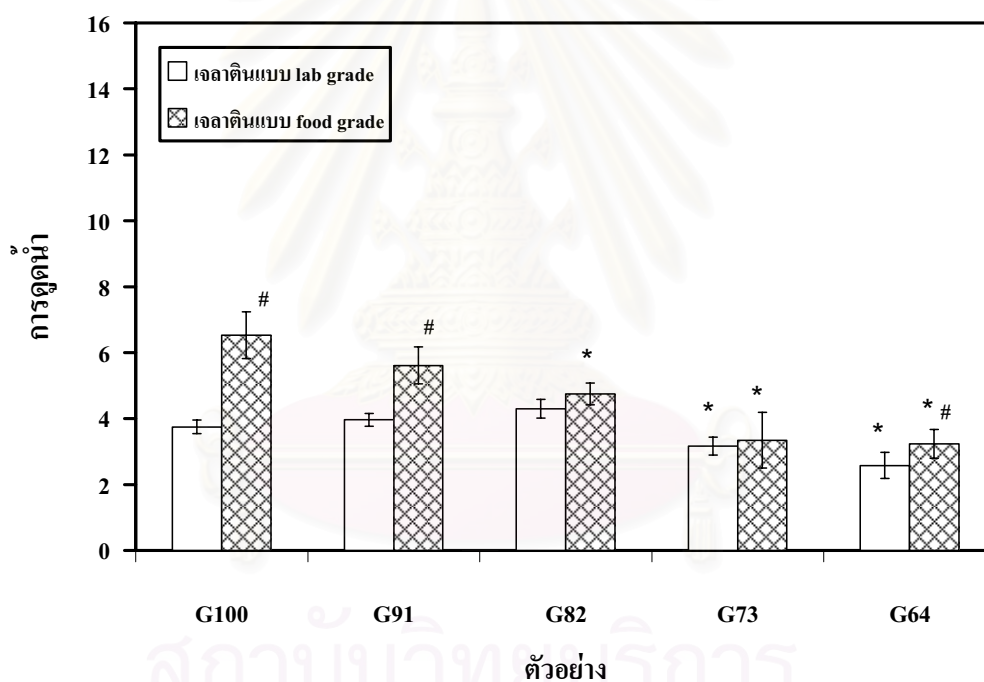
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

หมายเหตุ: 1) ปริมาตรเริ่มต้นในการขึ้นรูป = 0.75 มิลลิลิตร

2) มีการคำนวณเบื้องต้นให้โครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาณของแข็งรวมทั้งหมดร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

คุณสมบัติที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง ได้แก่ การดูดน้ำซึ่งสามารถบ่งบอกถึงความสามารถของโครงเลี้ยงเซลล์ในการดูดซับของเหลวซึ่งเป็นแหล่งอาหารและสื่อช่วยพาสารชีวโมเลกุลที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเซลล์ รวมทั้งการรับออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ เมื่อนำไปปลูกถ่ายในร่างกาย นอกจากนั้นการดูดซับน้ำยังมีผลต่อการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เนื่องจากหากโครงเลี้ยงเซลล์สามารถดูดซับน้ำไว้ได้มาก การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์มักจะเกิดขึ้นได้ง่ายเนื่องจากเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในน้ำสามารถเข้าไปทำลายพันธะภายในโมเลกุลของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ง่ายรวมทั้งบางพันธะสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยโมเลกุลของน้ำ การดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์อาจเป็นตัวบ่งชี้ระดับการเชื่อมโยงพันธะเนื่องจากหากโมเลกุลภายในโครงเลี้ยงเซลล์เกิดการเชื่อมโยงพันธะมากความสามารถในการดูดซับน้ำภายในโครงเลี้ยงเซลล์จะลดลง [Liu, H. และคณะ, 2004] โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินต่างชนิดกัน ได้แก่ เจลาตินแบบ lab grade และ food grade และอัตราส่วนของเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทแตกต่างกัน ได้แก่ 100:0, 90:10, 80:20, 70:30 และ 60:40 (G100, G91, G82, G73 และ G64 ตามลำดับ) มีการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.4) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade มีการดูดน้ำอยู่ในช่วง 2.0-3.5 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น และการดูดน้ำมีแนวโน้มลดลงเมื่อลดปริมาณเจลาติน โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์

G73 และ G64 การควบแน่นมีค่าต่ำกว่าโครมเลียงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนโครมเลียงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ food grade มีการควบแน่นอยู่ในช่วง 2.5-7.5 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น และการควบแน่นมีแนวโน้มลดลงเมื่อลดปริมาณเจลาตินเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะโครมเลียงเซลล์ G82, G73 และ G64 การควบแน่นมีค่าต่ำกว่าโครมเลียงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญ โครมเลียงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ food grade มีการควบแน่นที่สูงกว่าโครมเลียงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade ทุกอัตราส่วน อนึ่ง แม้ว่าโครมเลียงเซลล์ที่มีคอลลาเจนไฮโดรไลเสทเป็นองค์ประกอบสูงๆ จะมีการหดรัดตัวน้อยกว่าโครมเลียงเซลล์ที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 4.1 และ 4.2) แต่ก็ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณน้ำที่โครมเลียงเซลล์สามารถเก็บกักไว้ได้



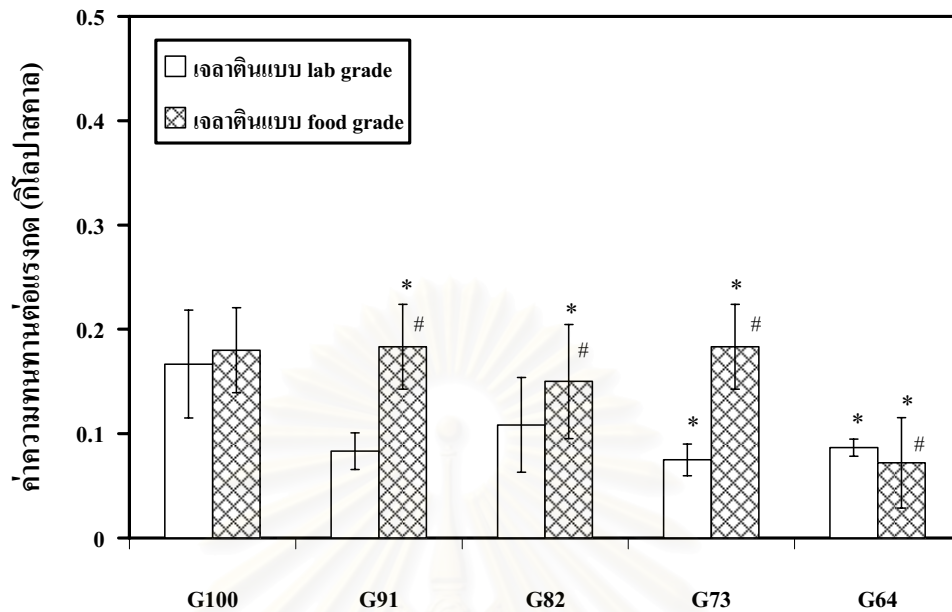
รูปที่ 4.4 การควบแน่นของโครมเลียงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ (mean \pm SD, n = 4)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเจลาตินแบบ food grade และ lab grade ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ในรูปความทนทานต่อแรงกด (Compressive modulus) ซึ่งบ่งบอกถึงความแข็งแรงทางโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อที่จะต้านทานแรงที่จะเกิดขึ้นระหว่างการปลูกถ่ายในสิ่งมีชีวิต โดยจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพื่อที่จะพัฒนา กลายเป็นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ [Naughton, GK. และคณะ, 2002; Freyman, TM. 2001] ค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมแสดงดังรูปที่ 4.5 วัตถุประสงค์ที่ใช้และอัตราส่วนขององค์ประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์มีผลต่อความทนทานต่อแรงกด โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade มีค่าความทนทานต่อแรงกดอยู่ในช่วง 0.05 – 0.20 กิโลปาสกาล และค่าความทนทานต่อแรงกดมีแนวโน้มลดลงเมื่อลดปริมาณเจลาติน โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์ G73 และ G64 ค่าความทนทานต่อแรงกดมีค่าต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก food grade มีค่าความทนทานต่อแรงกดอยู่ในช่วง 0.05 – 0.25 กิโลปาสกาล และค่าความทนทานต่อแรงกดมีแนวโน้มลดลงเมื่อลดปริมาณเจลาตินเช่นกัน โครงเลี้ยงเซลล์ผสมทุกสูตรมีความทนทานต่อแรงกดมีค่าต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญ ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เจลาตินแบบ lab grade มีค่าต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เจลาตินแบบ food grade ทุกอัตราส่วนเมื่อมีการผสมคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ซึ่งค่าความทนทานต่อแรงกดที่ต่างกันอาจเกิดจาก bloom ของเจลาตินแบบ food grade และ lab grade ที่ไม่เท่ากันซึ่งมีค่า bloom เท่ากับ 300 และ 116 ตามลำดับ สำหรับค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนังซึ่งรายงานโดย Freyman, TM. ในปี ค.ศ. 2001 พบว่าค่า Compressive modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์ collagen-GAG ที่เตรียมโดยวิธีการทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง มีค่า 0.029 กิโลปาสกาล ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำสำหรับนำมาใช้ปลูกถ่ายทดแทนผิวหนัง ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมทุกแบบจึงมีค่าความทนทานต่อแรงกดอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สำหรับการปลูกถ่ายในสิ่งมีชีวิต

จากผลการทดลองข้างต้น ค่าความทนแรงกด และการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ food grade มีค่าสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินแบบ lab grade (รูปที่ 4.4 และ 4.5) ดังนั้นจึงเลือกใช้เจลาตินแบบ food grade ในการทำการทดลองอื่นๆ ต่อไป



ตัวอย่าง

รูปที่ 4.5 ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์แห้งแบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ (mean \pm SD, n = 6)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเจลาตินแบบ food grade และ lab grade ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

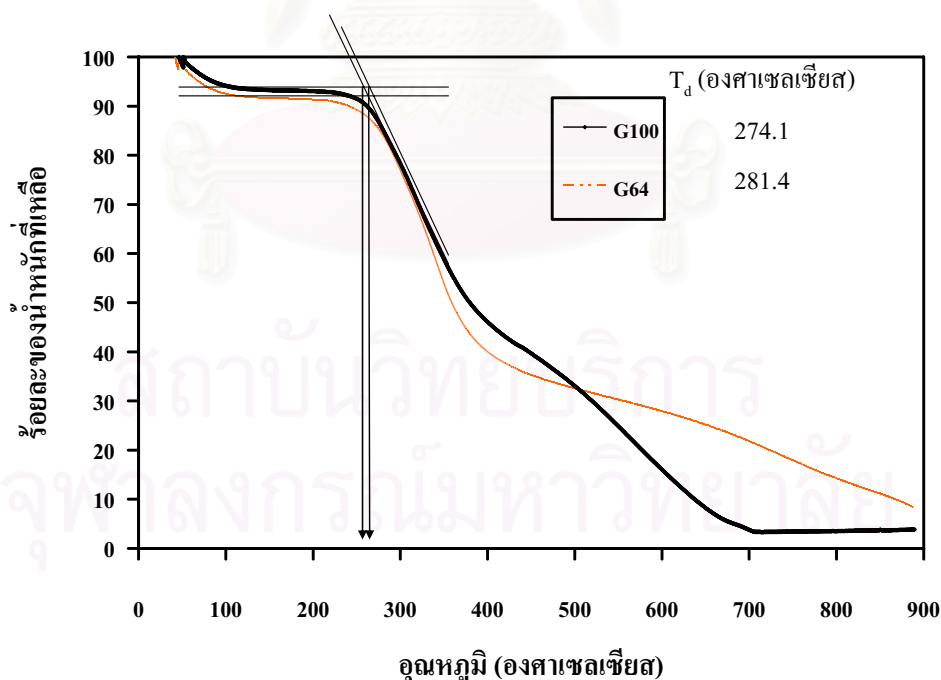
การวิเคราะห์อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ (T_d) เพื่อเปรียบเทียบความเสถียรทางอุณหภูมิของโครงเลี้ยงเซลล์ G100, G91, G82, G73 และ G64 ซึ่งความเสถียรทางอุณหภูมินี้หาได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer (TG/DTA) โดยการหาจุดตัดจากเส้นตรงสองเส้นจากกราฟโดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer (TG/DTA) แสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งเป็นตัวอย่างการประมาณค่าอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 และ G64 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 281.4 และ 274.1 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 274-281 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.3) และอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพมีแนวโน้มลดลงเมื่อลดปริมาณของเจลาติน โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์ G64 ที่อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากมีอัตราส่วนของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทมากที่สุด มีรายงานการศึกษาอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของเจลาตินฟิล์ม ซึ่งผลิตจากเจลาติน USP grade (หมายถึงสารเคมีที่รับรองคุณภาพตามมาตรฐาน United States Pharmacopoeia หรือเป็นสารเคมีคุณภาพชั้น

เภสัชกรรม (pharmaceutical grade)) พบอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพที่ 296 องศาเซลเซียส และเมื่อผสมเจลาตินกับ sorbital พบว่าอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับฟิล์มเจลาติน สาเหตุที่อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากความเป็น plasticizer หรือ สารเสริมสภาพพลาสติกของ sorbital ซึ่งนิยมใส่ในพอลิเมอร์เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น [Barreto, PLM. 2002]

ตารางที่ 4.3 อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม (mean \pm SD, n = 3)

ตัวอย่าง	T _d (องศาเซลเซียส)
G100	281.6 \pm 3.1
G91	277.1 \pm 4.7
G82	275.2 \pm 3.8
G73	275.5 \pm 3.4
G64	274.0 \pm 3.0*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

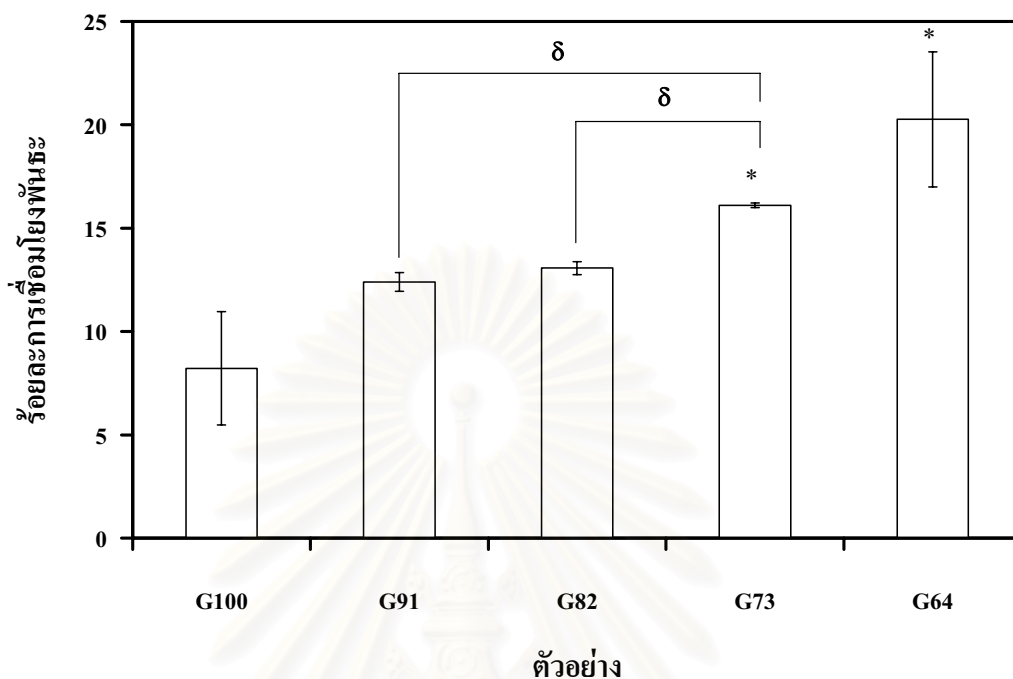


รูปที่ 4.6 ตัวอย่างกราฟการวิเคราะห์อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 และ G64 ที่เตรียมโดยวิธีการขึ้นรูปแบบผสมโดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer (TG/DTA)

4.1.2 สมบัติทางเคมี

ก. ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะ (Degree of crosslinking)

การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้วิธี 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) ซึ่งวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระหรือ $-NH_2$ ในโมเลกุลของโปรตีน [Sheu, MT. และคณะ, 2001] ในการศึกษาจะมีการวัดปริมาณการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธี TNBS สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมเท่านั้น เนื่องจากสามารถควบคุมปริมาณของแข็งทั้งหมดในโครงเลี้ยงเซลล์ไว้ที่ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์แบบปรับปรุงพื้นผิว ปริมาณของแข็งทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงตามปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลสที่เติมลงในกระบวนการปรับปรุงพื้นผิว การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมแสดงดังรูปที่ 4.7 ซึ่งคำนวณจากผลต่างของปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการเชื่อมโยงพันธะและหลังจากเชื่อมโยงพันธะ ในการทดลองครั้งนี้ใช้การเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน (Dehydrothermal treatment) ซึ่งมีการสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุลในปฏิกิริยา condensation ซึ่งเชื่อมโยงพันธะหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิลิก ($-COOH$) ภายในโมเลกุลของเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลสเกิดเป็นพันธะ peptide [Nagai, N. และคณะ, 2004] ซึ่งถ้าปริมาณกรดอะมิโนหลังจากการเชื่อมโยงพันธะเหลือน้อยลงแสดงว่าเกิดการเชื่อมโยงพันธะภายในโมเลกุลมาก ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ในช่วงร้อยละ 5-25 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดปริมาณเจลาติน โดยเฉพาะร้อยละการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ G64 มีค่าสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญ สาเหตุที่ปริมาณการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้นเมื่อโครงเลี้ยงเซลล์มีองค์ประกอบของคอลลาเจนไฮโดรไลสมากขึ้นเกิดจากขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่าของคอลลาเจนไฮโดรไลส ทำให้มีความแตกต่างของปริมาณ $-NH_2$ ก่อนและหลังการเชื่อมโยงพันธะมาก การเชื่อมโยงพันธะมีความสัมพันธ์กับการดูดซับน้ำโดยหากโครงเลี้ยงเซลล์มีการเชื่อมโยงพันธะมากความสามารถในการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์จะลดลง [Liu, H. และคณะ, 2004] อย่างไรก็ตามค่าความทนทานต่อแรงกด (compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์ G64 มิได้มีค่าสอดคล้องกับร้อยละการเชื่อมโยงพันธะ เนื่องจากขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนไฮโดรไลสมีขนาดเล็กมาก (มวลโมเลกุลประมาณ 1,000-3,000 ดาลตัน) และมีสายของโมเลกุลที่สั้นกว่าเจลาตินทำให้คอลลาเจนไฮโดรไลสมีหมู่อะมิโนอิสระมากกว่าเจลาตินทำให้สามารถเกิดการเชื่อมโยงพันธะภายในโมเลกุลของคอลลาเจนไฮโดรไลสและระหว่างโมเลกุลคอลลาเจนไฮโดรไลสและเจลาตินได้มากโดยที่ไม่มีการปรับปรุงสมบัติทางกลให้แก่โครงเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 4.7 ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ (mean ± SD, n = 4)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ข. ค่ามุมสัมผัสน้ำ (water contact angle)

การหาค่ามุมสัมผัสน้ำบนแผ่นฟิล์มซึ่งสาเหตุที่ต้องขึ้นรูปเป็นแบบฟิล์มเนื่องจากข้อจำกัดทางวิธีการวัด ซึ่งจะต้องมีการหยดน้ำลงบนแผ่นฟิล์มแล้วจับภาพลักษณะของหยดน้ำโดยใช้กล้องวิดีโอและคำนวณหาค่ามุมสัมผัส โครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งดูดซับน้ำได้ดีจะทำให้หยดน้ำซึมผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว การหาค่ามุมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์ม เจลาติน/คอลลาเจนไฮโดรไลเสท ด้วยวิธีนี้ สามารถใช้ประเมินความชอบน้ำ (hydrophilicity) และความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) จากตารางที่ 4.4 ค่ามุมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์มมีแนวโน้มลดลงเมื่อลดปริมาณเจลาติน ซึ่งแสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติชอบน้ำมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ดังที่แสดงให้เห็นจากค่าที่วัดได้จากแผ่นฟิล์มผสมทุกสูตรมีค่ามุมสัมผัสน้ำต่ำกว่าแผ่นฟิล์ม G100 อย่างมีนัยสำคัญ ความชอบน้ำ และความไม่ชอบน้ำ ส่งผลต่อการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความชอบน้ำมากถึงแม้จะนำพาสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ดีแต่มีการย่อยสลายที่เร็ว

ดังนั้นในการนำโครมเล็งเซลล์ไปปลูกถ่ายในร่างกายจึงต้องพิจารณาค่ามุมสัมพัทธ์ที่เหมาะสมด้วย มีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาลักษณะสมบัติของพื้นผิวของถุงหุ้มหัวใจของหมูและเชื่อมโยงพันธะด้วย genipin และ glutaraldehyde โดยใช้วิธีการวัดค่ามุมสัมพัทธ์น้ำ สรุปได้ว่าตัวอย่างที่ให้ค่ามุมสัมพัทธ์ที่น้อยกว่าหรือมีมุมที่เล็กกว่าจะมีความเข้ากันได้ดีกับร่างกายได้ดีกว่าตัวอย่างที่มีค่ามุมสัมพัทธ์ที่มากกว่า [Hench, LL. 1982]

ตารางที่ 4.4 ค่ามุมสัมพัทธ์น้ำบนพื้นผิวของฟิล์มบางแบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

ตัวอย่าง	ค่ามุมสัมพัทธ์น้ำ (องศา)
G100	102.5 \pm 1.6
G91	85.6 \pm 0.5*
G82	72.7 \pm 1.0*
G73	66.5 \pm 0.6*
G64	64.1 \pm 1.6*

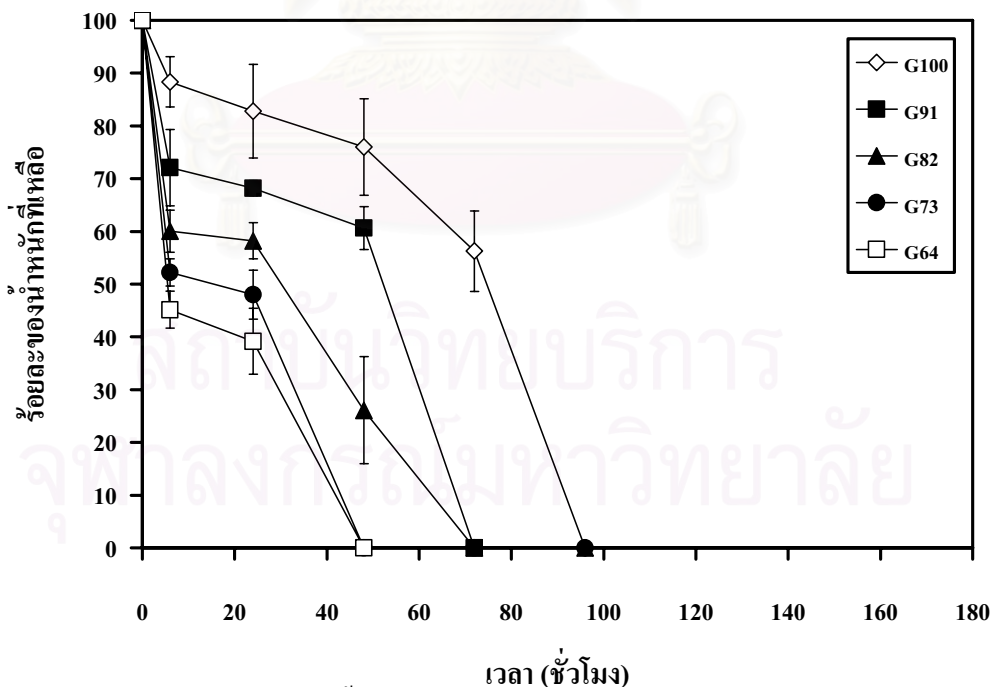
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

4.1.3 สมบัติทางชีววิทยา

ก. การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biodegradation)

การศึกษการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครมเล็งเซลล์โดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) [Lee, SB. 2003; Ma, L. 2004] เพื่อหาการย่อยสลายในรูปของร้อยละของน้ำหนักที่หายไปเทียบกับเวลา ทำโดยการแช่โครมเล็งเซลล์แบบผสมที่มีน้ำหนักเฉลี่ยที่ 5.5 ± 0.12 มิลลิกรัม ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่ความเข้มข้น 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร (1 มิลลิกรัม = 125 ยูนิต) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ เพื่อจำลองสภาวะของร่างกาย [Campbell, N.A. และคณะ, 1999] การย่อยสลายของโครมเล็งเซลล์ทุกแบบในเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร อยู่ในช่วง 2-4 วัน (รูปที่ 4.8) และเมื่อลดปริมาณเจลาตินการย่อยสลายมีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งนี้เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเสทมีมวลโมเลกุลที่ต่ำ (ประมาณ 1,000 - 3,000 ดาลตัน) ขณะที่เจลาตินมีมวลโมเลกุลที่สูงกว่า (ประมาณ 100,000 ดาลตัน)

ทำให้เอนไซม์คอลลาจีเนสที่ละลายอยู่ใน PBS สามารถเข้าไปทำลายพันธะภายในโมเลกุลของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสได้ง่ายกว่าเจลาติน ซึ่งผลการย่อยสลายนี้สอดคล้องกับผลการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำเนื่องจากความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำมีผลต่อการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ถ้าโครงเลี้ยงเซลล์มีความชอบน้ำมาก (hydrophilicity) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่สูงจึงมีการย่อยสลายที่เร็ว แนวโน้มของการย่อยสลายที่เร็วขึ้นเมื่อมีปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซสสูงขึ้น สอดคล้องกับแนวโน้มของความทนแรงกดและอุณหภูมิในการเชื่อมสภาพอีกด้วย (รูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.3) เมื่อนำไปปลูกถ่ายในร่างกายการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ควรจะควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใหม่ สำหรับการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนังควรจะอยู่ในช่วง 2 – 4 สัปดาห์ [Yannas, 2001] แต่การทดลองนี้แสดงผลเพื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มเท่านั้น โดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 0.1 ยูนิต/มิลลิลิตร สาเหตุที่ไม่สามารถเทียบกับการย่อยสลายเมื่อนำมาปลูกถ่ายในร่างกายเนื่องจากภายในร่างกายมีปัจจัยหลายอย่างนอกเหนือจากการย่อยสลายจากเอนไซม์คอลลาจีเนส อาทิเช่น แรงกลที่เกิดจากการปลูกถ่าย และอิทธิพลจากเอนไซม์ประเภทอื่นที่อาจทำให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการย่อยสลายได้ ซึ่งค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) ของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซสแสดงในตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.8 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเซส) ต่างๆ ในสารละลายคอลลาจีเนส (0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร) (mean \pm SD, n=4)

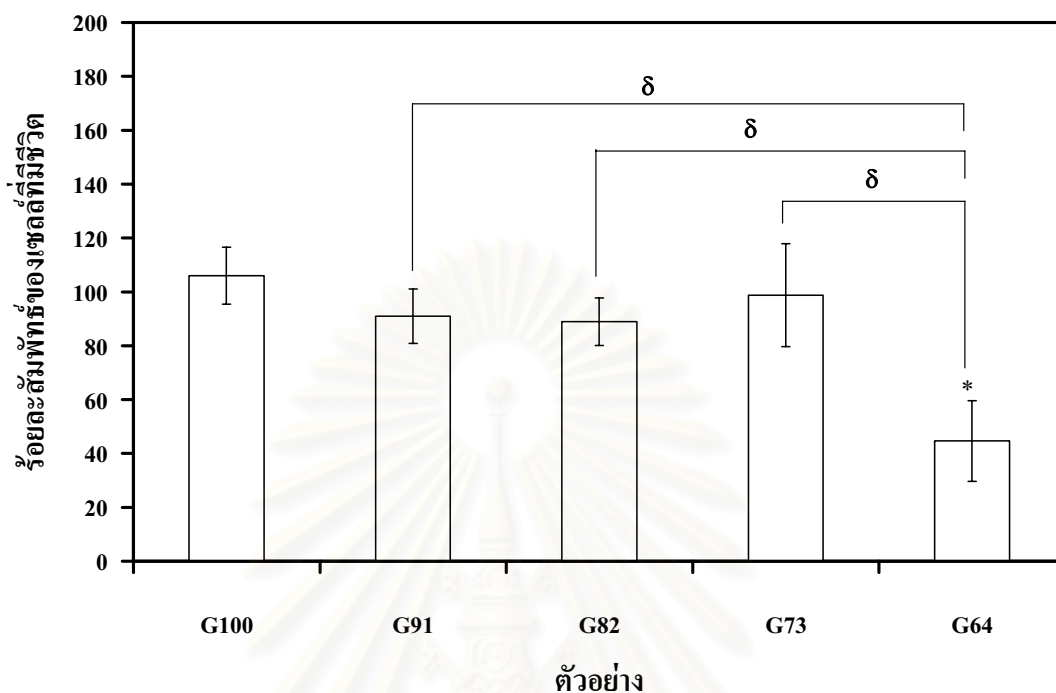
ตารางที่ 4.5 ค่าครึ่งชีวิต (haft life) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลสที่อัตราส่วน (เจลาติน:คอลลาเจนไฮโดรไลส) ต่างๆ

ตัวอย่าง	haft life; $t_{1/2}$ (ชั่วโมง)
G100	75.2
G91	52.1
G82	32.0
G73	17.5
G64	8.2

หมายเหตุ: $t_{1/2}$ คำนวณจากเวลาที่น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงร้อยละ 50 หลังจากการถูกย่อยสลายโดยการลากจุดตัดกราฟในโปรแกรม Excel

ข. ความเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biocompatibility)

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมมาเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 (mouse fibroblast) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากชั้นผิวหนังแท้ของหนูเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.9) พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยบนโครงเลี้ยงเซลล์ G73 และลดต่ำลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ G64 เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100 ที่เทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตมีแนวโน้มลดลงอย่างเด่นชัดในโครงเลี้ยงเซลล์ G64 เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ G64 เริ่มเกิดการย่อยสลายที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกร่างกาย ที่โครงเลี้ยงเซลล์ G64 มีการย่อยสลายเร็วกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบอื่น สาเหตุที่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของคอลลาเจนไฮโดรไลสในโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ยังคงมีค่าใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100 อาจเนื่องมาจากโมเลกุลในคอลลาเจนไฮโดรไลสที่มีชนิดของกรดอะมิโนที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับโมเลกุลของเจลาติน และเจลาตินยังมีส่วนที่ส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่องจากโมเลกุลของเจลาตินมีส่วนประกอบของ Arg-Gly-Asp (RGD)-like sequence ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการยึดเกาะ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดย (RGD)-like sequence จะไปจับกับ integrin receptor ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ [Huang, Y. และคณะ, 2005]



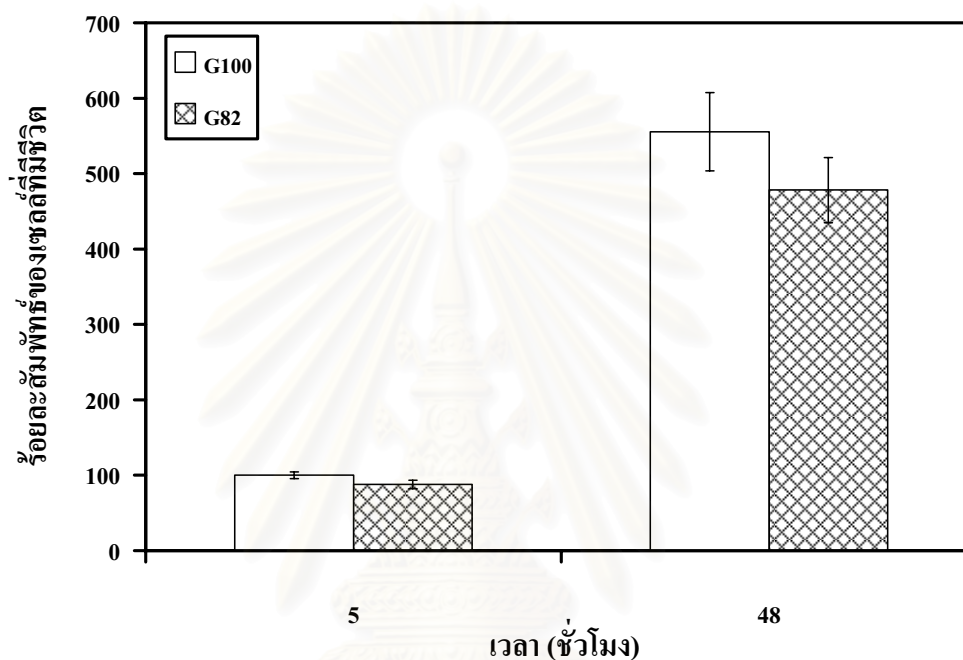
รูปที่ 4.9 รอยละสัมผัสของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ประสิทธิภาพของการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติแบบฟองน้ำขึ้นอยู่กับความเข้ากันได้ของสารที่นำมาเป็นวัตถุดิบ และรูปร่างโครงสร้างยังมีผลมากเราจึงต้องการทดสอบผลขององค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบเพียงอย่างเดียว โดยผลิตฟิล์มที่จะมีพื้นผิวสัมผัสกับเซลล์ได้โดยตรงในอัตราการผสมเดียวกันแล้วมาเลี้ยงเซลล์ L929 ที่เวลา 5 ชั่วโมงเพื่อพิจารณาการยึดเกาะของเซลล์ และ 48 ชั่วโมงเพื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์ (รูปที่ 4.10) พบว่าการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟิล์ม G82 ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตมีค่าใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100 โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยมี Doubling time (t_D) หรือเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเซลล์บนแผ่นฟิล์ม G100 ที่ประมาณ 15 ชั่วโมง และบนแผ่นฟิล์ม G82 ที่ประมาณ 18 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าต่ำกว่าแผ่นฟิล์ม G100 ดังนั้นปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ผสมลงไปโครงเลี้ยงเซลล์จึงไม่มีผลในการส่งเสริมการยึดเกาะและการ

เจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบพองน้ำในรูปที่ 4.9



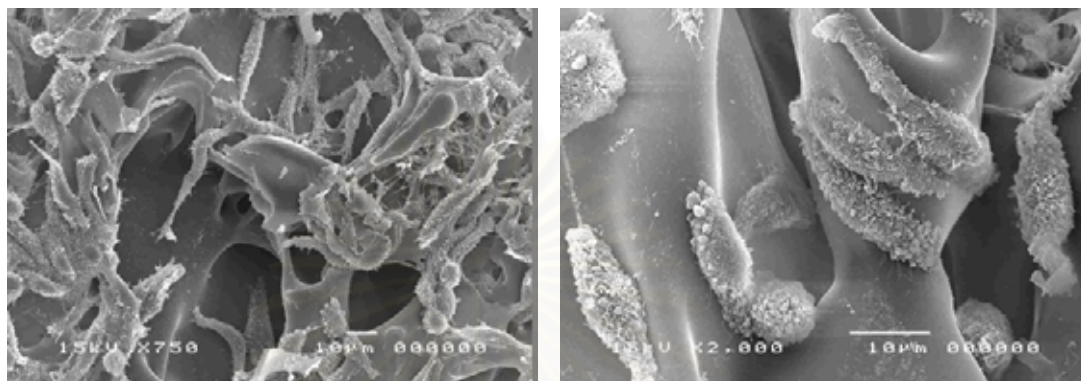
รูปที่ 4.10 ร้อยละสัมผัสพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100 และ G82 หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

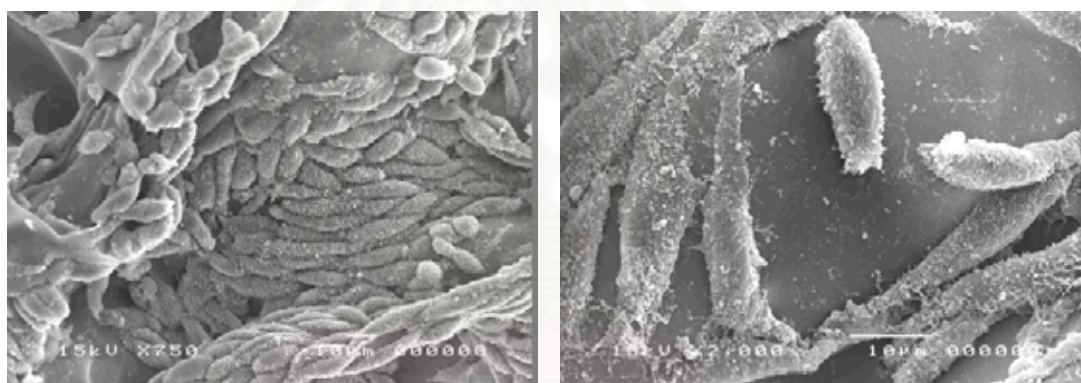
δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ภาพถ่ายเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่อัตราส่วน (เจลาติน : คอลลาเจนไฮโดรไลเสท) ต่างๆ ในบริเวณพื้นผิวด้านบนของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด หลังจากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน แสดงในรูปที่ 4.11 โดยจะเห็นว่าลักษณะรูปร่างการเจริญเติบโตของเซลล์ และปริมาณการยึดเกาะของเซลล์มีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยในวันที่ 7 หลังจากการเลี้ยงเซลล์โครงเลี้ยงเซลล์ G73 และ G64 เกิดการย่อยสลาย จึงไม่สามารถถ่ายภาพเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้

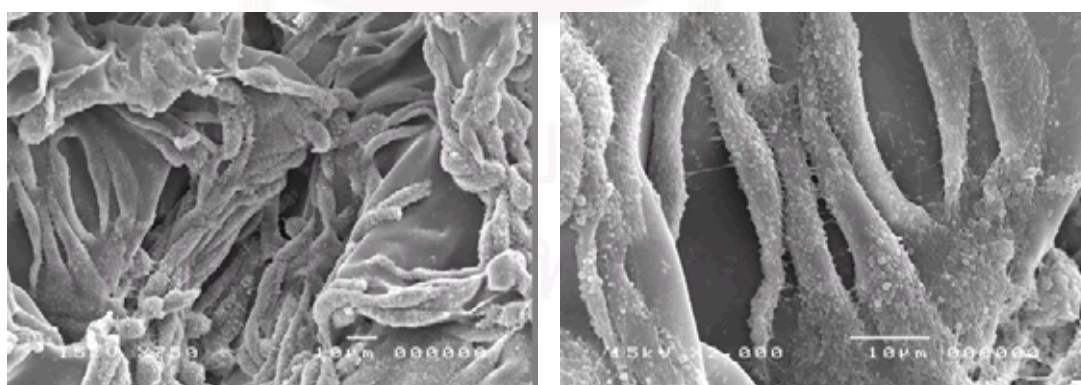
G100



G91



G82



รูปที่ 4.11 ภาพถ่ายเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ที่อัตราส่วน 100:0 (G100), 90:10(G91) และ 80:20(G82) หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน

4.2 โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท

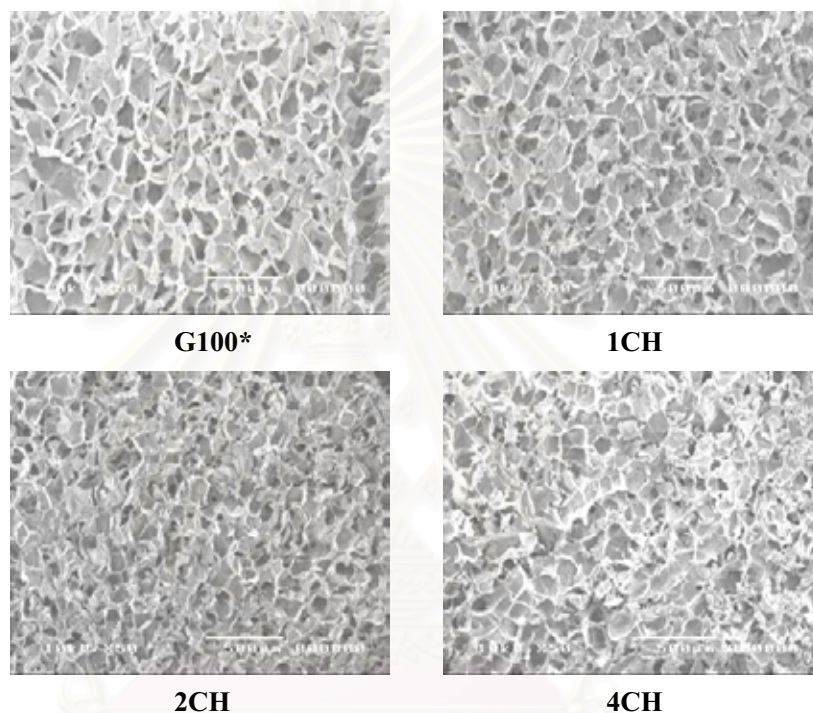
กระบวนการขึ้นรูปโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนเป็นกระบวนการขึ้นรูปโดยใช้โคร่งเลี้ยงเซลล์ G100 จากโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสมมาเคลือบพื้นผิวด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 4 โดยน้ำหนัก (1CH, 2CH และ 4CH) ตามลำดับ ลักษณะสมบัติของโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกระบวนการผลิตโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทนี้ไม่สามารถเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตโดยกระบวนการขึ้นรูปโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสมได้ เนื่องจากกระบวนการผลิตโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันมากและปริมาณของแข็งทั้งหมดในโคร่งเลี้ยงเซลล์ไม่เท่ากัน โดยวิธีนี้โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินจะถูกนำไปเชื่อมโยงพันธะโดยการให้ความร้อน (DHT) ก่อน ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเคลือบด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเชื่อมโยงพันธะโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล

โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปโดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ กันของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทปรับปรุงพื้นผิว G100 แสดงดังรูปที่ 4.12 ปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่เพิ่มขึ้นทำให้โคร่งเลี้ยงเซลล์มีขนาดรูพรุนที่เล็กลง แต่ยังคงมีรูพรุนต่อเนื่องอย่างสม่ำเสมอเช่นเดียวกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100* ขนาดของรูพรุนโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 70-150 ไมครอน (รูปที่ 4.13) และขนาดของรูพรุนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท แสดงถึงปริมาณที่เพิ่มขึ้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทบนพื้นผิวของโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาติน

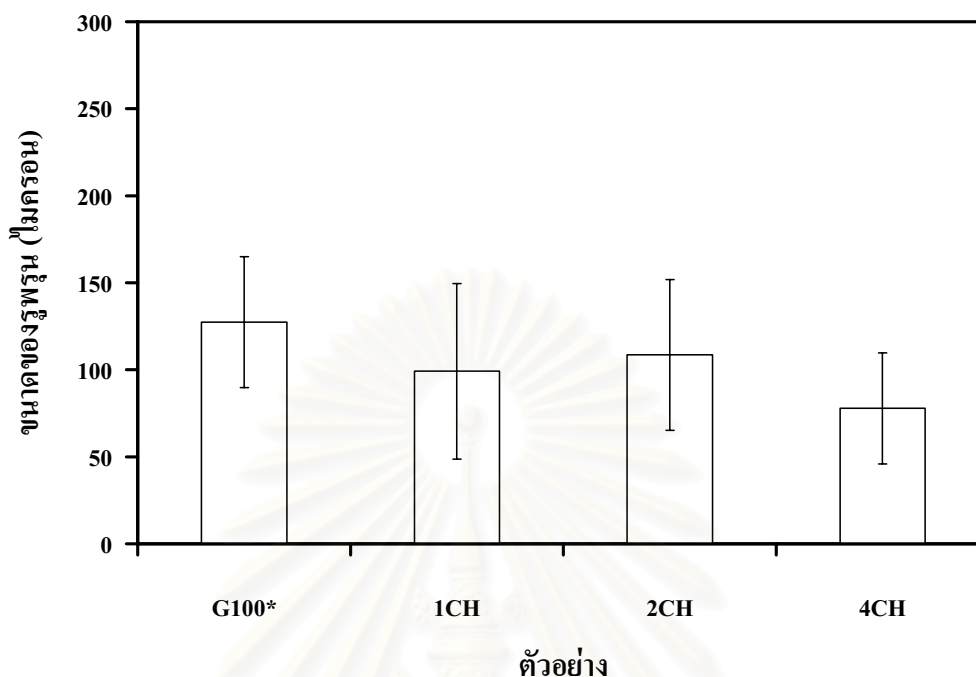
เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนาแน่น ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.6 มีการหดตัวของโคร่งเลี้ยงเซลล์หลังกระบวนการผลิตโคร่งเลี้ยงเซลล์ทั้งกระบวนการ โดยมีปริมาตรเริ่มต้นที่ 0.75 มิลลิลิตร โดยโคร่งเลี้ยงเซลล์ 2CH และ 4CH มีการหดตัวมากกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100 อย่างมีนัยสำคัญซึ่งคล้ายกับการหดตัวของโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสมในตารางที่ 4.2 โดยหากมีปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทมากจะหดตัวน้อยกว่า เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักของโคร่งเลี้ยงเซลล์ โคร่งเลี้ยงเซลล์ 1CH, 2CH และ 4CH มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100* เนื่องจากน้ำหนักเพิ่มตามปริมาณคอลลาเจน

ไฮโดรไลเซสที่เคลือบบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินซึ่งส่งผลต่อขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์โดยปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่เพิ่มขึ้นนั้นทำให้รูพรุนมีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่าการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีผลต่อขนาดรูพรุน



รูปที่ 4.12 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 ขนาดรูปทรงของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=200) * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

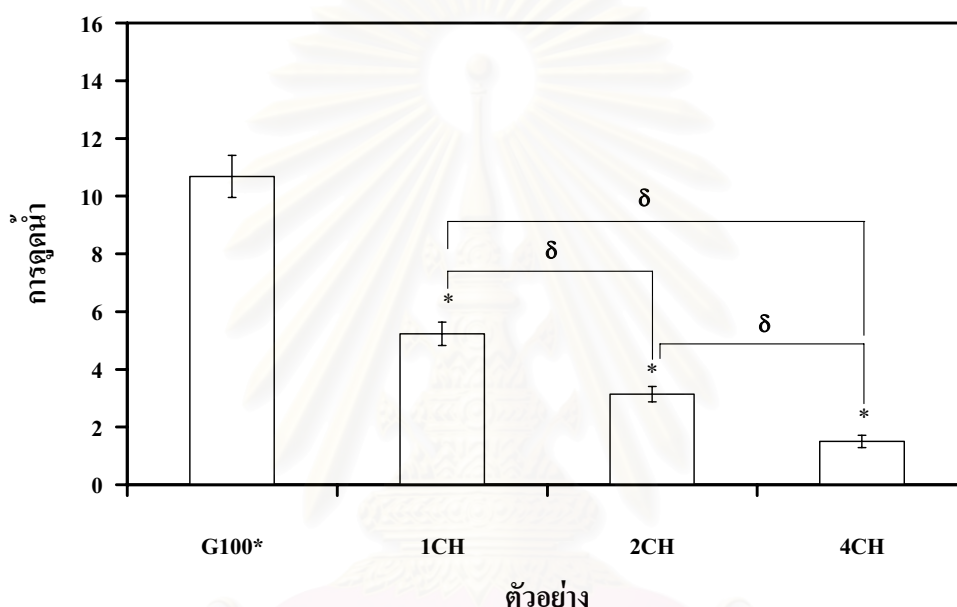
ตารางที่ 4.6 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n = 5)

ตัวอย่าง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ความหนา (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ร้อยละการหดตัว
G100*	14.06 \pm 0.11	3.89 \pm 0.16	6.4 \pm 0.07	0.60 \pm 0.02	17.33 \pm 2.66
1CH	14.84 \pm 0.15*	3.97 \pm 0.21	14.02 \pm 0.11*	0.68 \pm 0.04*	17.33 \pm 4.07
2CH	14.93 \pm 0.05*	4.13 \pm 0.13*	21.02 \pm 0.59*	0.72 \pm 0.02*	6.66 \pm 2.66*
4CH	14.93 \pm 0.10*	4.03 \pm 0.27	37.22 \pm 1.15*	0.70 \pm 0.06*	4.00 \pm 2.66*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

หมายเหตุ: ปริมาตรเริ่มต้นในการขึ้นรูป = 0.75 มิลลิลิตร

น้ำหนักหลังการทำให้อัมตด้วยน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 1-12 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น การควบแน่นลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท โครงเลี้ยงเซลล์ 1CH, 2CH และ 4CH มีการควบแน่นต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100* อย่างมีนัยสำคัญ(รูปที่ 4.14) ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ 3 แบบนี้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสท (ตารางที่ 4.6)



รูปที่ 4.14 การควบแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ (mean ± SD, n=4)

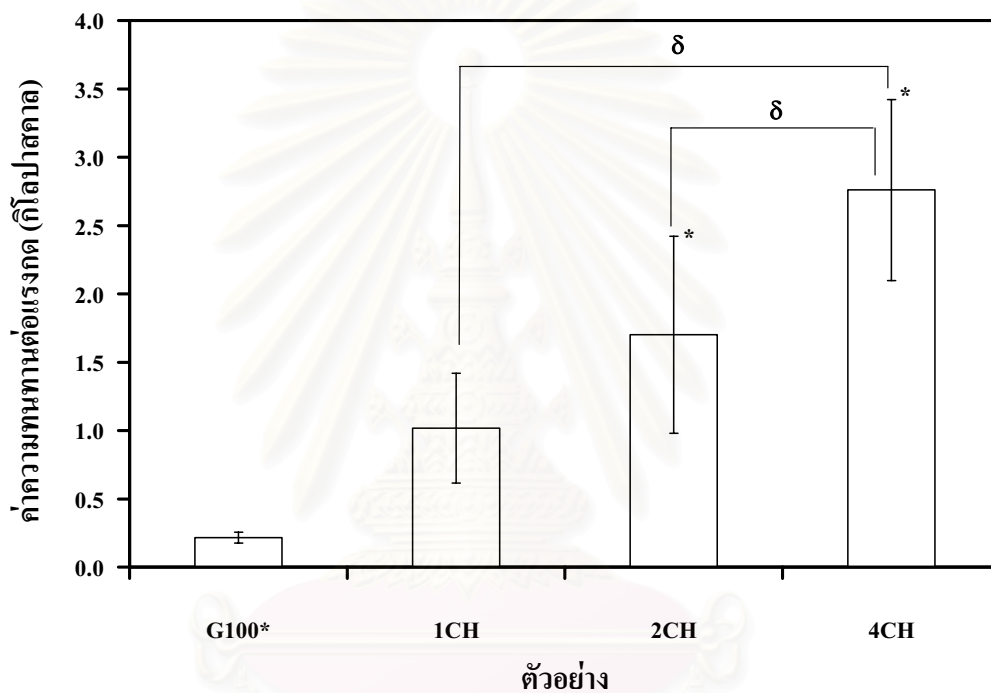
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 0.25 – 3.5 กิโลปาสคาล (รูปที่ 4.15) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท โดยโครงเลี้ยงเซลล์ 1CH, 2CH และ 4CH มีค่าความทนทานต่อแรงกดสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าความทนทานแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากปริมาณของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่มีอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้นจึงสามารถรับแรงกดได้มาก

โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทไม่มีการวิเคราะห์หาร้อยละการเชื่อมโยงพันธะแบบในหัวข้อ 4.1.2 ก. เนื่องจากเราไม่สามารถกำหนดปริมาณเนื้อสาร

ทั้งหมด (total solid) ในโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรให้เท่าๆ กันได้ อย่างไรก็ตามดังที่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการเชื่อมโยงพันธะ ค่าความทนทานต่อแรงกด และปริมาณการดูดซับน้ำ การเชื่อมโยงพันธะเกิดขึ้นมากจะทำให้มีค่าความทนทานต่อแรงกดที่สูงขึ้นและปริมาณการดูดซับน้ำน้อยลง รูปที่ 4.14 และ 4.15 อาจแสดงให้เห็นระดับการเชื่อมโยงพันธะที่สูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อมีการเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทบนผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ G100*



รูปที่ 4.15 ความทนทานต่อแรงกด (compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ

(mean \pm SD, n=6) * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

อุณหภูมิในการเชื่อมสภาพโดยเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 267-283 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.7) และอุณหภูมิในการเชื่อมสภาพมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์ 4CH อุณหภูมิในการเชื่อมสภาพมีค่าต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100* อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทสูงสุดเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบอื่นๆ การที่อุณหภูมิในการเชื่อมสภาพมีค่าลดลงตามปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ใช้อาจเนื่องจากโครงสร้างของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่มีความเสถียรทางความ

ร้อนน้อยกว่า G100* ดังที่เคยกล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 4.1.1 โดยกราฟอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของ
 โครงเลียงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวนี้มีอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพค่าเดียวซึ่งเหมือนกับกราฟ
 อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของ โครงเลียงเซลล์แบบผสม

ตารางที่ 4.7 อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของ โครงเลียงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้
 ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

ตัวอย่าง	T _d (องศาเซลเซียส)
G100*	283.1 \pm 0.3
1CH	270.7 \pm 1.6
2CH	271.9 \pm 1.8
4CH	266.7 \pm 1.0*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

4.2.2 สมบัติทางเคมี

ก. ค่ามูมสัมผัสน้ำ

ค่ามูมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์มทุกแบบอยู่ในช่วง 50 – 104 องศา (ตารางที่ 4.7) และค่ามูม
 สัมผัสน้ำมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลส โดยเฉพาะที่แผ่นฟิล์ม
 1CH, 2CH และ 4CH มีค่ามูมสัมผัสน้ำที่ต่ำกว่าแผ่นฟิล์ม G100* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า
 แผ่นฟิล์มที่มีองค์ประกอบของคอลลาเจนไฮโดรไลสมากมีความชอบน้ำมากกว่าซึ่งสอดคล้องกับ
 ผลการทดลองการวัดค่ามูมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์มแบบผสม แต่ค่ามูมสัมผัสน้ำที่วัดได้จาก
 แผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการดัดแปลงพื้นผิวด้วยวิธีนี้ที่แผ่นฟิล์ม 4CH มีค่าต่ำกว่าแบบผสมมาก
 เนื่องจากแผ่นฟิล์มเจลาตินถูกเคลือบด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสความเข้มข้นร้อยละ 4 จะมี
 ปริมาณของคอลลาเจนไฮโดรไลสมากกว่าแผ่นฟิล์มที่ถูกเคลือบด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสที่
 ความเข้มข้นต่ำกว่า และคอลลาเจนไฮโดรไลสยังมีโครงสร้างโมเลกุลที่เป็นสายสั้นจึงสามารถ
 ละลายไปกับน้ำได้ง่าย โดยจากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าคอลลาเจนไฮโดรไลสมีความชอบ
 น้ำมาก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ค่ามูมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าลดลงมาก

ตารางที่ 4.8 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มเจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ(mean \pm SD, n=4)

ตัวอย่าง	ค่ามุมสัมผัส (องศา)
G100*	103.1 \pm 1.41
1CH	84.1 \pm 1.9*
2CH	74.2 \pm 2.9*
4CH	49.7 \pm 1.5*

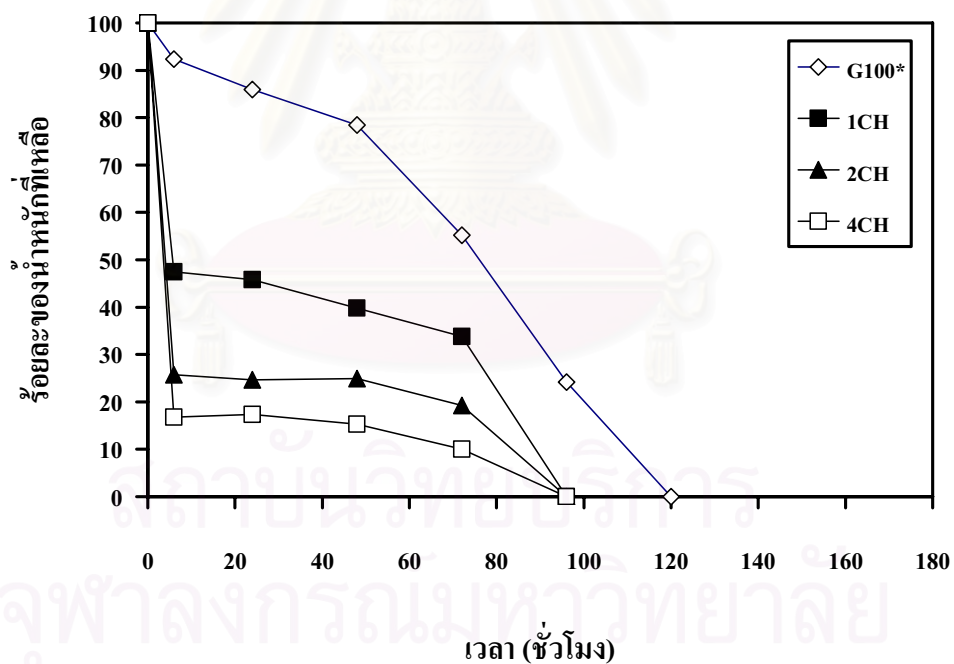
แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

4.2.3 สมบัติทางชีววิทยา

ก. การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biodegradation)

การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสเพื่อหาการย่อยสลายในรูปของร้อยละของน้ำหนักที่หายไปเทียบกับเวลา ทำโดยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลง โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทโดยใช้ความร้อนในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ความเข้มข้น 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ที่ pH 7.4 จากการทดลองพบว่าการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 4-5 วัน (รูปที่ 4.16) การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เร็วขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท อย่างไรก็ตามผลการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวนี้มิได้สอดคล้องกับการดูดซับน้ำที่ต่ำลง (รูปที่ 4.14) และความทนทานต่อแรงกดที่สูงขึ้น (รูปที่ 4.15) เมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทอาจเนื่องจากสาเหตุหลายประการ อาทิเช่น ลักษณะสมบัติของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า มีความชอบน้ำมากกว่า และอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเจลาติน จึงทำให้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่เคลือบบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเป็นส่วนที่สัมผัสกับเอนไซม์คอลลาจีเนสใน PBS โดยตรง จึงทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปทำลายโครงสร้างของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทได้ง่าย ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทมากกว่าจึงมีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม (รูปที่ 4.8) การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยวิธีนี้ที่โครงเลี้ยงเซลล์ 2CH และ 4CH มีการย่อยสลายเร็วกว่าการย่อย

สลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมมากในชั่วโมงที่ 6 หลังจากการทดสอบ เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท คอลลาเจนไฮโดรไลเสทจะสัมผัสกับเอนไซม์โดยตรงทำให้เกิดการย่อยสลายเร็ว แต่อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์ 4CH และ 2CH นี้ถูกย่อยสลายหมดภายใน 4 วัน ซึ่งช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม อาจเป็นเพราะในโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิว คอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่เคลือบบนพื้นผิวถูกย่อยสลายก่อนอาจเนื่องจากการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ความร้อนที่ไม่เสถียร แล้วจึงมีการย่อยโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินโดยจะเห็นได้ชัดจากค่า $t_{1/2}$ ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวมีค่าเท่ากับ 8 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.9) และในกราฟรูปที่ 4.16 น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก แล้วจึงค่อยๆ ลดลง หลังจากนั้น แสดงว่าการย่อยสลายมีส่วนอย่างชัดเจน โครงเลี้ยงเซลล์ G100 ที่มีการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนครั้งเดียวที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีการย่อยสลายที่ช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100* ที่ผ่านกระบวนการเชื่อมโยงพันธะที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และต่อด้วยอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อีก 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.16 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายคอลลาจีเนส (0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร) (mean \pm SD, n=4)

ตารางที่ 4.9 ครึ่งชีวิต (haft life) ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่าง	haft life; $t_{1/2}$ (ชั่วโมง)
G100*	70
1CH	8
2CH	8
4CH	8

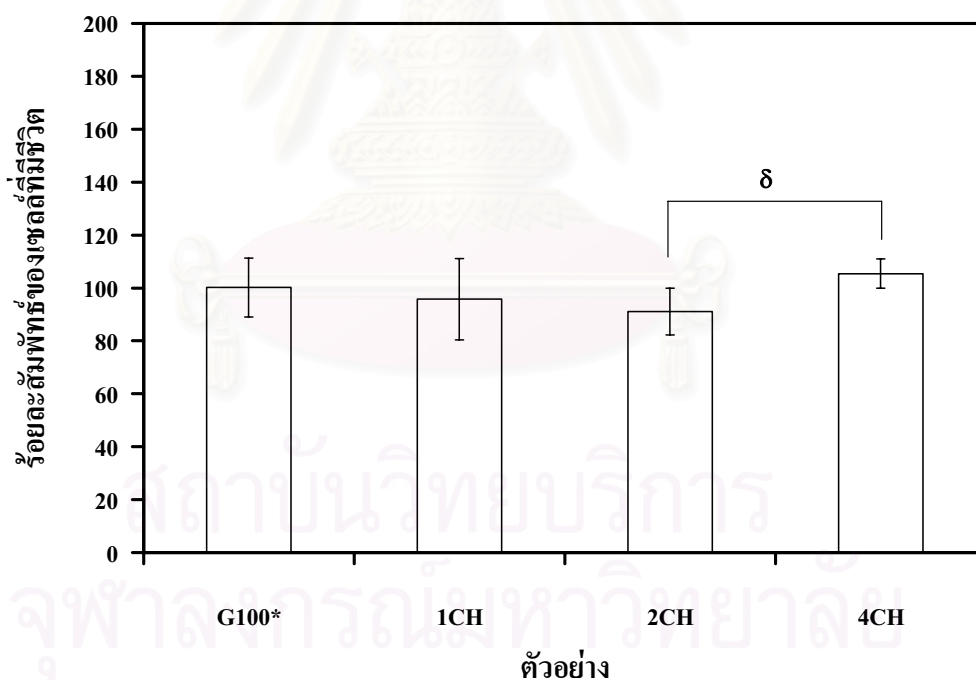
ข. ความเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biocompatibility)

เมื่อนำโครงเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 (mouse fibroblast) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.17) พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตมีแนวโน้มสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยในโครงเลี้ยงเซลล์ 4CH โดยปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์แบบปรับปรุงพื้นผิวทุกชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่ยังดำรงชีพในโครงเลี้ยง G100* ที่เทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตโดยผ่านกระบวนการปรับปรุงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนไม่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 เช่นเดียวกับทดลองเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม (รูปที่ 4.9)

การเลี้ยงเซลล์ L929 บนโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟิล์มเพื่อต้องการทดสอบผลของโครงสร้างทางเคมีของวัสดุผิวเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4.18) โดยพิจารณาการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตในโครงเลี้ยงเซลล์ 2CH มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตในโครงเลี้ยงเซลล์ G100* ที่เวลา 5 ชั่วโมง ที่เทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต แต่ปริมาณเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในโครงเลี้ยงเซลล์ 2CH เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100* ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Doubling time ของเซลล์บนแผ่นฟิล์ม G100* ที่ประมาณ 46 ชั่วโมงและบนแผ่นฟิล์ม 2CH ที่ประมาณ 41 ชั่วโมง ซึ่งมีใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตเข้าไปในแผ่นฟิล์ม จึงไม่มีผลต่อการยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 mouse fibroblast ซึ่งสอดคล้องกับผลการเลี้ยงเซลล์ในแผ่นฟิล์มแบบผสมที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.10) แต่

สาเหตุที่ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟิล์ม ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่ามากกว่าปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิว โดยเฉพาะแผ่นฟิล์ม G100* เนื่องจากกิจกรรมของเซลล์ (cell activity) ในแต่ละครั้งที่ทำการเพาะเซลล์ไม่เหมือนกัน ซึ่งกิจกรรมของเซลล์นี้ส่งผลต่อพฤติกรรมการยึดเกาะ และการเจริญเติบโตได้ และอาจเกิดจากความผิดพลาดในการนับจำนวนเซลล์เพื่อเพาะเซลล์ในแผ่นฟิล์ม

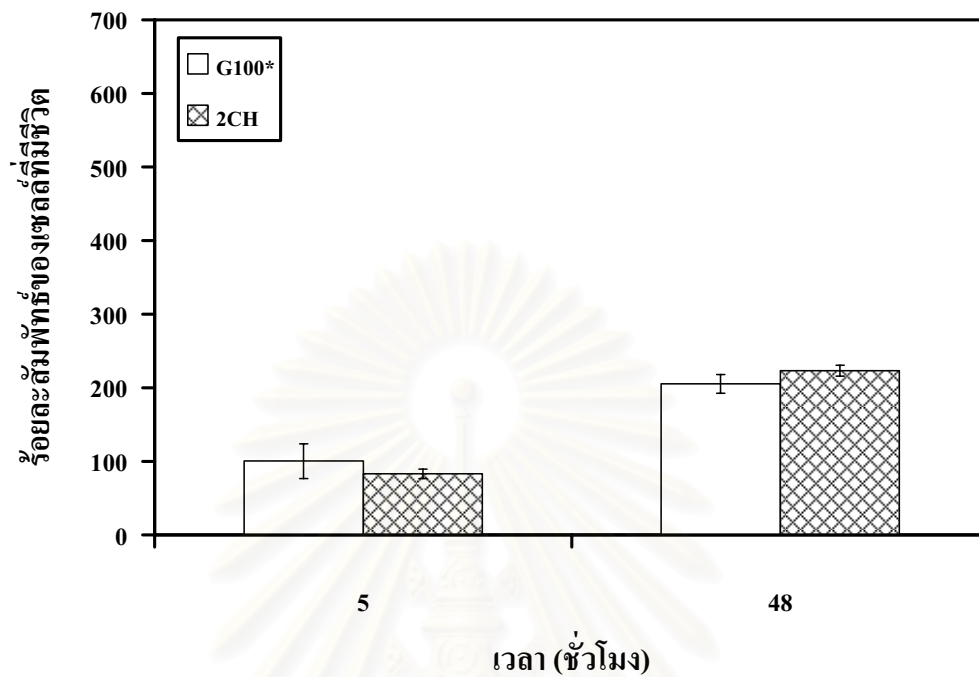
จากภาพถ่ายเซลล์กับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ตำแหน่งต่างๆ ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นการตัดโครงเลี้ยงเซลล์ตามความหนาเป็น 4 ชั้นเท่าๆ กันดังแสดงในรูป 4.19 พบว่าเซลล์ L929 สามารถเคลื่อนที่เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์จากผิวที่ถูกเพาะไปจนถึงขอบอีกด้านหนึ่งได้ในเวลา 48 ชั่วโมง ในบริเวณตำแหน่งต่างๆ (รูปที่ 4.20) ซึ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์ในการยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบแสดงดังรูปที่ 4.21 ลักษณะรูปร่างการเจริญเติบโตของเซลล์ และปริมาณการยึดเกาะของเซลล์มีลักษณะไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.17 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

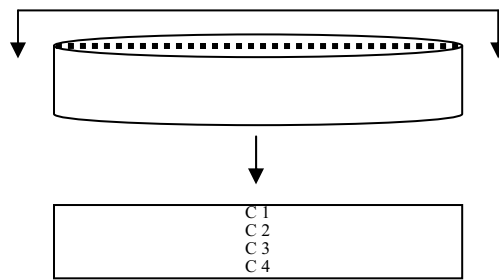
δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$



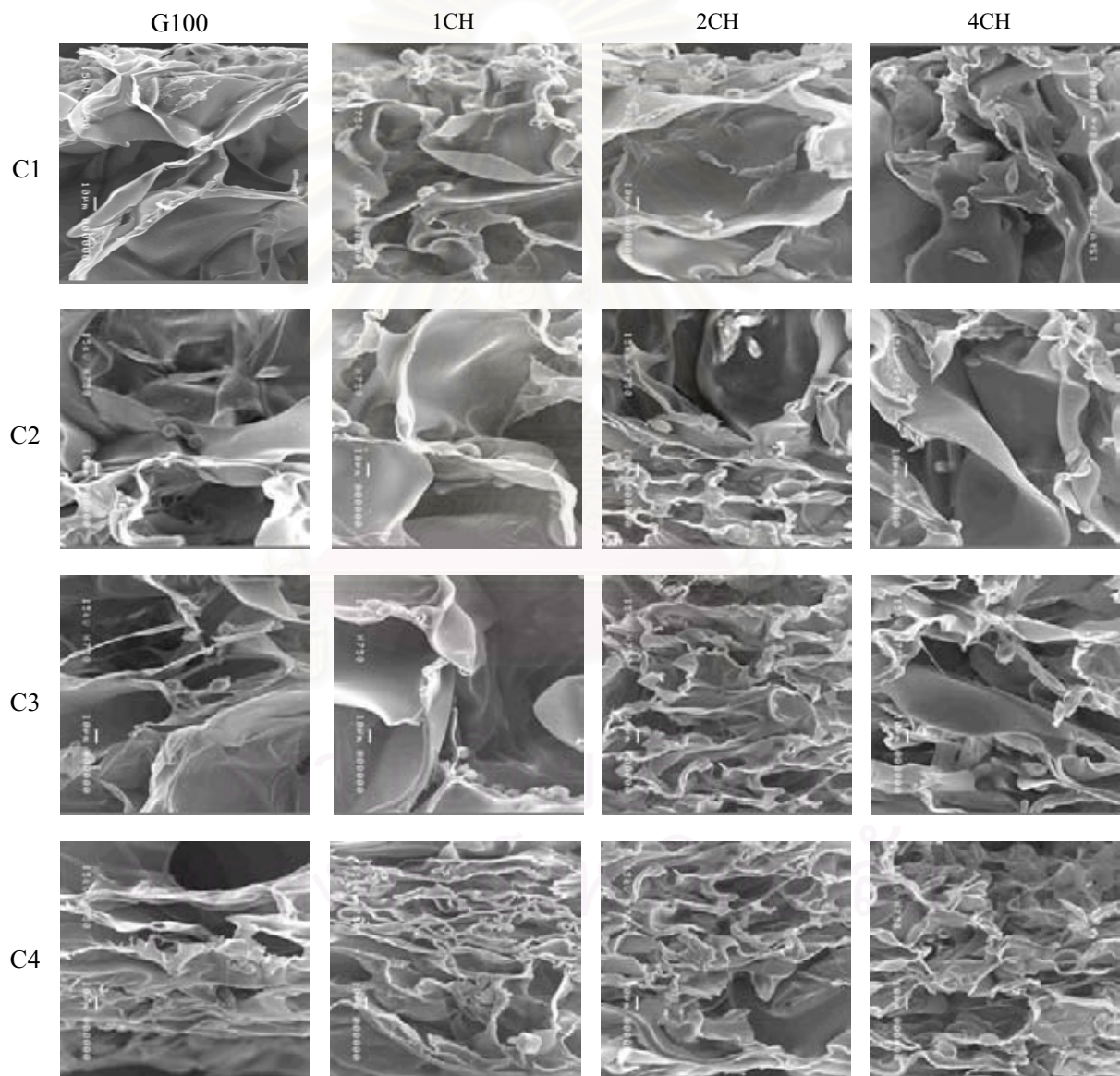
รูปที่ 4.18 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100* และ 2CH โดย น้ำหนัก ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$



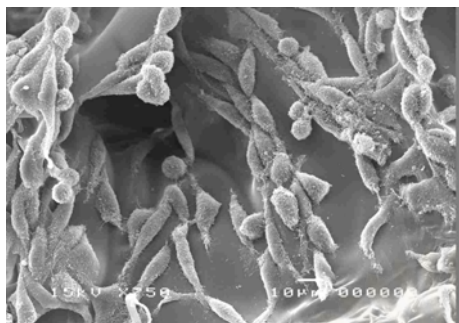
รูปที่ 4.19 ตำแหน่งที่มีการถ่ายภาพเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์



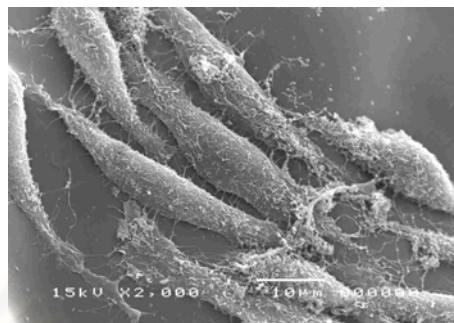
รูปที่ 4.20 เซลล์ L929 ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

G100

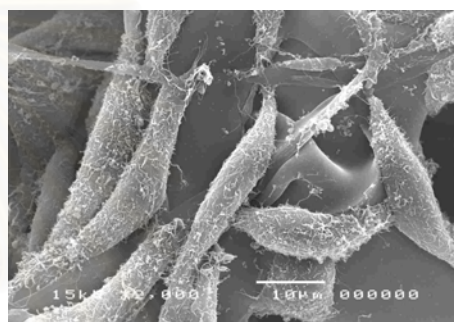
750x



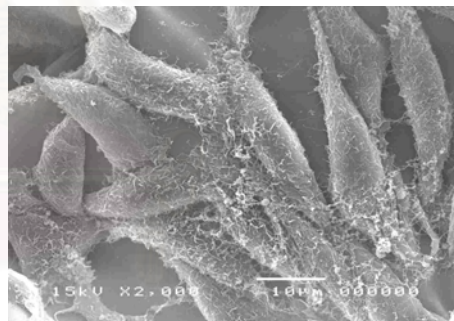
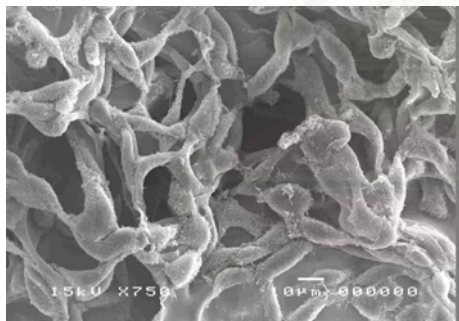
2000x



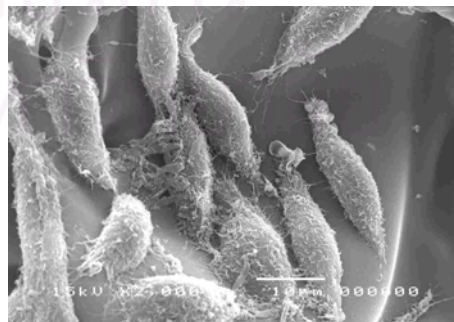
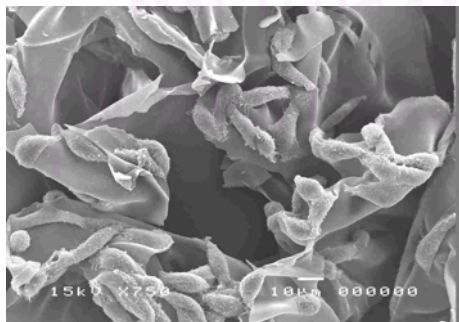
1CH



2CH



4CH



รูปที่ 4.21 เซลล์ L929 ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นต่างๆหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3 โคร่งเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS

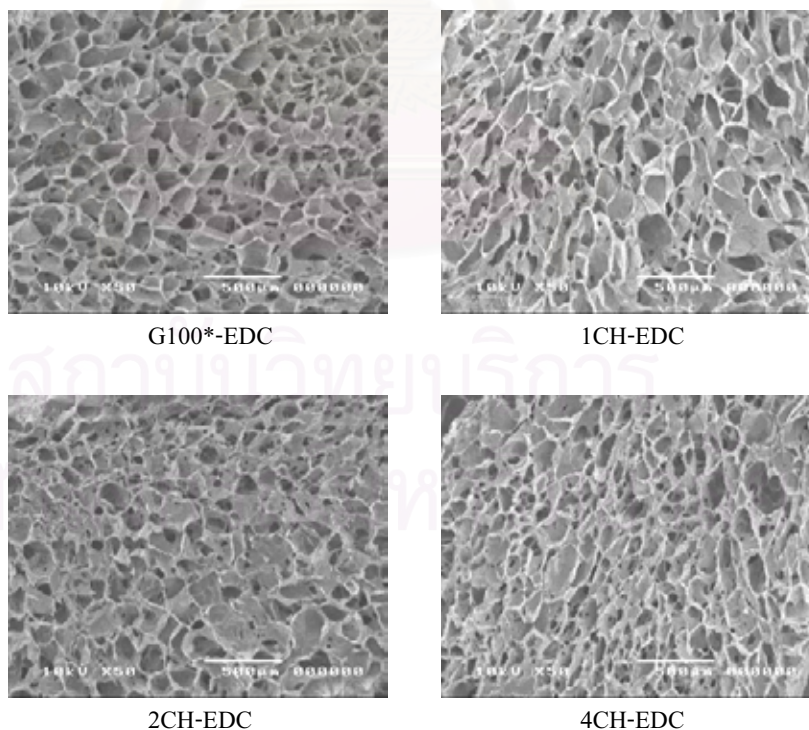
การย่อยสลายของโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสมและแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนในหัวข้อ 4.2 ก่อนข้างสูงเราสามารถปรับปรุงความเร็วในการย่อยสลายและสมบัติทางกลของโคร่งเลี้ยงเซลล์โดยการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC/NHS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide) ซึ่งมีรายงานว่ามีความเข้ากับร่างกายได้ดีกว่าสารเชื่อมโยงพันธะ glutaraldehyde (GA) [Rault, I. และคณะ, 1996] โดย EDC จะทำหน้าที่เป็น coupling reagent หรือทำให้เกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุล โดยการเชื่อมโยงพันธะจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนเจลาตินหรือคอลลาเจนไฮโดรไลสเสท กับโมเลกุล EDC ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือหมู่ O-acylisourea (III) จากนั้น O-acylisourea จะหลุดออก และผลิตภัณฑ์ที่ได้จะทำปฏิกิริยาต่อกับหมู่อะมิโนของโปรตีนตัวถัดไป ส่วนที่มีการเติม NHS เป็นการช่วยเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาในการเชื่อมโยงพันธะโดย NHS จะเข้าไปแทนที่หมู่ O-acylisourea และหลุดออกไป จากนั้นโปรตีนที่ได้จะทำปฏิกิริยาต่อกับหมู่อะมิโนของโปรตีนตัวถัดไป (รูปที่ 2.6)

กระบวนการขึ้นรูปโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS นี้มีการนำโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อน (G100*, 1CH, 2CH และ 4CH) มาทำการเชื่อมโยงพันธะต่อด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยมีรหัสโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ ได้แก่ G100*-EDC, 1CH-EDC, 2CH-EDC และ 4CH-EDC ตามลำดับ

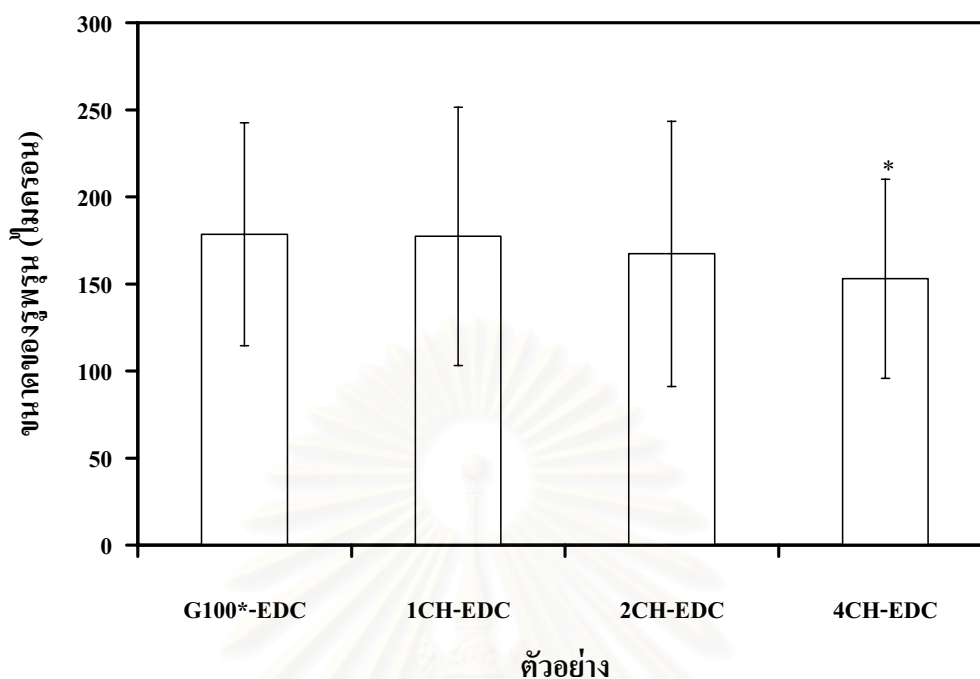
4.3.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล

โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปแบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS มีพื้นผิวแสดงดังรูปที่ 4.22 ขนาดของรูพรุนในโคร่งเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มเล็กลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลสเสท แต่ยังคงมีความพรุนและรูพรุนต่อเนื่องสม่ำเสมอเช่นเดียวกันกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC โดยมีขนาดของรูพรุนโดยเฉลี่ยของโคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 150-200 ไมครอน (รูปที่ 4.23) ขนาดของรูพรุนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลสเสท โดยเฉพาะโคร่งเลี้ยงเซลล์ 4CH-EDC ขนาดของรูพรุนโดยเฉลี่ยมีค่าต่ำกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการวัดขนาดของรูพรุนของโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสเสทในหัวข้อ 4.2 (รูปที่ 4.13) มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 70-150 ไมครอน

สาเหตุที่ขนาดของรูพรุนที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS มีขนาดโดยเฉลี่ยที่ใหญ่กว่าคาด อาจเกิดจากระบวนการเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC/NHS ซึ่งใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายจึงทำให้ คอลลาเจน ไฮโดรไลสที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินละลายออกจากระบบไป บางส่วน แม้ว่าจะผ่านการเชื่อมโยงพันธะภายหลังจากการเคลือบคอลลาเจนไฮโดรไลสบนพื้นผิว โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วก็ตาม เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงแบบ ดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลสความเข้มข้นต่างๆ แสดงใน ตารางที่ 4.10 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีนี้มีน้ำหนักโดยเฉลี่ยที่น้อยกว่าโครง เลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนในหัวข้อ 4.2 เนื่องจากปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลสที่ อาจละลายออกจากระบบในกระบวนการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC/NHS ซึ่งใช้ตัวทำละลาย เป็นน้ำกลั่น โครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรที่เตรียมด้วยกระบวนการนี้เกิดการหดตัวมากกว่า 3 เท่าในทุก สูตรซึ่งสูงกว่าการหดตัวที่เกิดจากกระบวนการเตรียมด้วยวิธีอื่นๆ แต่ขนาดของรูพรุนที่ได้ใหญ่กว่า วิธีอื่นๆ ในขณะที่น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC, 1CH-EDC และ 4CH-EDC ไม่ แตกต่างกัน และ 2CH-EDC มีน้ำหนักมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบอื่นๆ



รูปที่ 4.22 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลสความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.23 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=200)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

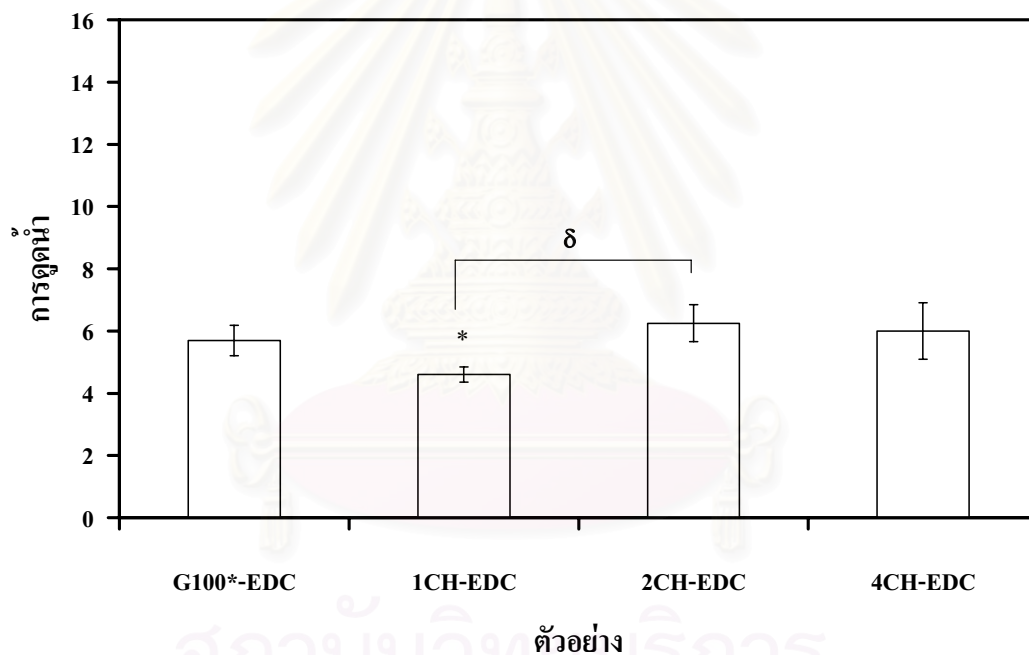
ตารางที่ 4.10 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS และใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n = 5)

ตัวอย่าง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ความหนา (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ร้อยละการหดตัว
G100*-EDC	11.08 \pm 0.66	2.20 \pm 0.18	5.20 \pm 0.08	0.21 \pm 0.03	73.66 \pm 2.74
1CH-EDC	10.29 \pm 0.40*	2.04 \pm 0.43	5.25 \pm 0.23	0.16 \pm 0.03*	79.33 \pm 2.55*
2CH-EDC	10.83 \pm 0.54	2.12 \pm 0.20	5.57 \pm 0.12*	0.19 \pm 0.02	75.00 \pm 1.27
4CH-EDC	10.50 \pm 0.75	2.08 \pm 0.25	5.32 \pm 0.29	0.18 \pm 0.03	76.66 \pm 2.55

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

หมายเหตุ: ปริมาตรเริ่มต้นในการขึ้นรูป = 0.75 มิลลิลิตร

การดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 4.5-6.5 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น (รูปที่ 4.24) การดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เกือบทุกแบบมีค่าใกล้เคียงกัน แต่โครงเลี้ยงเซลล์ 1CH-EDC มีการดูดน้ำต่ำกว่า G100*-EDC อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการดูดน้ำอาจสัมพันธ์กับปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ ถ้าโครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาตรน้อยกว่าจะมีการดูดซับน้ำที่ต่ำกว่า ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์ 1CH*-EDC ที่มีปริมาตรน้อยที่สุด และมีการหดตัวมากที่สุด (ตารางที่ 4.10) จึงมีการดูดน้ำน้อยที่สุดในขณะที่น้ำหนักไม่แตกต่างกันมากนักในกลุ่ม อย่างไรก็ตามการดูดซับน้ำที่ได้นั้นเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณ อาจมีความผิดพลาดได้ เช่น แรงในการซับน้ำ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลของการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ G100* ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาตินแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทในหัวข้อ 4.2 (รูปที่ 4.14) พบว่าการดูดน้ำมีค่าสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC



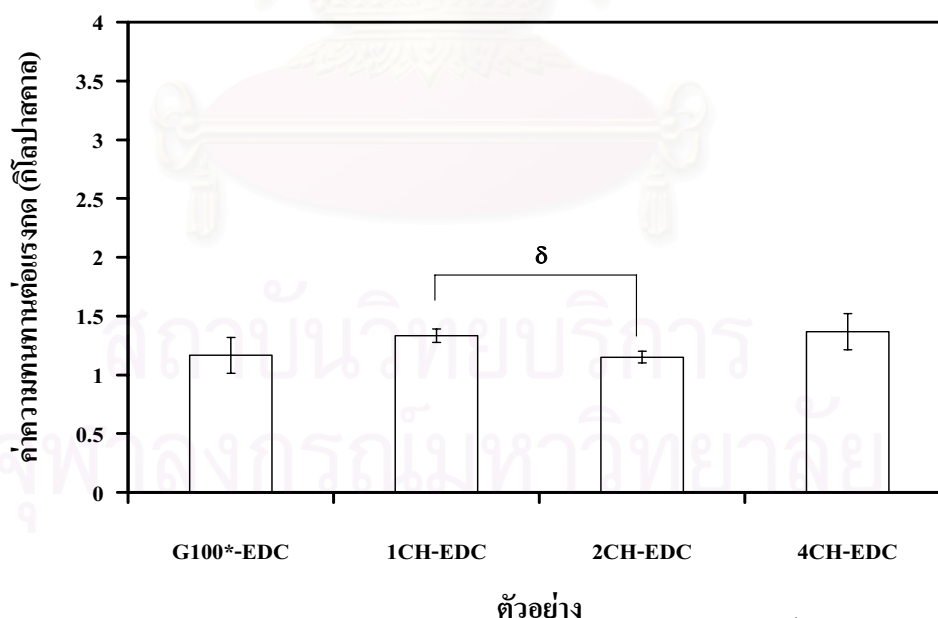
รูปที่ 4.24 การดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 1.0 - 1.5 กิโลปาสกาล (รูปที่ 4.25) ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC เนื่องจากกระบวนการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้

ความร้อนอาจไม่เพียงพอที่จะเชื่อมโยงพันธะคอลลาเจนไฮโดรไลเซททั้งหมดที่ใช้ในการตัดแปลงพื้นผิว ดังนั้นคอลลาเจนไฮโดรไลเซทอาจเกิดการละลายออกจากระบบในกระบวนการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC/NHS ซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลาย จึงมิได้สอดคล้องกับผลการทดสอบความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเซทในหัวข้อ 4.2 (รูปที่ 4.15) โครงเลี้ยงเซลล์ 2CH และ 4CH มีค่าความทนทานต่อแรงกดสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ 2CH-EDC และ 4CH-EDC อย่างชัดเจน เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ 2CH และ 4CH ปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่เคลือบบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินยังคงอยู่จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความหนาแน่นที่มากกว่า จึงรับแรงกดได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ 2CH-EDC และ 4CH-EDC ที่คอลลาเจนไฮโดรไลเซทละลายหายไปบางส่วนในกระบวนการเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC/NHS ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น โดยความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC มีค่าสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100 ประมาณ 3 เท่า ดังนั้นสารเคมี EDC/NHS ช่วยในการปรับปรุงโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ให้แข็งแรงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของนักวิจัยหลายท่านที่ได้ทำการทดสอบค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC/NHS เปรียบเทียบกับค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ [Damink, O. และคณะ, 1996]



รูปที่ 4.25 ความทนทานต่อแรงกด (compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเซทความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

อุณหภูมิในการเชื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 275-282 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.11) ซึ่งอุณหภูมิในการเชื่อมสภาพมีค่าใกล้เคียงกันใน โครงเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC, 1CH-EDC และ 2CH-EDC และอุณหภูมิในการเชื่อมสภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่โครงเลี้ยงเซลล์ 4CH-EDC เนื่องจากอาจจะมีปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทมากขึ้นไป ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์อุณหภูมิในการเชื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสมและแบบตัดแปลงพื้นผิว โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินโดยการใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3 และ 4.6) อย่างไรก็ตามอุณหภูมิในการเชื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC/NHS มีค่ามากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะโดยการใช้ความร้อน เนื่องจากการเชื่อมโยงพันธะของโมเลกุลภายในโครงเลี้ยงเซลล์โดยการใช้สารเคมีมีความแข็งแรงกว่าการเชื่อมโยงพันธะโดยการใช้ความร้อน จึงทำให้พันธะภายในโมเลกุลถูกทำลายได้ยากกว่า

ตารางที่ 4.11 อุณหภูมิในการเชื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

ตัวอย่าง	T _d (องศาเซลเซียส)
G100*-EDC	282.8 \pm 1.8
1CH-EDC	282.1 \pm 1.0
2CH-EDC	281.8 \pm 1.4
4CH-EDC	277.4 \pm 0.8*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

4.3.2 สมบัติทางเคมี

ก. ค่ามูมสัมผัสน้ำ

ค่ามูมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์มทุกแบบอยู่ในช่วง 75-90 องศา (ตารางที่ 4.12) มูมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์มมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท โดยเฉพาะแผ่นฟิล์ม 1CH-EDC, 2CH-EDC และ 4CH-EDC ค่ามูมสัมผัสน้ำมีค่าต่ำกว่าแผ่นฟิล์ม G100*-EDC อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดค่ามูมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์มแบบผสม และแบบ

ดัดแปลงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสโดยการให้ความร้อนในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 (ตารางที่ 4.4 และ 4.7) เนื่องจากเมื่อมีปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลสในแผ่นฟิล์มมากขึ้นทำให้ค่ามุมสัมผัสของแผ่นฟิล์มลดลง แสดงให้เห็นว่าสารเชื่อมโยงพันธะ EDC/NHS ไม่มีส่วนช่วยในการปรับสภาพพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของคอลลาเจนไฮโดรไลสให้มีความชอบน้ำลดลง

ตารางที่ 4.12 ค่ามุมสัมผัสของน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลสในปริมาณต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

ตัวอย่าง	ค่ามุมสัมผัส (องศา)
G100*-EDC	87.14 \pm 0.94
1CH-EDC	81.39 \pm 1.45*
2CH-EDC	79.69 \pm 0.92*
4CH-EDC	78.27 \pm 1.25*

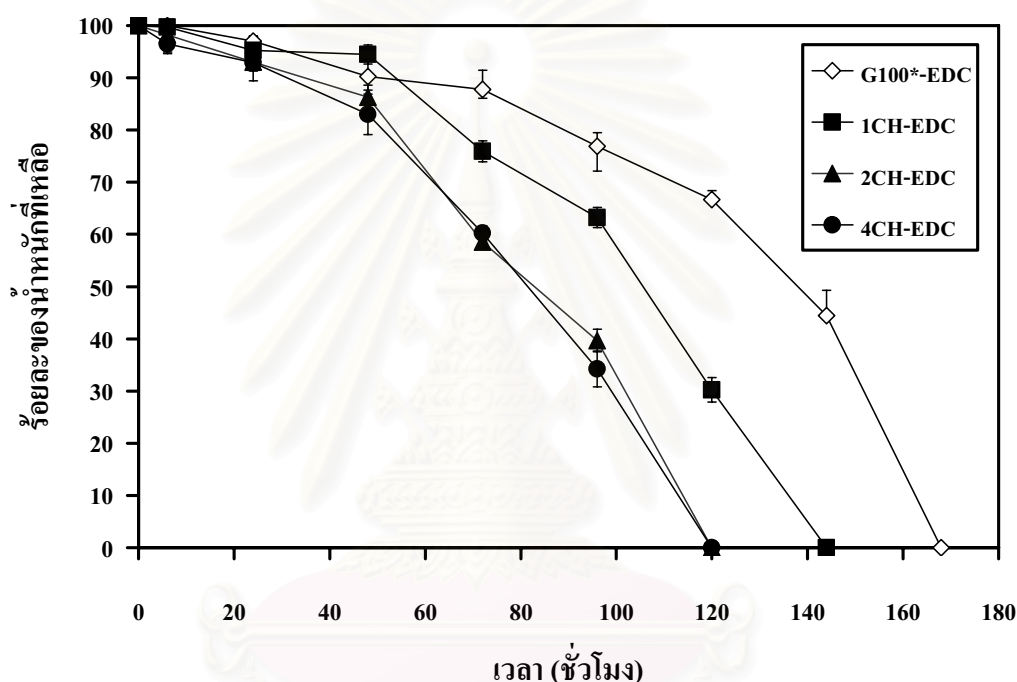
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

4.3.3 สมบัติทางชีววิทยา

ก. การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biodegradation)

การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 5-7 วัน (รูปที่ 4.26) การย่อยสลายเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลส ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ และการวัดค่ามุมสัมผัสของแผ่นฟิล์ม (ตารางที่ 4.11 และ 4.12) เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลสเคลือบพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสลดลง และอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพลดลงเช่นกัน จึงสรุปได้ว่าคอลลาเจนไฮโดรไลสมีความชอบน้ำและเสื่อมสภาพได้ง่าย จึงส่งผลต่อการย่อยสลายที่รวดเร็วด้วย โดยโครงเลี้ยงเซลล์ 2CH-EDC และ 4CH-EDC ย่อยสลายหมดภายในวันที่ 5 และโครงเลี้ยงเซลล์ 1CH-EDC และ G100-EDC ย่อยสลายหมดภายในวันที่ 6 และ 7 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้สารเคมี EDC/NHS ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม และแบบดัดแปลงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินโดย

การใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสท ในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 (รูปที่ 4.8 และ 4.16) แสดงว่า สารเชื่อมโยงพันธะ EDC/NHS มีส่วนช่วยในการเชื่อมโยงพันธะภายในโมเลกุลของทั้งเจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทให้แข็งแรง จึงต้านการย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้ดีกว่า [Damink, O. และคณะ, 1996] ค่าครึ่งชีวิตของโครงเลี้ยงแบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.13 ซึ่งค่าครึ่งชีวิตของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสท



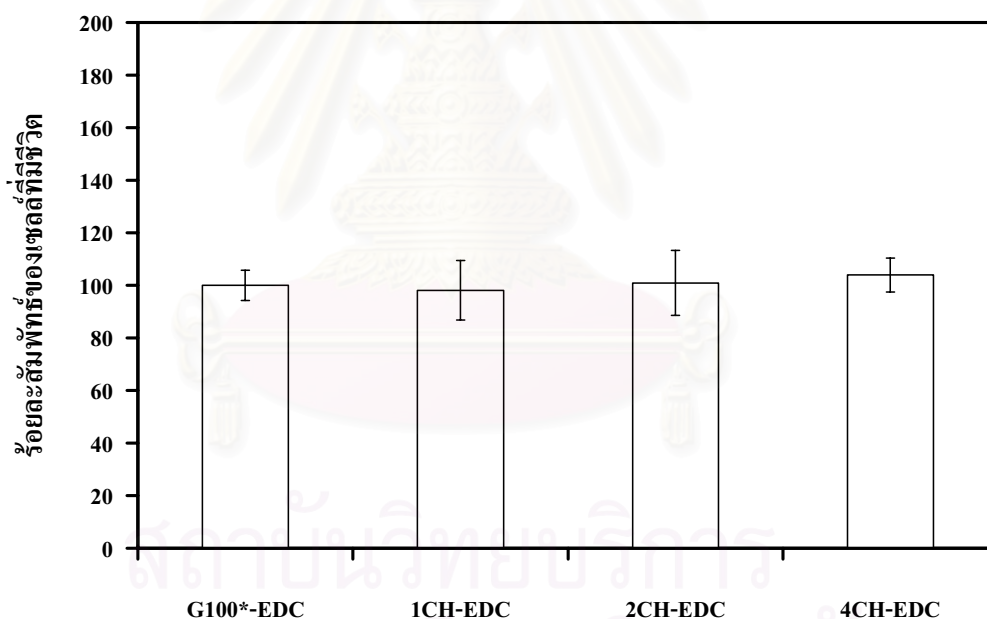
รูปที่ 4.26 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงแบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายคอลลาเจินส (0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร) (mean \pm SD, n=3)

ตารางที่ 4.13 ครึ่งชีวิต (haft life) ของโครงเลี้ยงแบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่าง	haft life; $t_{1/2}$ (ชั่วโมง)
G100*-EDC	118
1CH-EDC	108
2CH-EDC	84
4CH-EDC	86

ข. การเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกเซลล์ (*in vitro* biocompatibility)

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 (mouse fibroblast) แสดงดังรูปที่ 4.27 ปริมาณเซลล์ที่ยังดำรงชีพอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบมีค่าใกล้เคียงกันกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100*-EDC ที่เทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเสทไม่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์แม้ว่าจะปรับปรุงสภาพพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสารเชื่อม โยงพันธะ EDC/NHS แล้วก็ตาม ซึ่งผลการเลี้ยงเซลล์นี้ให้ผลเป็นแนวโน้มเดียวกับผลการเลี้ยงเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบผสม และแบบดัดแปลงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทโดยการใช้ความร้อน ในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 (รูปที่ 4.9 และ 4.17)



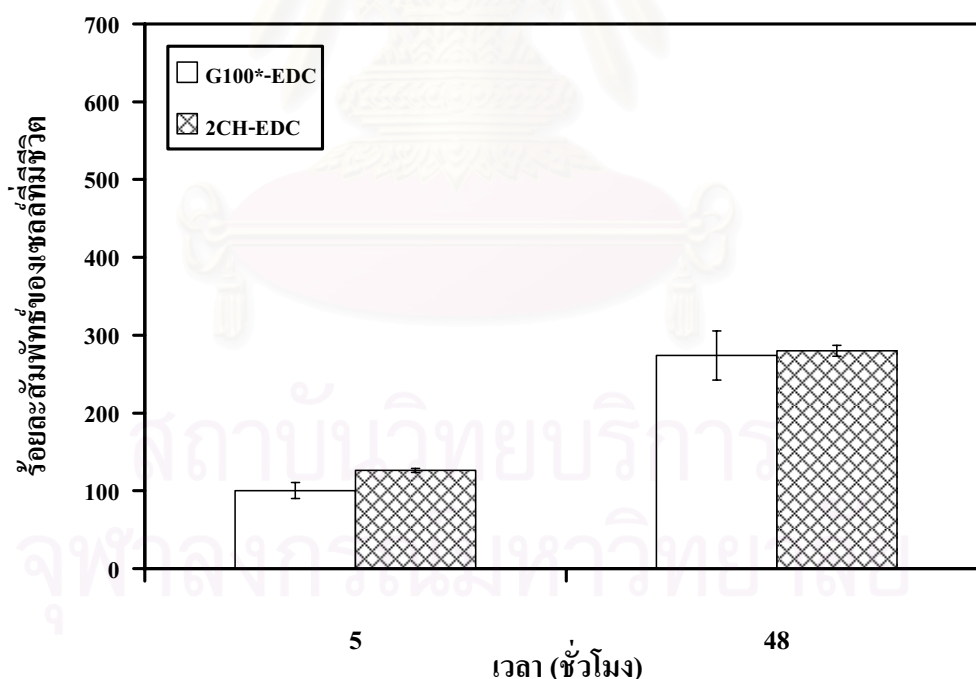
ตัวอย่าง

รูปที่ 4.27 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงแบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์) (mean ± SD, n=4)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

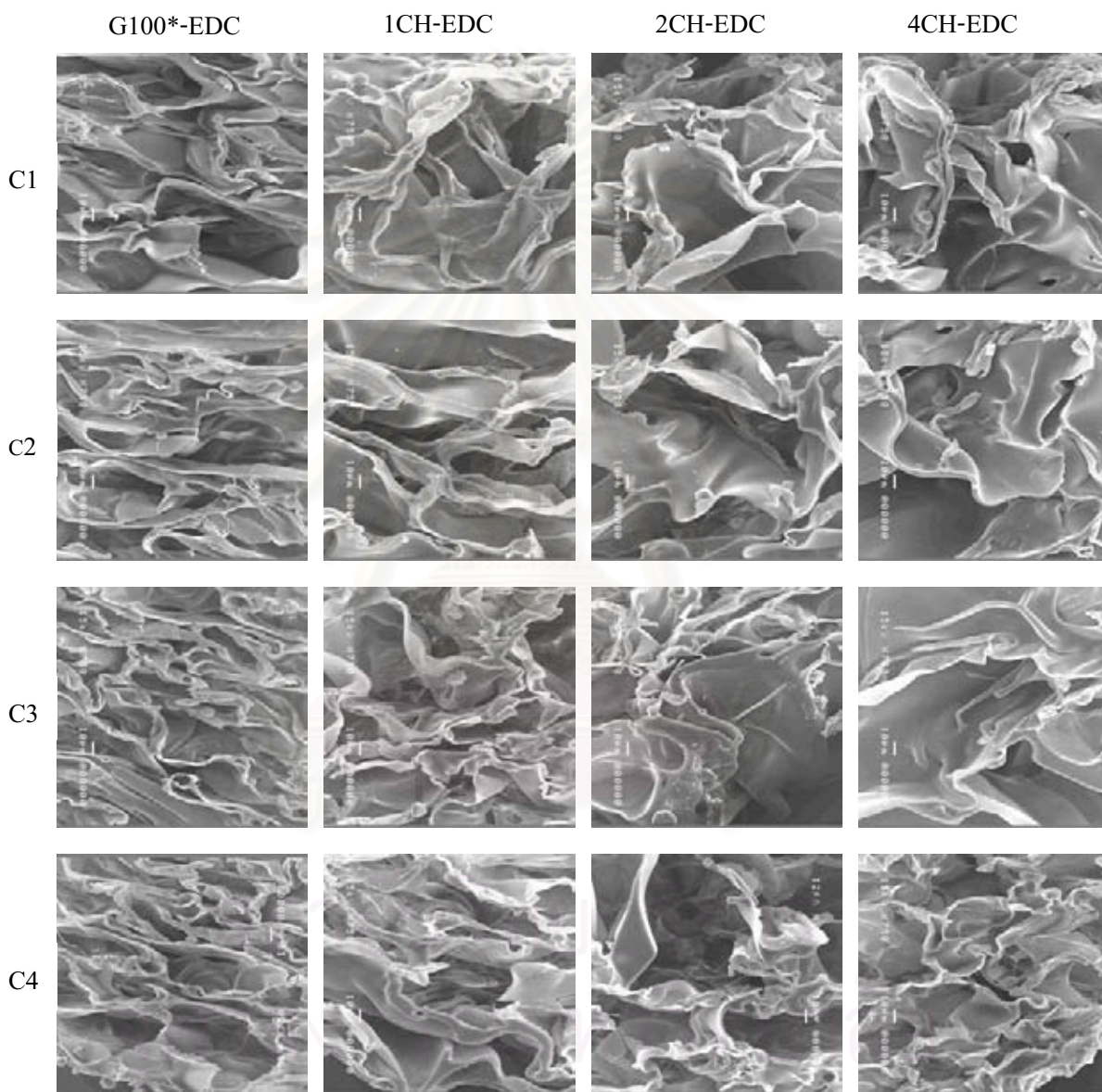
δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

การเลี้ยงเซลล์ L929 บนโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟิล์มเพื่อต้องการทดสอบผลของโครงสร้างทางวิธีการเชื่อมโยงพันธะเพียงอย่างเดียวโดยพิจารณาการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.28) โดยในงานวิจัยนี้เลือกทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ในแผ่นฟิล์ม 2CH-EDC เนื่องจากต้องการใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทเป็นร้อยละ 2 ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกันกับแผ่นฟิล์ม 2CH ที่ได้ทำการทดสอบการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.18) โดยแผ่นฟิล์มทั้งสองชนิดนี้มีการเชื่อมโยงพันธะที่แตกต่างกัน แผ่นฟิล์ม 2CH-EDC เชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารเคมี EDC/NHS แต่แผ่นฟิล์ม 2CH เชื่อมโยงพันธะโดยใช้ความร้อน จากการทดสอบพบว่าแผ่นฟิล์ม 2CH-EDC มีส่วนส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์ม G100*-EDC ที่เทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต แต่ไม่มีส่วนส่งเสริมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยปริมาณเซลล์ที่ยังดำรงชีพยังคงมีค่าใกล้เคียงกันกับแผ่นฟิล์ม G100*-EDC โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมี doubling time ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม G100*-EDC ที่ประมาณ 30 ชั่วโมงและบนแผ่นฟิล์ม 2CH-EDC ที่ประมาณ 26 ชั่วโมง



รูปที่ 4.28 ร้อยละสัมพันธ์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100*-EDC และ 2CH-EDC ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์) (mean \pm SD, n=4) *แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100*-EDC ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

เซลล์ L929 สามารถเคลื่อนที่เข้าไปได้ในโครงเลี้ยงเซลล์จากผิวที่เพาะจนถึงขอบอีกด้านหนึ่ง (รูปที่ 4.29) ซึ่งรูปร่าง การยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแสดงดังรูปที่ 4.30



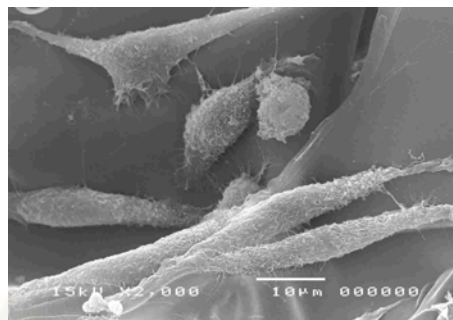
รูปที่ 4.29 เซลล์ในโครงเลี้ยงแบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ลักษณะการตัดโครงเลี้ยงเซลล์อธิบายในรูป 4.19)

G100*-EDC

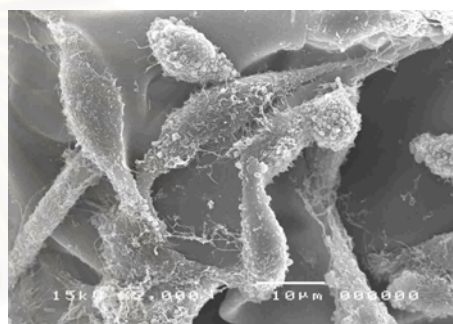
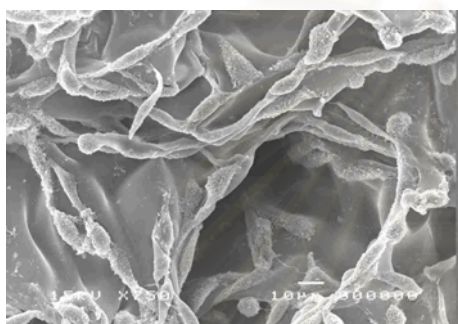
750x



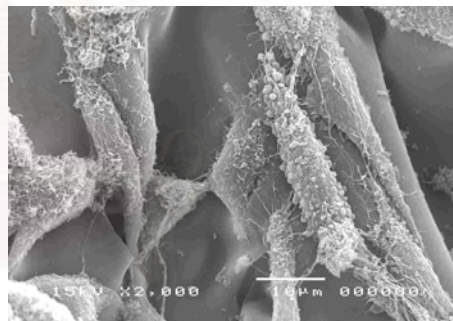
2000x



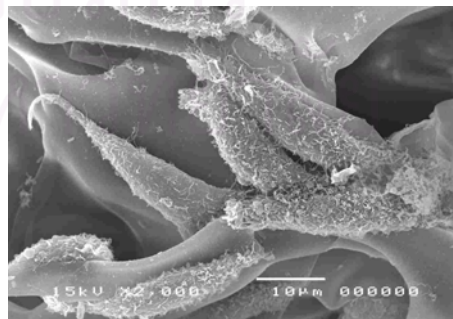
1CH-EDC



2CH-EDC



4CH-EDC



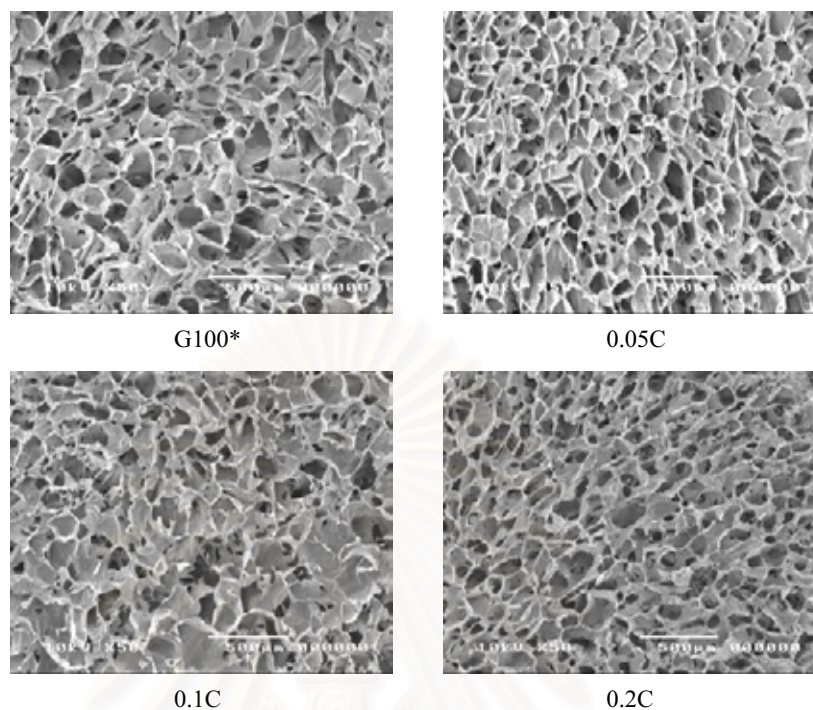
รูปที่ 4.30 เซลล์ในโครงเลี้ยงแบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลสความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1-4.3 แสดงให้เห็นว่าในการตัดแปลงด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสเสททุกวิธี คอลลาเจนไฮโดรไลสเสทมีความชอบน้ำมาก ลดค่าความทนแรงกด ลดอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ และเพิ่มความเร็วการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ ลักษณะเหล่านี้ส่งผลต่อการยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นการทดลองต่อไปเพื่อปรับปรุงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ จึงมีการใช้วัสดุที่เหมาะสมยิ่งขึ้นจึงเปลี่ยนจากคอลลาเจนไฮโดรไลสเสทเป็นคอลลาเจนที่ใช้เลี้ยงเซลล์ผิวหนังที่มีจำหน่ายในต่างประเทศ (Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan) โดยเพิ่มความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.5 และ 0.2 โดยน้ำหนัก (G100*, 0.05C, 0.1C และ 0.2C) จูทามาซ รัตนวราภรณ์ และคณะ (2548) ได้ศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินและคอลลาเจนเพื่อใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนัง จากผลการทดลองการเลี้ยงเซลล์พบว่าสามารถลดอัตราส่วนการใช้คอลลาเจนในโครงเลี้ยงเซลล์ผสมลงถึงร้อยละ 70 โดยน้ำหนักด้วยเจลาตินชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้โดยผลการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast ในโครงเลี้ยงเซลล์ผสมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนอย่างเดียว ซึ่งเป็นมาตรฐานในการเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง

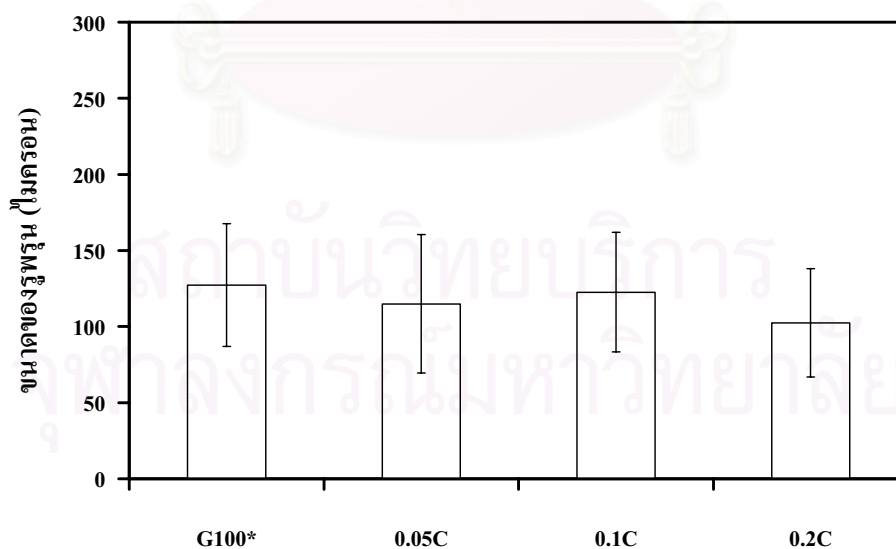
4.4 โครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจน

4.4.1 สมบัติทางกายภาพและทางกล

พื้นผิวโดยรวมของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปแบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนแสดงดังรูปที่ 4.31 จากการตรวจสอบพบว่ารูพรุนมีความต่อเนื่องอย่างสม่ำเสมอ และขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนซึ่งผลการวัดขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบอยู่ในช่วง 100-150 ไมครอน (รูปที่ 4.32) โดยโครงเลี้ยงเซลล์ 0.2C มีขนาดของรูพรุนเล็กกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ก็ยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการนำโครงเลี้ยงเซลล์ใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนัง เนื่องจากขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมต่อการนำไปปลูกถ่ายบนผิวหนังควรอยู่ในช่วง 100-120 ไมครอน [Freyman, TM. 2001]



รูปที่ 4.31 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ



ตัวอย่าง

รูปที่ 4.32 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=200) * แสดงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนด้วยคอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.14 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกสูตรมีการหดตัวลงประมาณร้อยละ 23.3-33.3 เมื่อเทียบกับปริมาตรเริ่มต้นคือ 0.75 มิลลิลิตร โดยเฉพาะสูตร 0.1C และ 0.2C มีการหดตัวสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินรวมทั้งมีน้ำหนักมากกว่า แสดงถึงปริมาณคอลลาเจนบนผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีมากกว่า ในขณะที่ขนาดของรูพรุนมีแนวโน้มลดลงเมื่อมีคอลลาเจนสูงกว่าแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

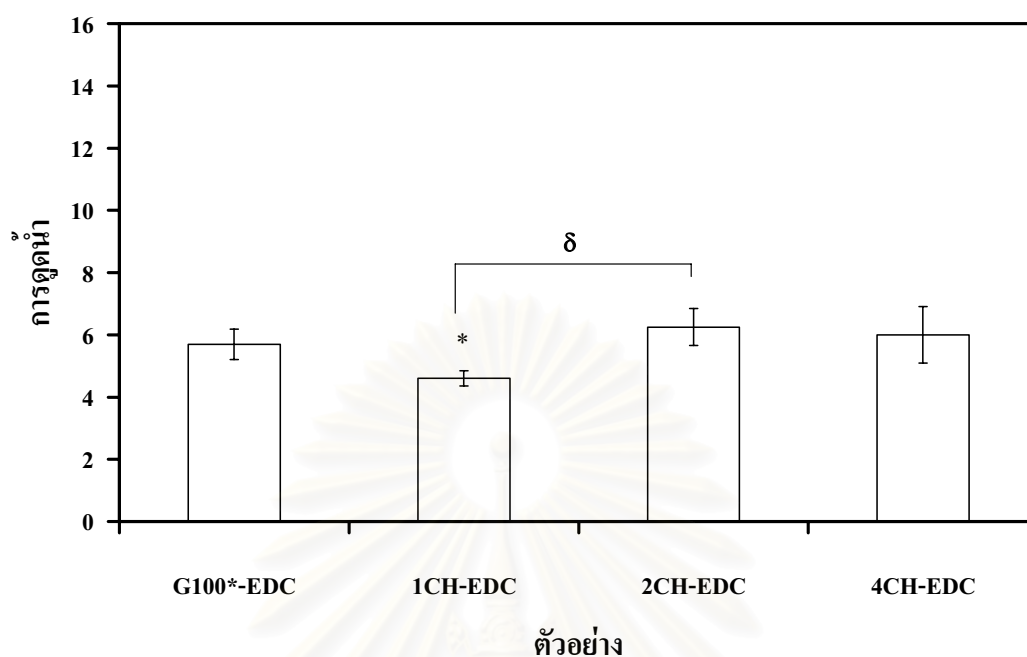
ตารางที่ 4.14 เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนา น้ำหนัก ปริมาตรและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่าง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ความหนา (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ร้อยละการหดตัว
G100*	14.31 ± 0.37	3.62 ± 0.32	6.25 ± 0.05	0.58 ± 0.03	23.33 ± 2.55
0.05C	14.25 ± 0.28	3.60 ± 0.33	6.15 ± 0.05	0.57 ± 0.06	23.66 ± 2.52
0.1C	14.31 ± 0.37	3.31 ± 0.31	6.52 ± 0.09*	0.53 ± 0.07	29.33 ± 1.88*
0.2C	14.18 ± 0.37	3.18 ± 0.23	6.95 ± 0.17*	0.50 ± 0.06	33.33 ± 1.88*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

หมายเหตุ: ปริมาตรเริ่มต้นในการขึ้นรูป = 0.75 มิลลิลิตร

การดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบ (รูปที่ 4.33) อยู่ในช่วง 11-13 เท่าเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น และการดูดน้ำมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจน การดูดน้ำที่ลดลงอาจเกิดจากคอลลาเจนที่มี triple α -helix ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำมากกว่า และการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบนี้มีค่ามากกว่าการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิว โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทในหัวข้อ 4.3 (รูปที่ 4.24) ซึ่งอยู่ในช่วง 4.5-6.5 เท่า

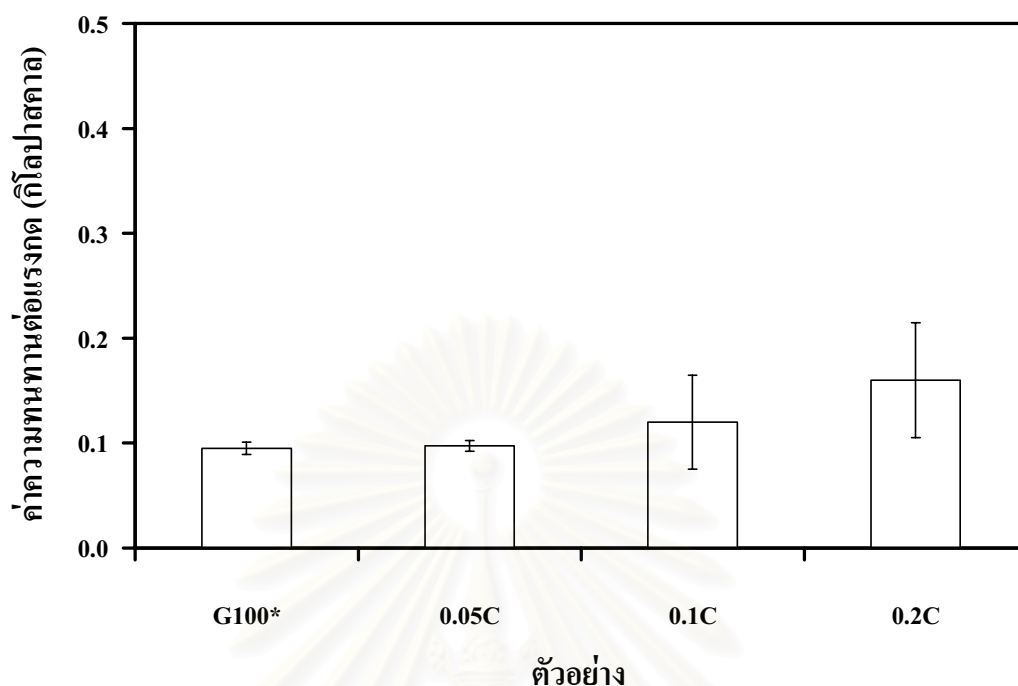


รูปที่ 4.33 การดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ค่าความทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ในช่วง 0.08- 0.2 กิโลปาสกาล (รูปที่ 4.34) ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนพบว่าค่าความทนแรงกดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ G100* แสดงว่าโครงสร้าง α -helix ของคอลลาเจนมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสมบัติทางกลให้แก่โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแม้ว่าจะเคลือบอยู่ที่ผิว อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ อยู่ในช่วง 283.1-293.1 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.15) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจน อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพจะมีค่าเพิ่มขึ้นแสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนมีค่าความเสถียรทางอุณหภูมิที่สูงกว่าเจลาติน



รูปที่ 4.34 ค่าความทนทานต่อแรงกด (compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

* แสดงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ตารางที่ 4.15 อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์แบบดัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=3)

ตัวอย่าง	T_d (องศาเซลเซียส)
G100*	283.1 \pm 0.3
0.05C	284.0 \pm 2.5
0.1C	286.0 \pm 1.7*
0.2C	293.7 \pm 1.4*

* แสดงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

4.4.2 สมบัติทางเคมี

ก. ค่ามุมสัมผัสพื้นผิว

ค่ามุมสัมผัสพื้นผิวของแผ่นฟิล์มทุกแบบอยู่ในช่วง 102.5-107.8 องศา (ตารางที่ 4.16) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่ามุมสัมผัสพื้นผิวของแผ่นฟิล์มแบบผสม แบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อน และแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้สารเคมี EDC/NHS ในหัวข้อ 4.1, 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4, 4.8 และ 4.12) ค่ามุมสัมผัสพื้นผิวมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเสทลงไปในแผ่นฟิล์มซึ่งแตกต่างกับค่ามุมสัมผัสพื้นผิวของแผ่นฟิล์มที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ค่ามุมสัมผัสพื้นผิวมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนลงไปในแผ่นฟิล์ม แต่ก็ไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับแผ่นฟิล์ม G100* แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่ใช้เคลือบบนพื้นผิวช่วยเพิ่มความเป็น hydrophobicity หรือความไม่ชอบน้ำบนพื้นผิว

ตารางที่ 4.16 ค่ามุมสัมผัสพื้นผิวของแผ่นฟิล์มแบบดัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ (mean \pm SD, n=4)

ตัวอย่าง	ค่ามุมสัมผัสพื้นผิว (องศา)
G100*	102.5 \pm 1.6
0.05C	105.5 \pm 3.3
0.1C	106.3 \pm 2.8
0.2C	107.8 \pm 4.1

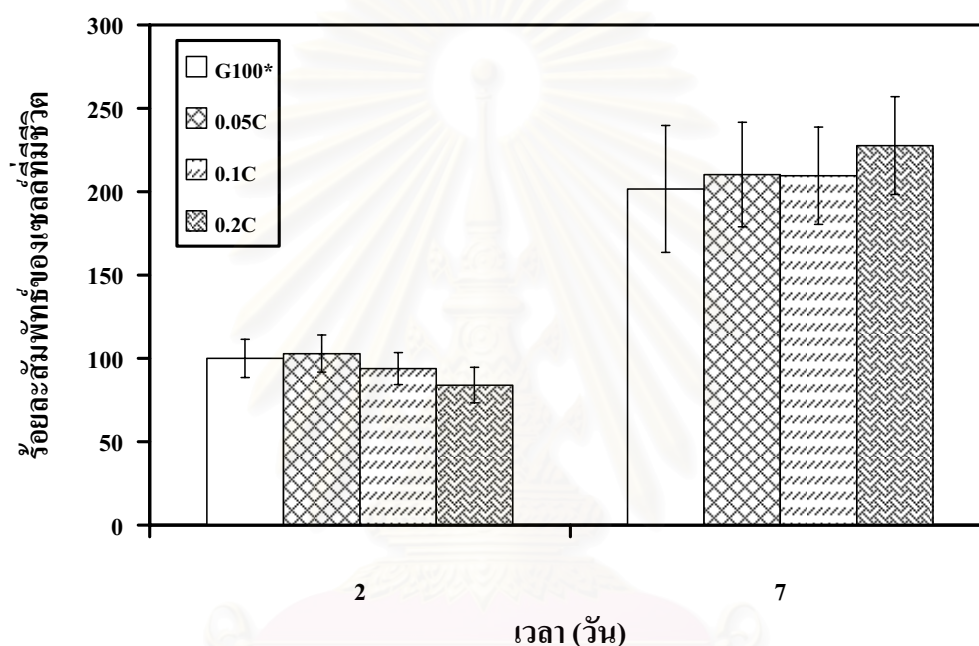
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100* ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

4.4.3 สมบัติทางชีววิทยา

ก. ความเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biocompatibility)

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาเลี้ยงเซลล์ L929 ที่เวลา 2 และ 7 วัน (รูปที่ 4.35) การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ 0.05C ปริมาณเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่เวลา 2 วัน โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100* และหลังจากที่เลี้ยงเซลล์ผ่านไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วย

คอลลาเจน แสดงให้เห็นว่าการใช้คอลลาเจนปรับปรุงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ มีส่วนส่งเสริมการยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ แม้ว่าจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100* ที่เวลา 7 วัน ผลการเจริญเติบโตที่แตกต่างอาจจะพบได้ในเวลาการเลี้ยงเซลล์ที่สั้นกว่านี้เนื่องจาก doubling time ของเซลล์ค่อนข้างสั้น คืออยู่ในช่วงเวลา 1-2 วัน (จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1-4.3)

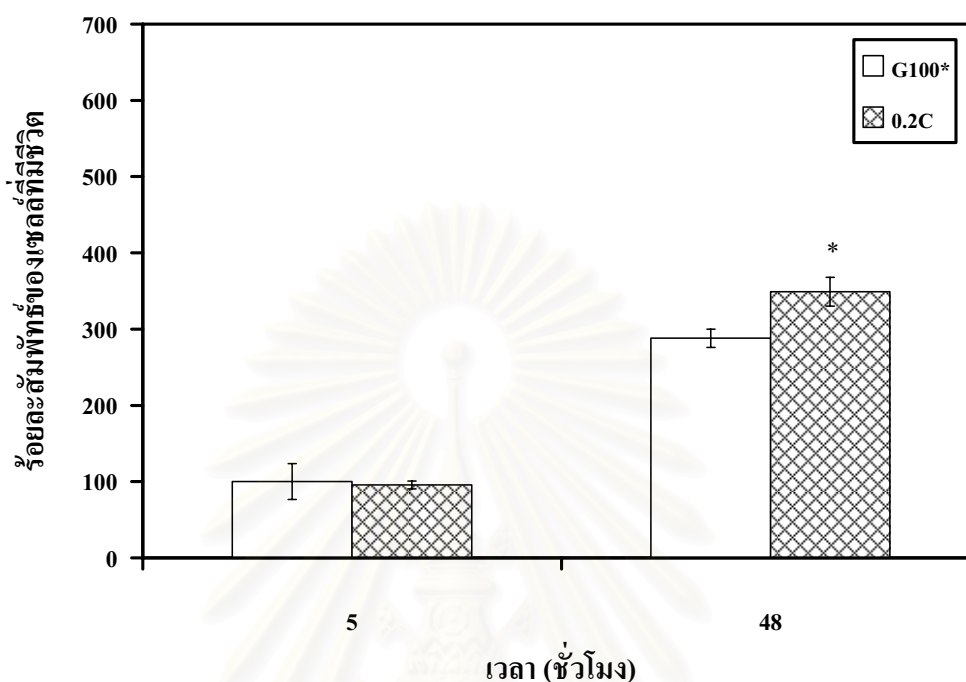


รูปที่ 4.35 ร้อยละสัมพัทธ์ของเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวด้วยความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 2 และ 7 วัน (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์) (mean \pm SD, n=4)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมงบนแผ่นฟิล์ม (รูปที่ 4.36) ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่บนแผ่นฟิล์ม 0.2C ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณมากกว่าปริมาณเซลล์บนแผ่นฟิล์ม G100* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมี Doubling time ของเซลล์บนแผ่นฟิล์ม G100 และบนแผ่นฟิล์ม 0.2C ที่ประมาณ 28 ชั่วโมง และ 23 ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่ใช้ปรับปรุงพื้นผิวของแผ่นฟิล์มมีส่วนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์



รูปที่ 4.36 ร้อยละสัมผัสของเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ L929) ของแผ่นฟิล์ม G100* และ 0.2C ที่เวลา 5 และ 48 ชั่วโมง (จำนวนเซลล์ที่เพาะ: 30,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์) (mean \pm SD, n=4)

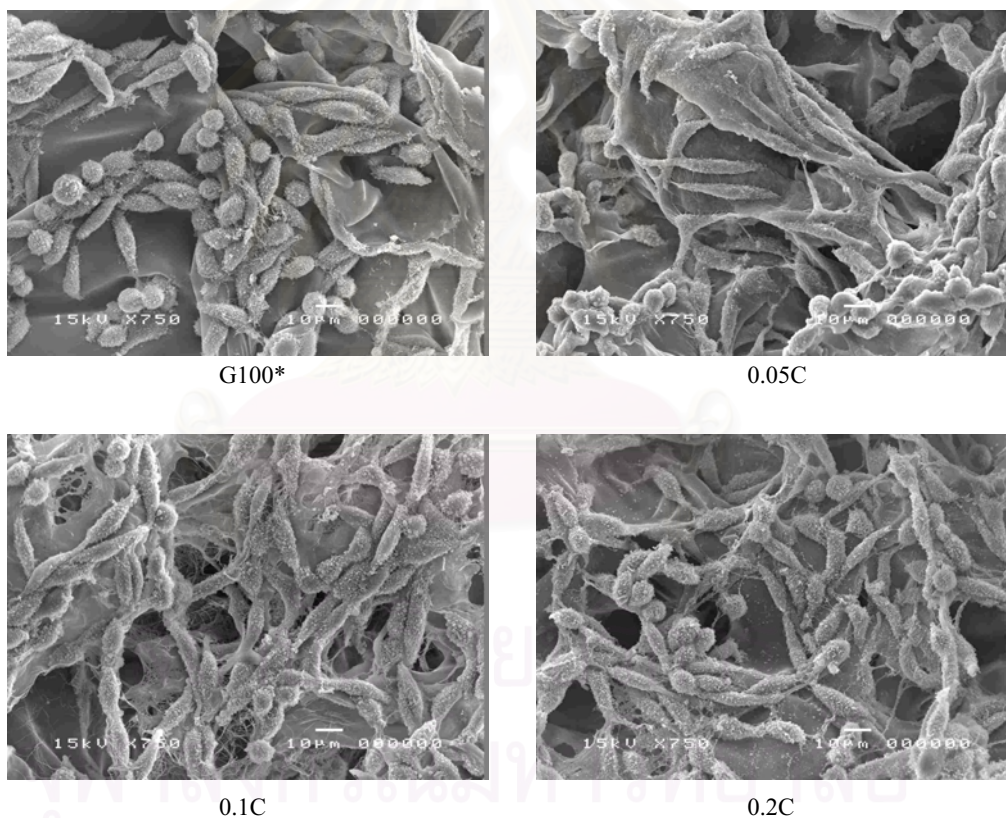
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ

δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

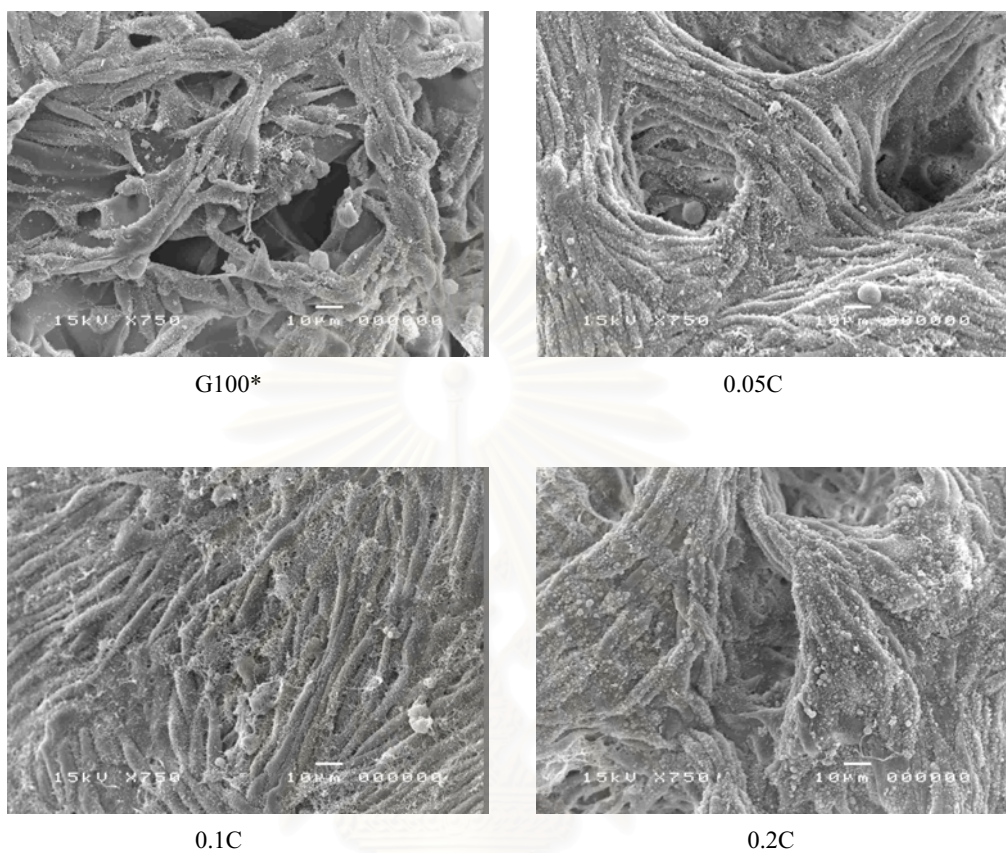
รูปร่างของเซลล์หลังจากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน และ 7 วัน ในโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงดังรูปที่ 4.37 และ 4.38 พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะได้ในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบ และมีรูปร่างที่ใกล้เคียงกัน สาเหตุที่การเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วันในแผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปโดยการตัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนมีปริมาณเซลล์ที่มากกว่าแผ่นฟิล์ม G100* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเซลล์ในช่วงเวลาเดียวกันในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ตัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนพบว่าปริมาณเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100*

ผลการทดลองเหล่านั้นแสดงให้เห็นว่าปัจจัยสำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากจะมีองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุที่ จะทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว กระบวนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ยังมีผลกระทบสูงเพราะมีผลต่อลักษณะทางกายภาพและทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ องค์ประกอบทางเคมีของคอลลาเจนและเจลาตินมีความคล้ายคลึงกันแม้ว่าคอลลาเจนจะอยู่ในรูปแบบที่เซลล์ชอบมากกว่าคือประกอบด้วย α -helix ซึ่งคล้ายกับ extracellular

matrix ตามธรรมชาติของเซลล์ผิวหนังแท้ แต่เมื่อนำมาขึ้นรูปเป็นโครงสร้าง 3 มิติ ผลขององค์ประกอบทางเคมีที่ใช้จะไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์อย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่เป็น 2 มิติ (แผ่นฟิล์ม) ในการเลี้ยงเซลล์จะเห็นผลที่เด่นของวัตถุดิบนั้นคือเซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีบนพื้นผิวที่มีการปรับปรุงด้วยคอลลาเจน จากผลการทดลองเหล่านี้จะเห็นว่าสมบัติทางกล และโครงสร้างรวมทั้งการย่อยสลายมีผลกระทบอย่างสูงต่อการเจริญของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังแท้ การจะปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยคอลลาเจนที่มีราคาแพงให้ได้ผลลัพธ์ที่ดี ควรมีการปรับปรุงกระบวนการเชื่อมโยงพันธะและกระบวนการขึ้นรูป



รูปที่ 4.37 รูปเซลล์ (เซลล์ L929) ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 4.38 รูปเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบตัดแปลงพื้นผิวโดยใช้ความร้อนโดยใช้คอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน

4.5 ผลของการเปรียบเทียบกระบวนการขึ้นรูปและการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน

เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ G100 ที่เตรียมโดยใช้กระบวนการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการต่างกัน ดังนี้

- G100(4.1): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- G100*(4.2): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ DHT ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- G100*-EDC(4.3): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, DHT ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ ใช้สารเคมี EDC/NHS

ผลของการเชื่อมโยงพันธะที่แตกต่างกันส่งผลให้ น้ำหนัก ร้อยละการหดตัว การดูดน้ำ ค่าความทนทานต่อแรงกด อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ และค่ามุมสัมผัสน้ำของ โคร่งเลี้ยงเซลล์มีค่าแตกต่างกันด้วย แสดงในตารางที่ 4.17 โดยโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่เชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารเคมี EDC/NHS มีค่าความทนทานต่อแรงกดสูงกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่เชื่อมโยงพันธะโดยใช้ความร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นถึงความแข็งแรงของพันธะที่มากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการย่อยสลายที่ช้าลงด้วย ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ อาจทำให้การเชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารเคมี EDC/NHS ในโคร่งเลี้ยงเซลล์มีส่วนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ G100 (4.1) (รูปที่ 4.39) แม้ว่าการใช้สารเชื่อมโยงพันธะทำให้โคร่งเลี้ยงเซลล์มีการดูดน้ำที่ลดลง ที่อาจเกิดจากปริมาตรที่ลดลง การหดตัวสูง น้ำหนักน้อย และอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความร้อนในการเชื่อมโยงพันธะ

ตารางที่ 4.17 น้ำหนัก ร้อยละการหดตัว การดูดน้ำ ค่าความทนทานต่อแรงกด อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ และค่ามุมสัมผัสน้ำของ โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่เชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างกัน

	ตัวอย่าง		
	G100 (4.1)	G100* (4.2)	G100*-EDC (4.3)
น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	6.60 ± 0.10	6.4 ± 0.07	5.20 ± 0.08*
ร้อยละการหดตัว	22.66 ± 2.66	17.33 ± 2.66	73.66 ± 2.74*
การดูดน้ำ (เท่า)	6.66 ± 0.87	9.17 ± 0.98*	5.69 ± 0.49
ค่าความทนทานต่อแรงกด (กิโลปาสกาล)	0.18 ± 0.04	0.21 ± 0.04	1.16 ± 0.15*
T _d (องศาเซลเซียส)	281.60 ± 3.10	283.10 ± 0.20	282.87 ± 1.85
ค่ามุมสัมผัสน้ำ (องศา)**	102.59 ± 1.64	103.18 ± 1.41	87.14 ± 0.94*

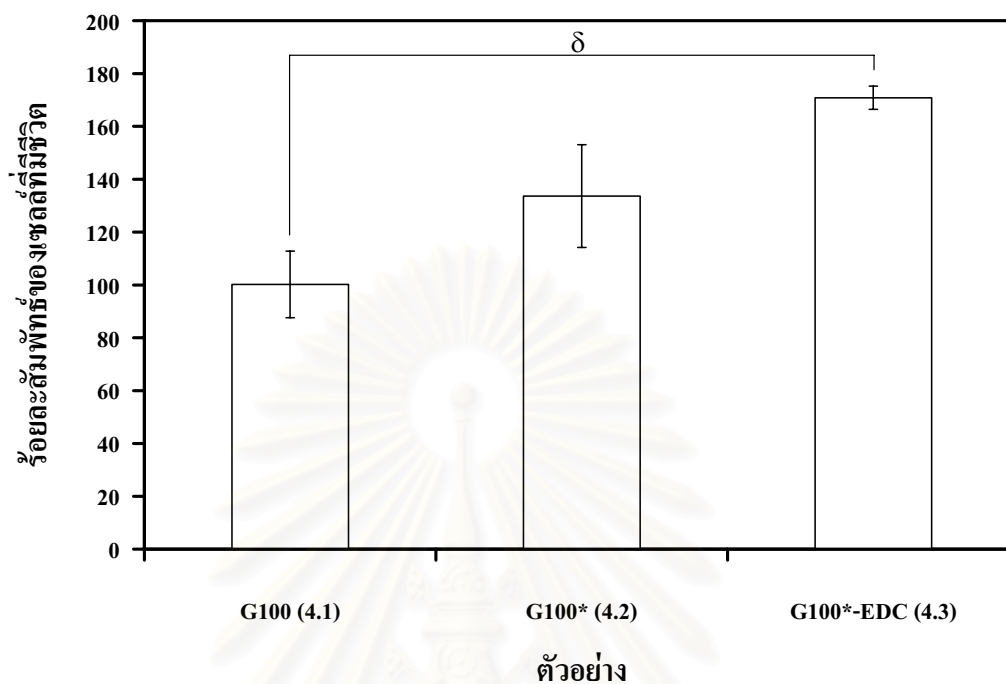
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G100 (4.1) ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

** ทดสอบกับฟิล์มบางของเจลาติน

หมายเหตุ: 1) G100(4.1): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) G100*(4.2): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ DHT ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) G100*-EDC(4.3): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, DHT ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ ใช้สารเคมี EDC/NHS



รูปที่ 4.39 ร้อยละสัมผัสของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (เซลล์ L929) ของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 (4.1), G100* (4.2) และ G100*-EDC (4.3) (mean ± SD, n=3)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

หมายเหตุ: 1) G100(4.1): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) G100*(4.2): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ DHT ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) G100*-EDC(4.3): DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, DHT ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ ใช้สารเคมี EDC/NHS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของวิธีการผลิต โคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสม และแบบดัดแปลงพื้นผิว โดยใช้ เจลาตินและคอลลาเจนไฮโดรไลสเสท โคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบมีลักษณะพื้นผิวโดยรวมที่มีรูพรุนต่อเนื่อง และมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนังคือ 100-200 ไมครอน คอลลาเจนไฮโดรไลสเสทสามารถลดอัตราการหดตัวของโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาติน ค่าความทนทานต่อแรงกดมีแนวโน้มลดลงในโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบผสมแต่มีค่าเพิ่มขึ้นในโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบปรับปรุงพื้นผิว เมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลสเสท คอลลาเจนไฮโดรไลสเสทเพิ่มความเป็น hydrophilic ให้กับ แผ่นฟิล์มเจลาตินจากการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ ผลการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ในโคร่งเลี้ยงเซลล์ทุกแบบที่ดัดแปลงด้วยคอลลาเจนไฮโดรไลสเสท ไม่แตกต่างกับปริมาณเซลล์ที่เลี้ยงบนโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาติน ดังนั้นการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลสเสทเข้าไปในโคร่งเลี้ยงเซลล์จึงไม่มีผลในการส่งเสริมการยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจาก สมบัติที่ไม่เหมาะสมของคอลลาเจนไฮโดรไลสเสทเองที่มีการย่อยสลายที่เร็วและมีความชอบน้ำสูงมาก เมื่อเปลี่ยนวัตถุดิบจากคอลลาเจนไฮโดรไลสเสทเป็นคอลลาเจนในการปรับปรุงพื้นผิวโคร่งเลี้ยงเซลล์ เจลาตินพบแนวโน้มที่จะช่วยเพิ่มความเป็น hydrophobic และเพิ่มความเข้ากันได้กับเซลล์ในระบบการ เลี้ยงเซลล์บนฟิล์ม 2 มิติ อย่างไรก็ตามเมื่อนำโคร่งเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast เป็น เวลา 7 วัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนไม่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาติน เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการ เชื่อมโยงพันธะของโคร่งเลี้ยงเซลล์โดยการใช้ความร้อน และทางเคมี (EDC/NHS) ต่อการเจริญเติบโต ของเซลล์ โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่ใช้สารเคมี EDC/NHS ในการเชื่อมโยงพันธะช่วยส่งเสริมการ เจริญเติบโตของเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่เวลา 48 ชั่วโมงซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่เชื่อมโยงพันธะโดยใช้ความร้อน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นความสำคัญอย่างยิ่งของกระบวนการผลิตและเชื่อม โยงพันธะยิ่งกว่าชนิดของวัสดุคิบในกรณีที่ว่าวัสดุคิบมีสมบัติที่คล้ายคลึงกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ผลการวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงมีแนวทางปรับปรุงและศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

1. การทดสอบค่ามุมสัมผัสน้ำอาจจะมีผลผิดพลาดสูงเนื่องจากฟิล์มที่ทดสอบมีความขรุขระ น้ำสูงอยู่แล้ว จึงควรปรับปรุงให้ใช้วิธีวัดค่ามุมสัมผัสกับสารละลายอื่นๆ ที่ไม่ขรุขระ และต้องใช้ฟิล์มที่บางมากในการทดสอบ
2. ศึกษาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่ปรับปรุงพื้นผิวแบบ EDC/NHS ด้วยคอลลาเจน
3. เปลี่ยนวิธีการเชื่อมโยงพันธะจากความร้อนเป็นสารเคมี EDC/NHS ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินดัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจน
4. ใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทจากแหล่งอื่นในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์และทดสอบการปรับปรุงพื้นผิวด้วยวิธี EDC/NHS
5. นำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินดัดแปลงพื้นผิวด้วยคอลลาเจนไปทดสอบเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่ออ่อนชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์ fibroblast จากมนุษย์และเซลล์ต้นกำเนิด
6. ปลุกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองเพื่อดูความเข้ากันได้กับเซลล์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในสิ่งมีชีวิต

รายการอ้างอิง

- Alexy, P., Bakos, D., Hanzelova, S., Kukolikova, L., Kupec, J., Charvatova, K., Chiellini, E. and Cinelli, P. Poly (vinyl-alcohol) – collagen hydrolysate thermoplastic blends : I. Experimental design optimisation and bio-degradation behavior. Polymer testing 22 (2003): 801-809.
- Alexy, P., Bakos, D., Crkonova, G., Kramarova, Z., Hoffmann, J., Julinova, M., Chiellini, E. and Cinelli, P. Poly (Vinyl-alcohol)-collagen hydrolysate thermoplastic blends : II. Water penetration and biodegradability of melt extruded films. Polymer testing 22 (2003): 811-818.
- Badylak, SF. Extracellular Matrix As a Scaffold for Tissue Engineering in Verterinary Medicine: Applications to Soft Tissue Healing. Clin Tech Equine Pract 3 (2004): 173-181.
- Brien, FJO., Harley, BA., Yannas, IV. and Gibson, LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterials 26 (2005): 433-441.
- Chang, CH., Liu, HC., Lin, CC., Chou, CH. and Lin, FH. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. Biomaterials 24 (2003): 4853-4858.
- Chong, EJ., Phan, TT., Lim, IJ., Zhang, YZ., Bay, BH., Ramakrishna, S. and Lim, CT. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. Acta Biomaterialia 3 (2007): 321–330.
- Damink, LO., Dijkstra, PJ., Luyn, MV., Wachem, PV., Nieuwenhuis, P. and Feijen, J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. Biomaterials 17 (1996): 765-773.
- Dumphy, MJ., Bhide, MV. and Smith, DJ. Determination of hydroxyproline in tissue collagen hydrolysate by derivatization and isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography 420 (1987): 394-391.
- Eaglstein, WH. and Falanga, V. Tissue engineering for skin: An update. J Am Acad Dermatol 39 (1998): 1007-1010.
- Friess, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45 (1998): 113-136.

- Gamlin, CD., Dutta, NK., Choudhury, NR., Kehoe, D. and Matison, J. Evaluation of kinetic parameters of thermal and oxidative decomposition of base oils by conventional, isothermal and modulated TGA, and pressure DSC. Thermochimica Acta 392-393 (2002): 357-369.
- Gatti, AM. and Knowles, JC. Biocompatibility and Biological Tests. Integrated Biomaterials Science (2002): 794-812.
- Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews 55 (2003): 1531-1546.
- Goissis, G., Yoshioka, SA., Braile, DM. and Ramirez, VDA. The Chemical Protecting Group Concept Applied in Crosslinking of Natural Tissues with Glutaraldehyde Acetals. Artificial Organs 22 (1998); 210.
- Hong, SR., Lee, SJ., Shim, JW., Choi, YS., Lee, YM., Song, KW., Park, MH., Nam, YS. and Lee, SI. Study on gelatin-containing artificial skin IV: a comparative study on the effect of antibiotic and EGF on cell proliferation during epidermal healing. Biomaterials 22 (2001): 2777-2783.
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewa, M., Moshfeghian, A. and Madihally, SV. In vitro characterization of chitosan – gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 26 (2005) : 7616-7627.
- Jamilah, B. and Harvinder, KG. Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). Food chemistry 77 (2002) : 81-84.
- Jones, I., Currie, L. and Martin, R. A guide to biological skin substitutes. British Journal of Plastic Surgery 55 (2002): 185-193.
- Kang, HW., Tabata, Y. and Ikada, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 20 (1999): 1339-1344.
- Karageorgiou, V. and Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials 26 (2005): 5474-5491.
- Kuijpers, AJ., Wachem, PBV., Luyn, MJAV., Brouwer, LA., Engbers, GHM., Krijgsveld, J., Zaat, SAJ., Dankert, J. and Feijen, J. In vitro and in vivo evaluation of gelatin-chondroitin sulphate hydrogels for controlled release of antibacterial proteins. Biomaterials 21 (2000): 1763-1772.
- Kleinman, HK., Philp, D. and Hoffman, MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. Current Opinion in Biotechnology 14 (2003): 526-532.

- Lee, CH., Singla, A. and Lee, Y. Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics 221 (2001): 1-22.
- Lee, SB., Jeon, HW., Lee, YW., Lee, YM., Song, KW., Park, MH., Nam, YS. and Ahn, HC. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6) - β -glucan. Biomaterials 24 (2003): 2503-2511.
- Lee, SB., Kim, YH., Chong, MS., Hong, SH. and Lee, YM. Study of gelatin-containing artificial skin V : fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. Biomaterials 26 (2005): 1961-1968.
- Leonhartsberger, S., Lafferty, RM. and Korneti, L. Use of collagen hydrolysate as a complex nitrogen source for the synthesis of penicillin by *Penicillium chrysogenum*. Journal of Biotechnology 30 (1993): 299-313.
- Liu, H., Mao, J., Yao, K., Yang, G., Cui, L. and Cao, Y. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. Biomaterials 15, 1 (2004): 25-40.
- Macek, J., Lichy, A., Pesakova, V., and Adam, M. Determination of radiolabelled proline and hydroxyproline in collagen hydrolysates by high performance liquid chromatography with on-line radiometric detection. Journal of Chromatography 488 (1989): 267-274.
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J. and Shen, J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials 25 (2004); 2997-3004.
- Ma, PX. Scaffolds for tissue fabrication. Materialstoday (2004); 30-40.
- Mao, JS., Liu, HF., Yin, YJ. and Yao, KD. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. Biomaterials 24 (2003): 1621-1629.
- Mao, JS., Zhao, LG., Yin, YJ. and Yao, KD. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. Biomaterials 24 (2003): 1067-1074.
- Morgan, JR. and Yarmush, ML. Tissue Engineering Methods and Protocols. Methods in molecular medicine 18 (1999).

- Moskowitz, RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Seminars in Arthritis and Rheumatism 30, 2 (2000): 87–99.
- Nagai, N., Yunoki, SJ., Suzuki, M., Salata, Tajima, K., and Munekata, M. Application of cross- linked salmon atelocollagen to the scaffold of human periodontal ligament cells. Bioscience and bioengineering 97, 6 (2004): 389-394.
- Neuman, RE. The amino acid composition of gelatins, collagens and elastins from different sources. The Department of Biological Chemistry (Thesis) (1949); 289-297.
- Olsen, D., Yang, C., Bodo, M., Chang, R., Leigh, S., Baez, J., Carmichael, D., Peral, M., Hamalainen, E.R., Jarvinen, M. and Polarek, J. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 55 (2003): 1547– 1567.
- Pek, YS., Spector, M., Yannas, IV. and Gibson, LJ. Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. Biomaterials 25 (2004): 473-482.
- Ratner, BD., Hoffman, AS., Schoen, FJ. and Lemons, JE. An Introduction to Materials in Medicine. Biomaterials Science (2004).
- Salgado, AJ., Gomes, ME., Chou, A., Coutinho, OP., Reis, RL. and Hutmacher, DW. Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds. Materials Science and Engineering 20 (2002): 27-33.
- Semrl–Kosmac, V., and Gantar, A., and Anzur, I. Modification of collagen hydrolysates. Resources, Conservation and Recycling 13 (1995): 97 – 104.
- Shafritz, TA., Rosenberg, LC. and Yannas, IV. Specific effects of glycosaminoglycans in an analog of extracellular matrix that delays wound contraction and induces regeneration. The Wound Healing Society (1994): 271-276
- Sheu, MT., Huang, JC., Yeh, GC. and Ho, HO. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. Biomaterials 22 (2001): 1713-1719.
- Sung, HW., Chen, CN., Huang, RN., Hsu, JC. and Chang, WH. In vitro surface characterization of a biological patch fixed with a naturally occurring crosslinking agent. Biomaterials 21 (2000): 1353-1362.

- Tabata, Y. and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 31 (1998): 287–301.
- Tabata, Y. and Ikada Y. Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. Biomaterials 20 (1999): 2169-2175.
- Tabata, Y., Nagano, A., Muniruzzaman, Md. and Ikada, Y. In Vitro sorption and desorption of Basic fibroblast growth factor from biodegradable hydrogels. Biomaterials 19 (1998): 1781-1789.
- U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. (March 3, 2006).
- Vogler, EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. Advances in Colloid and Interface Science 74 (1998): 69-117.
- Young, S., Wong, M., Tabata, Y. and Mikos, AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. Journal of Controlled Release 109 (2005): 256-274.
- Zhang, YZ., Venugopal, J., Huang, ZM., Lim, CT. and Ramakrishna, S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. Polymer 47 (2006): 2911–2917.
- Zeeman, R., Dijkstra, PJ., Wachem, PBV., Luyn, MJAV., Hendriks, M., Cahalan, PT. and Feijen, J. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. Biomaterials 20 (1999): 921-931.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

ก.1 เทคนิคการเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblasts ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS ร้อยละ 10, L-glutamine ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล, penicillin ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ amphotericin B ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อเซลล์เริ่มเต็ม plate จึงทำการ trypsinize ด้วย trypsin-EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 และแบ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์สามารถทำได้ดังนี้

- นำเชื้อโครงเลี้ยงเซลล์โดยการแช่ใน ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 นาที
- ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที 3 รอบ
- แช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน PBS buffer (pH 7.4) อย่างต่ำ 6 ชั่วโมง ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม เพื่อปรับ pH โครงเลี้ยงเซลล์
- ปิเปต PBS buffer ออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified eagle medium, 10% DMEM ใส่ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม
- นับเซลล์ L929 mouse fibroblast ด้วย Hemacytometer เมื่อได้จำนวนเซลล์ตามที่ต้องการจึงทำการเพาะเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน

การดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ในแผ่นฟิล์ม สามารถส่องดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast microscope) แต่ถ้าเป็นลักษณะรูปร่างของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์สามารถทำการ fix ใน glutaraldehyde โดยมีขั้นตอนดังนี้

- หลังจากทีเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนด ให้ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS buffer 1 ครั้ง
- แช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ใน PBS buffer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- Dehydrate โครงเลี้ยงเซลล์ด้วย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 ครั้งละ 5 นาที เพื่อขจัดน้ำออก
- แช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน hexamethyldisilazane (HMDS) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดอากาศเป็นเวลา 1 วัน

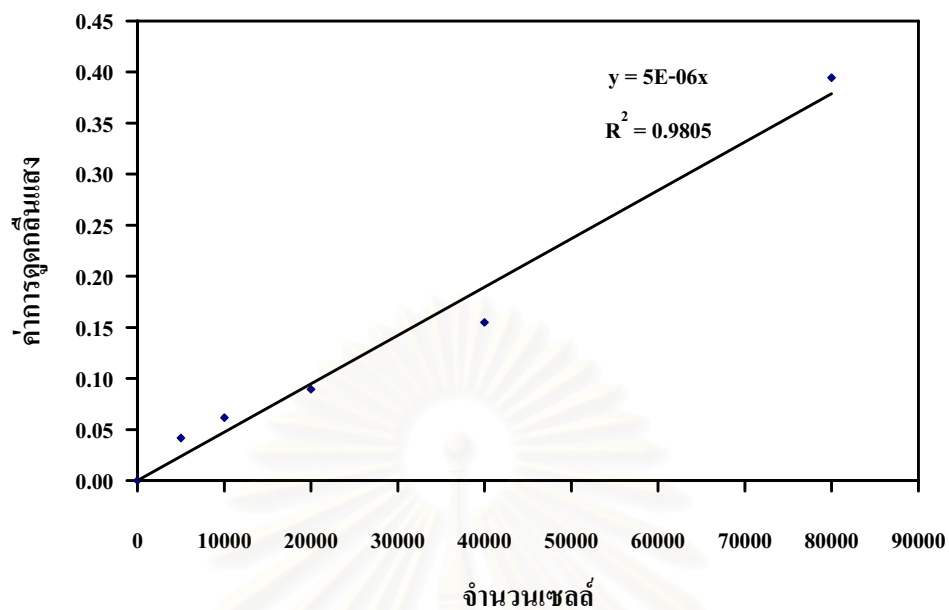
ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT

(3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay

[Liu, H. และคณะ 2004]

1. หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน โคร่งเลี้ยงเซลล์ภายในตู้ที่มี 5% CO₂ จึงทำการล้างโคร่งเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS เพื่อที่จะล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออก
2. เติมสารละลาย MTT ใน DMEM without phenol red ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุม และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที
3. สาร (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ใน MTT ซึ่งมีสีเหลืองจะทำปฏิกิริยากับ enzyme mitochondria dehydrogenase ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้ม
4. ทำการล้างผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) และ glycine buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และ 125 ไมโครลิตร ตามลำดับ
5. ทำการวัดปริมาณเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วเทียบปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ ก.1

การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ทราบได้จากการนำค่าที่ได้จาก MTT assay เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานรูปที่ ก.1 โดยกราฟมาตรฐาน ทำได้โดยเพาะเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในถาดหลุม และ อบในตู้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงตามวิธี MTT assay เมื่อทราบจำนวนเซลล์แล้วจึงทำการคำนวณร้อยละสัมผัสของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินอย่างเดียวที่คิดจำนวนเซลล์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 mouse fibroblast (n = 4)

ภาคผนวก ข.

ตัวอย่างการคำนวณ

ข.1 การหาค่าการดูดน้ำ

การหาค่าการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 ที่เตรียมจากวิธีผสม สามารถหาได้โดยหาน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.6 มิลลิกรัม และน้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 หลังจากแช่ในสารละลาย PBS buffer ซึ่งมีค่าเท่ากับ 41.9 มิลลิกรัม และสามารถคำนวณการดูดน้ำ (swelling ratio) ได้จากสูตร

$$\text{swelling ratio} = \frac{W_{so} - W_0}{W_0}$$

โดย W_{so} คือน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากที่ถูกดูดซับน้ำ และ W_0 คือน้ำหนักเริ่มต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

$$\text{Swelling ratio} = \frac{41.9 - 6.6}{6.6} = 3.74$$

ดังนั้นการดูดน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 จึงมีค่าเท่ากับ 3.74 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น

ข.2 การหาค่าอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ (T_d)

หลักการทำงาน

วัดค่าน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสาร โดยใช้เครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer (TG/DTA) เช่น วัดน้ำหนักที่หายไปของสารต่อเวลาหรืออุณหภูมิ ซึ่งเกิดจากการสลายตัวหรือการเอาน้ำออก ซึ่งกราฟที่ได้ประกอบด้วย ค่าน้ำหนักที่หายไป ในฟังก์ชันของอุณหภูมิ และอัตราการหายไปของน้ำหนักต่ออุณหภูมิ โดยกราฟที่ได้นั้นแสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะของสารหรือระบบหนึ่งๆ เนื่องจากลำดับของปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นในช่วง

ของอุณหภูมิที่แน่นอน การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักนี้เป็นผลมาจากการสลายตัว หรือการรวมตัวของสาร ที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น เช่นการระเหยตัวของสาร หรือการเกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักมาก

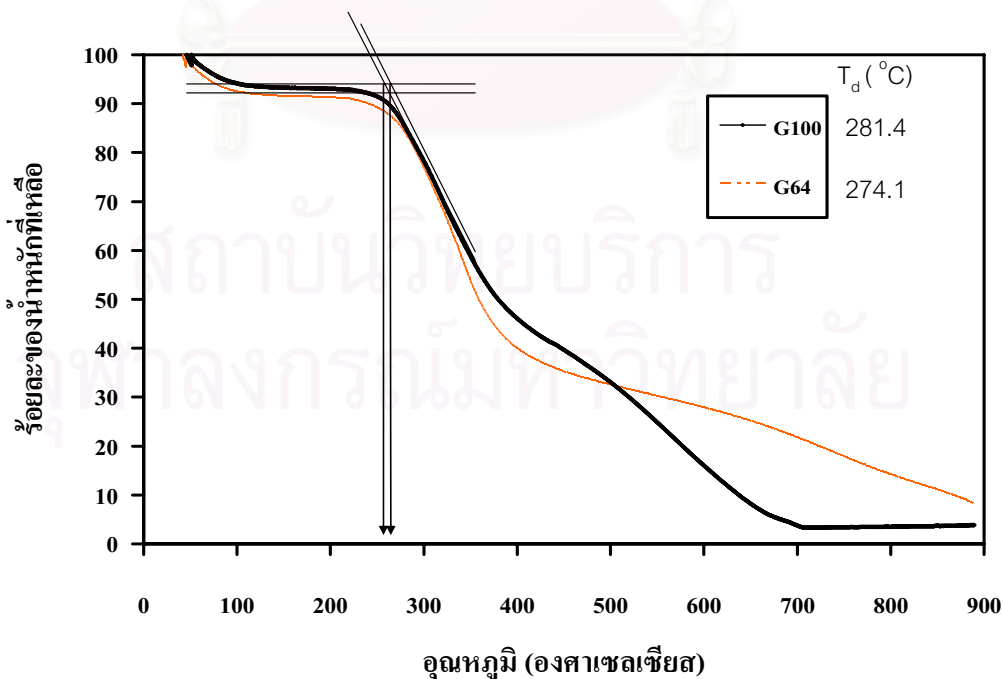
การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ควรมีขนาดเล็ก เพื่อลดผลกระทบจากความแตกต่างของอุณหภูมิ จากนั้น นำวางบนภาชนะที่ใส่ตัวอย่าง

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์

กราฟที่ได้นั้น ดังที่กล่าวไว้แล้วประกอบด้วย ฟังก์ชันระหว่างอัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและอุณหภูมิ และฟังก์ชันระหว่างน้ำหนักที่หายไปต่ออุณหภูมิ ซึ่งกราฟฟังก์ชันของอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก จะแสดงถึงช่วงอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก กล่าวคือในช่วงอุณหภูมินั้นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เช่น มีการสลายตัวของสาร มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น หรือน้ำที่อยู่ในโครงสร้างมีการระเหยออก เป็นต้น ซึ่งรูปแบบของกราฟนี้จะแสดงในรูปปริมาณของน้ำหนักที่หายไปของส่วนประกอบแต่ละส่วนที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ ข.2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง TG/DTA ซึ่งจะได้ค่าอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 และ G64 เป็น 281.4 และ 274.1 ตามลำดับ



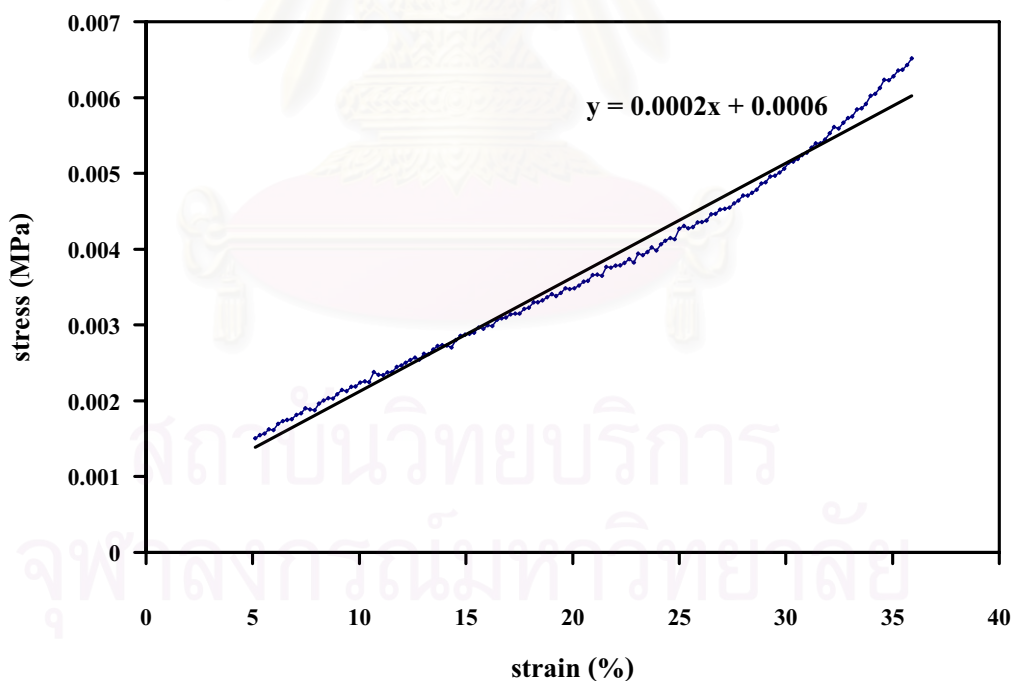
รูปที่ ข.2 ตัวอย่างกราฟการวิเคราะห์อุณหภูมิในการเสื่อมสภาพของ โครงเลี้ยงเซลล์ G100 และ G64

ข.3 การหาค่าความทนทานต่อแรงกด

การหาค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินแบบ food grade (G100) โดยหาค่าความชัน (Compressive modulus) ที่ constant tensile deformation rate (0.5 มิลลิเมตร/นาที) ในสภาพที่แห้งที่ 25 องศาเซลเซียส จากสูตร

$$\text{Compressive modulus} = \frac{\text{stress}(kPa)}{\text{strain}(\%)}$$

การวิเคราะห์หาค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ทำโดยการหาค่าความชัน (Compressive modulus) ในตอนเริ่มต้นจากกราฟที่ถูก plot ระหว่าง strain(%) และ stress (MPa) โดยเลือกค่า strain (%) ที่ 5 ถึง 35 จากข้อมูล ซึ่งจะได้ค่า Young Modulus = 0.2 kPa เป็นค่าแสดง ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 แสดงดังรูปที่ ข.3



รูปที่ ข.3 การคำนวณหาค่า Compressive modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์

ข.4 การหาร้อยละการเชื่อมโยงพันธะ

การหาร้อยละการเชื่อมโยงพันธะทำได้โดยใช้วิธี ใช้ 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ลงไปในสารละลาย NaHCO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของ ในน้ำกลั่นที่ pH 8.5 และตามด้วย 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย TNBS ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น (สารละลาย TNBS นี้ไม่สามารถทำเก็บไว้ใช้ได้เนื่องจากสารประเภทนี้มีควมไวต่อแสง)
 - ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอ่างให้ความร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 - หากพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ยังละลายไม่หมดให้เติม กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที
 - วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ใน โครงเลี้ยงเซลล์
- ร้อยละการเชื่อมโยงพันธะสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Degree of cross-linking (\%)} = 1 - \frac{\text{Absorbance}(c)}{\text{Absorbance}(n)} \times 100$$

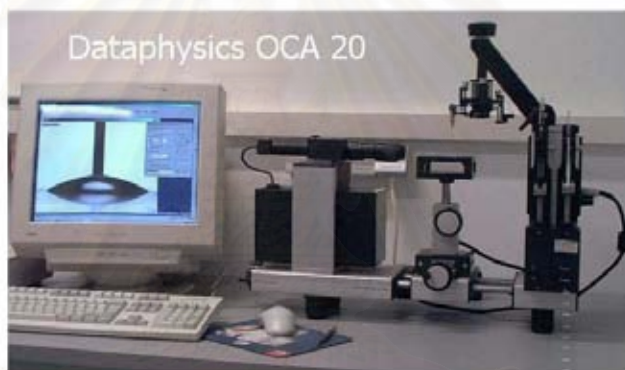
โดยที่ Absorbance(c) เป็นค่าการดูดกลืนแสงของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ และ Absorbance(n) เป็นค่าการดูดกลืนแสงของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ได้เชื่อมโยงพันธะ

ข.5 การหาค่ามูมสัมผัสน้ำ

ขั้นตอนการวัดค่ามูมสัมผัสน้ำ

- เตรียมสารละลายใส่ในหลอดเข็มฉีดยา (ข้อควรระวัง ในการเตรียมสารละลายใส่ในหลอดเข็มฉีดยา สารละลายต้องเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ถ้าเป็นสารที่มีความเหนียวต้องระวังเพราะทำความสะอากยาก)
- นำเข็มฉีดยาใส่ในชุดปรับละเอียด
- ปรับติดตั้งในแกนใส่เข็มฉีดยา ลองปรับดูว่าหยดสารออกมาได้สะดวกหรือไม่

- เตรียมตัวอย่างที่ต้องการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ ให้มีพื้นผิวสะอาด วางในระดับที่แสงส่องด้านหลังของเลนส์ส่องได้ถึง
- จัดวางตัวอย่างในที่วางบนแท่นจับยึดให้แนบกับแท่น
- เปิดคอมพิวเตอร์
- เมื่อเครื่องคอมพิวเตอร์เปิดแล้วเลือกโปรแกรม Tante Software ซึ่งหลักการวัดคือ การใช้กล้องวิดีโอ CCD ดึงภาพจริงจากบริเวณที่ต้องการวัดมาส่งผ่านแผงวงจร สร้างภาพบนจอคอมพิวเตอร์แล้วใช้โปรแกรมที่สามารถแยกแยะขอบเขตของภาพช่วยในการคำนวณค่ามุมองศาที่ต้องการนำเสนอบนจอคอมพิวเตอร์ ซึ่งเครื่อง contact angle แสดงในรูปที่ ข.5



รูปที่ ข.5 Contact angle
(ที่มา: www.imtek.de)

การวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อพิจารณาความเป็น hydrophobicity และ hydrophilicity ของพื้นผิวชิ้นงาน สามารถพิจารณาจากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้โดยหากค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวชิ้นงานมีค่ามากกว่า 65 องศา แสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophobicity แต่ถ้าหากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophilicity [Vogler, EA. 1998]

ข.6 การหาค่าการย่อยสลายในสภาพภายนอกร่างกาย

การหาค่าการย่อยสลายในสภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 ที่เตรียมจากวิธีผสมทำได้โดยการหาค่าน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 ก่อนแช่ในเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.7 มิลลิกรัม และค่าน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 หลังจากแช่ในเอนไซม์คอลลาจีเนสตามเวลาที่กำหนด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.8 มิลลิกรัม จากนั้นทำการคำนวณหาค่าการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดังสมการ

$$\text{การย่อยสลาย} = 100 - \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100$$

โดย W_o เป็นน้ำหนักเริ่มต้น และ W_t เป็นน้ำหนักที่เวลาใดๆ

$$\text{การย่อยสลาย} = 100 - \frac{5.7 - 4.8}{5.7} \times 100 = 84.21$$

ดังนั้นการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ G100 จึงมีค่าเท่ากับร้อยละ 84.21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฟ้าใส วิวัฒน์วงศ์วนา เกิดเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด
เชียงใหม่ เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนดาราวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี
วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ในปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย