

การพัฒนาอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ



นางสาวสวรรยา สีนธพ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF GELATIN/THAI SILK FIBROIN MICROSPHERES FOR THREE  
DIMENSIONAL CELL CULTURE

Miss Sawanya Sinthop



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

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ ไทยสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ
โดย	นางสาวสวรรรยา สิ้นชีพ
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสครดา กนกพานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	นายแพทย์สมชาย แสงกิจพร

---

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสครดา กนกพานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(นายแพทย์สมชาย แสงกิจพร)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพานิชกุล)

.....กรรมการ  
(ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร.อิสราวุธ ประเสริฐสังข์)

สุวรรณยา สิ้นชีพ : การพัฒนาอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (DEVELOPMENT OF GELATIN/THAI SILK FIBROIN MICROSPHERES FOR THREE DIMENSIONAL CELL CULTURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.โศรดา กนกพานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: นายแพทย์สมชาย แสงกิจพร, 187 หน้า.

การพัฒนาอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย เพื่อพัฒนาต้นแบบของการทดสอบยารักษามะเร็งในระดับห้องปฏิบัติการ ทำโดยเตรียมอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก ได้แก่ 100/0, 90/10, 70/30 และ 50/50 โดยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์หรือด้วยความร้อนที่สภาวะสุญญากาศ ขนาดของอนุภาคเกิดจากการปั่นกวนให้ได้อนุภาค 3 ขนาดคือ S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที, M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) ใช้ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที และ L ( $736.64 \pm 17.51$  ไมโครเมตร) ใช้ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคมีลักษณะรูปร่างทรงกลม พื้นผิวเรียบ เมื่อเพิ่มปริมาณไฟโบรอินในอนุภาคไมโคร ทำให้ระดับการเชื่อมขวางสูงขึ้น โดยวิเคราะห์จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลง ความสามารถในการดูดซับน้ำมากขึ้น และอัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคไมโครที่มีเจลาตินอย่างเดียว ผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow derived stem cells, MSC) และเซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cell line, MCF-7) บนอนุภาคไมโคร พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถยึดเกาะบนอนุภาคไมโครเจลาตินได้ดีที่สุด ประมาณร้อยละ 42-51 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม โดยเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Agitation seeding อนุภาคไมโครเจลาตินขนาด S ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวที่เร็วที่สุดเท่ากับ  $6.4 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง และ  $108.3 \pm 0.4$  ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อนำต้นแบบอนุภาคไมโครเจลาตินขนาด S ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ไปทำการทดสอบความไวต่อยา TAMOXIFEN พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ มีค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ 0.12 ไมโครโมลาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบสามมิติบนอนุภาคไมโครด้วยความหนาแน่นเซลล์สูงสุด  $23.0 \times 10^4$  และ  $19.6 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.92 และ 0.70 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ อนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่พัฒนาขึ้นนี้แสดงถึงศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเป็นต้นแบบวัสดุสำหรับทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5470411521 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: MICROSPHERES / GELATIN / SILK FIBROIN / BREAST CANCER CELL

SAWANYA SINTHOP: DEVELOPMENT OF GELATIN/THAI SILK FIBROIN MICROSPHERES FOR THREE DIMENSIONAL CELL CULTURE. ADVISOR: ASST. PROF.SORADA KANOKPANONT, CO-ADVISOR: SOMCHAI SANGKITPORN,MD., 187 pp.

Development of microspheres from gelatin and Thai silk fibroin for *in vitro* chemosensitivity of breast cancer cells. Gelatin (G) and silk fibroin (SF) were blended at different weight ratios of 100/0, 90/10, 70/30, and 50/50 water in oil emulsion technique and were crosslinked glutaraldehyde (GA) or dehydrothermal (DHT). Average size of microspheres obtained were at S size ( $316.78 \pm 13.23 \mu\text{m}$ ), M size ( $555.66 \pm 23.58 \mu\text{m}$ ) and L size ( $736.64 \pm 17.51 \mu\text{m}$ ). The morphology of microspheres were round shape and smooth surface. Blending SF into microspheres increases the crosslinking degree and extends degradation rate of the G/SF microspheres, comparing to the gelatin microspheres. *In vitro* attachment and proliferation of MCF-7 and MSC cultured, the 100/0 had showed the highest potential to promote the cell attachment (42-51%). Cell seeding densities at  $8.35 \times 10^4$  cells/mg were used on the S size of GA crosslinked microspheres, highest specific growth rate ( $\mu$ ) of  $6.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  and population doubling time (PDT) of  $108.3 \pm 0.4$  hours. For *in vitro* chemosensitivity test, the  $\text{IC}_{50}$  on two dimensional culture was at  $0.12 \mu\text{M}$ . At cell densities  $23.0 \times 10^4$  and  $19.6 \times 10^4$  cells/mg,  $\text{IC}_{50}$  on 3D microspheres were at  $0.92$  and  $0.70 \mu\text{M}$ . The data from experiments showed potential of microspheres for *in vitro* chemosensitivity test.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature .....

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไตรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, นายแพทย์สมชาย แสงกิจพร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัยได้อย่างถูกต้อง

ขอขอบคุณคณะกรรมการ ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล ประธานกรรมการ, รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพานิชกุล, ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ และ ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ ที่ท่านได้สละเวลาอันมีค่ามาร่วมเป็นการสอบวิทยานิพนธ์นี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณคุณศิริภากร แสงกิจพร ผู้อำนวยการสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับคำแนะนำและการให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน สำหรับการทำวิจัย และให้ความอนุเคราะห์สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Breast cancer cell line) และสถานที่สำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณคุณรุ่งนภา แยมเดช คุณจุฑาทิพย์ แซ่ลี สำหรับคำแนะนำและการช่วยเหลือในทุกด้าน รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ที่ได้ให้กำลังใจ คำปรึกษา และคำแนะนำ ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณพัชราภรณ์ บุญชู และพี่ๆทุกคนของศูนย์เซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟู สภาวะเสื่อม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับการช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนรัชดาภิเษก สมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (RES560530175-AS)

ขอขอบคุณ สถานที่ทำวิจัย ได้แก่ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวภาพ และห้องปฏิบัติการชีววัสดุ อาคารอนุสาสน์ยันตรกรรม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์เซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟู สภาวะเสื่อม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ในการทำการทดลองและความอนุเคราะห์เพื่อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ชีววัสดุ (Biomaterial).....	6
2.1.1 เจลาติน (Galatin).....	6
2.1.1.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเจลาติน.....	6
2.1.1.2 สมบัติทั่วไปของเจลาติน.....	11
2.1.1.3 การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน.....	14
2.1.2 โปรตีนไหม (Silk protein).....	15
2.2.2.1 โครงสร้างของโปรตีนไหม.....	15
2.2.2.2 การประยุกต์ใช้งานของเส้นไหม.....	26
2.1.3 การประยุกต์ใช้งานเจลาตินร่วมกับไฟโบรอินไหม.....	26
2.2 อนุภาคไมโคร (Microspheres).....	29
2.2.1 การประยุกต์ใช้งานอนุภาคไมโคร.....	29

2.2.2	วิธีการขึ้นรูปอนุภาคไมโคร (Fabrication of microspheres).....	30
2.2.2.1	Single evaporation method .....	30
2.2.2.2	วิธีแยกวัฏภาคแบบ Phase separation หรือ Coacervation.....	33
2.2.2.3	วิธีการทำแห้งโดยการฉีดพ่นด้วยสเปรย์ (Spray drying).....	33
2.2.3	ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคไมโคร.....	33
2.3	การเชื่อมขวาง (Crosslinking).....	34
2.3.1	การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical Crosslinking) .....	34
2.3.1.1	การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment; DHT).....	34
2.3.1.2	การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-irradiation).....	35
2.3.2	การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical Crosslinking).....	36
2.3.2.1	การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde).....	36
2.3.2.2	การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde).....	38
2.3.2.3	การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide (EDC) .....	39
2.4	ระบบการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (Three dimensional cell culture) .....	42
2.4.1	การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้เซลล์เกิดการเกาะตัวกันตัวเอง (Spontaneous cell aggregation).....	42
2.4.2	การเพาะเลี้ยงเซลล์บนไฮโดรเจลที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ (Natural and Synthetic hydrogels).....	44
2.4.3	การเพาะเลี้ยงเซลล์บนวัสดุของแข็งที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ (Natural and Synthetic solid materials).....	46
2.5	ประเภทของเซลล์ .....	54
2.6	เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cell line, MCF-7) .....	54
2.7	การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity Assay).....	56



2.7.1 การทดสอบความไวต่อยาที่มีในระบบการค้ำ.....	59
2.8 ทาม็อกซิเฟน (Tamoxifen).....	62
2.8.1 สมบัติของทาม็อกซิเฟน.....	63
2.9 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	64
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	67
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	67
3.2 อุปกรณ์.....	68
3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย.....	70
3.4 การดำเนินงานวิจัย.....	71
3.4.1 การเตรียมสารละลายเจลาติน.....	71
3.4.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน.....	71
3.4.3 การขึ้นรูปอนุภาคไมโครที่เตรียมจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย.....	73
3.4.4 การเชื่อมขวาง.....	73
3.4.5 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติ.....	74
3.4.5.1 ลักษณะสมบัติของสายละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย.....	74
ก. ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential).....	74
ข. ค่าความหนืด (Apparent viscosity).....	74
3.4.5.2 ลักษณะสมบัติของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย.....	76
ก. โครงสร้างสัณฐาน (Morphology) และรูปร่างของอนุภาคไมโครเปียก... ..	76
ข. ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ.....	76
ค. การดูดซับน้ำ.....	76
ง. ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ.....	77
3.4.6 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Mesenchymal Stem Cells, MSC).....	77

3.4.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมบนโครงเลี้ยงเซลล์อนุภาคไมโคร.....	78
3.4.7.1 การยึดเกาะของเซลล์ (attachment) บนอนุภาคไมโคร .....	78
3.4.7.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) บนอนุภาคไมโคร .....	79
3.4.8 ทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็งเต้านมใน ระดับห้องปฏิบัติการ .....	81
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	84
3.6 สถานที่ทำงานวิจัย .....	84
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	85
4.1 สมบัติของสารละลายและอนุภาคไมโครของเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย.....	85
4.1.1 สมบัติของสารละลายเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย .....	85
ก. ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential).....	85
ข. ความหนืดของสารละลายผสมระหว่างเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย .....	87
4.1.2 สมบัติของอนุภาคไมโครจากเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย .....	89
ก. โครงสร้างสัณฐาน (Morphology) .....	89
ข. ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ.....	97
ค. ความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโคร .....	103
ง. การย่อยสลายทางชีวภาพนอกร่างกาย .....	105
4.2 สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินต่อการยึดเกาะ และเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูและเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับ ห้องปฏิบัติการ.....	109
4.2.1 การยึดเกาะของเซลล์ (attachment) บนอนุภาคไมโคร.....	109
4.2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) บนอนุภาคไมโคร.....	114
4.2.2.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนอนุภาคไมโคร.....	114
4.2.2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโคร .....	119

4.3 การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็งเต้านมใน ระดับห้องปฏิบัติการ.....	133
4.3.1 การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ .....	133
4.3.2 การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไม โคร.....	140
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	148
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	148
5.2 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	151
5.3 ข้อเสนอแนะ .....	151
รายการอ้างอิง.....	152
ภาคผนวก ก.....	167
ภาคผนวก ข.....	170
ภาคผนวก ค.....	171
ภาคผนวก ง.....	173
ภาคผนวก จ.....	174
ภาคผนวก ฉ.....	175
ภาคผนวก ช.....	176
ภาคผนวก ซ.....	177
ภาคผนวก ฌ.....	180
ภาคผนวก ฎ.....	182
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	187



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินชนิดเอและบี [Neuman, R. E. 1949].....	10
ตารางที่ 2.2 สมบัติของเจลาตินชนิดเอและบี .....	11
ตารางที่ 2.3 ค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์มชนิดต่างๆ.....	12
ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของไหมสกุล <i>Bombyx mori</i> สายพันธุ์ญี่ปุ่น.....	16
ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซินของไหมสกุล <i>Bombyx mori</i> สายพันธุ์ญี่ปุ่น [Vapari, C and Kaplan D. L. 2007].....	20
ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของเส้นใยไหมและวัสดุชนิดอื่นๆ [Altman G.H. 2003].....	21
ตารางที่ 2.7 ค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์มไฟโบรอินไหมสายพันธุ์ต่างๆ.....	24
ตารางที่ 2.8 สรุปงานวิจัยการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนและการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ของเจลาติน.....	41
ตารางที่ 2.9 สรุปงานวิจัยที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครนอกร่างกาย ( <i>In Vitro</i> ).....	52
ตารางที่ 2.10 ข้อมูลการทดสอบความไวต่อยาที่มีในระบบการค้า (ต่อ).....	60
ตารางที่ 4.1 ค่าศักยภาพเต้าของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากไอออนที่พีเอช 5.5 และในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.4.....	87
ตารางที่ 4.2 ค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ความเข้มข้นของสารละลายร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส .....	89
ตารางที่ 4.3 ร้อยละผลได้ (Yields) ของขนาดเฉลี่ยอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ จากผลของความเร็รรอบ 3 ขนาด คือ ความเร็รรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด S, ความเร็รรอบ 130 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด M และความเร็รรอบ 110 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด L .....	91
ตารางที่ 4.4 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยแห้งและเปียก หลังผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารกลูตารัลดีไฮด์ .....	92

<b>ตารางที่ 4.5</b> ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยแห้งและเปียก หลังผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อน .....	92
<b>ตารางที่ 4.6</b> ร้อยละการย่อยสลายของอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตาร์ลดีไฮด์และด้วยความ ความร้อนหลังแช่ในเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 163 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.4 เป็น เวลา 14 วัน.....	108
<b>ตารางที่ 4.7</b> ค่าครึ่งชีวิต (haft life, $t_{1/2}$ ) ของการย่อยสลายของอนุภาคไมโครที่แช่ในเอนไซม์ คอลลาจีเนสความเข้มข้น 163 หน่วยต่อมิลลิลิตรพีเอช 7.4 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน.....	108
<b>ตารางที่ 4.8</b> ร้อยละการยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาของการแบ่งตัวเป็น ทวีคูณ (PDT) หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูเป็นเวลา 14 วัน (คำนวณจาก รูปที่ 4.16) .....	118
<b>ตารางที่ 4.9</b> ร้อยละการยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาของการแบ่งตัวเป็น ทวีคูณ (PDT) หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7 เป็นเวลา 14 วัน (คำนวณจากรูปที่ 4.17).....	123
<b>ตารางที่ 4.10</b> รายงานความแตกต่างของวัสดุพื้นผิวแข็ง (Substrate stiffness) ที่มีความ เหมาะสมต่อเซลล์ชนิดต่างๆ .....	127
<b>ตารางที่ 4.11</b> ความหนาแน่นของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูและเซลล์มะเร็งเต้านมต่อ พื้นที่ผิวของการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติและสามมิติบนอนุภาคไมโครของงานวิจัยนี้.....	130
<b>ตารางที่ 4.12</b> ผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครจากเจลลาตินและไฟโบ รอินไหมไทยที่มีต่อร้อยละการยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน (คำนวณจากรูปที่ 4.19) .....	132
<b>ตารางที่ 4.13</b> ร้อยละการมีชีวิตอยู่และร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ชนิด MCF-7 หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยา ทาม็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ (คำนวณจากรูปที่ 4.21).....	138
<b>ตารางที่ 4.14</b> การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายลดลงเท่ากับร้อยละ 50 (IC <sub>50</sub> ) ของยาทาม็อกซิเฟนที่ได้จากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของอื่นๆ .....	144

ตารางที่ 4.15 ร้อยละการมีชีวิตอยู่และร้อยละยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 บนอนุภาคไมโครหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาน็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ (คำนวณจากรูปที่ 4.23).....	145
ตารางที่ 4.16 การวิเคราะห์ข้อดีข้อเสียระบบทดสอบในงานวิจัยนี้กับระบบที่ใช้ทางการค้า.....	146



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของหน่วยซ้ำเจลาติน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน ได้แก่ อะลานีน, ไกลซีน,..... 7

รูปที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin..... 8

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเส้นใยไหม [Shang S. และคณะ 2013]..... 17

รูปที่ 2.4 โครงสร้างพอลิเปปไทด์ของเส้นใยไฟโบรอิน..... 19

รูปที่ 2.5 โครงสร้างทุติยภูมิแบบพลิทเบต้าของไฟโบรอิน [Wenk E. และคณะ 2011]..... 19

รูปที่ 2.6 โครงสร้างทุติยภูมิแบบ  $\alpha$ -helix ของไฟโบรอิน [Wenk E. และคณะ 2011]..... 19

รูปที่ 2.7 สเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN), ฟิล์มไฟโบรอินไหมพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินไหมพันธุ์นครราชสีมา (K8) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) [Kaewprasit K. และคณะ 2014]..... 23

รูปที่ 2.8 โครงเลี้ยงเซลล์อนุภาคไมโครผลิตจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ..... 30

รูปที่ 2.9 การเตรียมไมโครพาร์ติเคิลโดยวิธี w/o emulsion และ o/o emulsion ..... 32

รูปที่ 2.10 การเตรียมอนุภาคไมโครด้วยวิธีอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple-emulsion technique).... 32

รูปที่ 2.11 การเชื่อมขวางคอลลาเจนด้วยความร้อน [ดัดแปลงจาก Haugh, M.G.และคณะ 2009]..... 34

รูปที่ 2.12 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [Lee C.R. 2001]..... 37

รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย ..... 70

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน ..... 72

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการเตรียมอนุภาคไมโครโดยการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์..... 75

รูปที่ 3.4 กราฟตัวอย่างแสดงจลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์โดยแสดงถึงช่วง (phase) ต่างๆของการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ ..... 80

รูปที่ 3.5 แผนผังการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งด้วยกลุ่มควบคุมต่างๆ โดยการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและการเลี้ยงแบบสามมิติบนอนุภาคไมโคร..... 83

<b>รูปที่ 4.1</b> (ก) อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยขนาด M (ข) ภาพตัดขวางอนุภาคไมโคร	91
<b>รูปที่ 4.2</b> ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครแห้งจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 75 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)	93
<b>รูปที่ 4.3</b> ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครแห้งจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 75 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)	94
<b>รูปที่ 4.4</b> ลักษณะรูปร่างของอนุภาคไมโครเปียกจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังจากแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร)	95
<b>รูปที่ 4.5</b> ลักษณะรูปร่างของอนุภาคไมโครเปียกจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังจากแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร)	96
<b>รูปที่ 4.6</b> ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [Lee C.R. 2001]	98
<b>รูปที่ 4.7</b> ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นจากเชื่อมขวางโดยใช้ด้วยความร้อน [Haugh, M.G.และคณะ 2009]	98
<b>รูปที่ 4.8</b> ปริมาณอะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA และการเชื่อมขวางด้วย DHT (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a-h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ )	101
<b>รูปที่ 4.9</b> ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (GA) และ	



การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (DHT) (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ).....	102
<b>รูปที่ 4.10</b> ร้อยละการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย (GA) และการเชื่อมขวางด้วย (DHT) (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ).....	104
<b>รูปที่ 4.11</b> ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยอัตราส่วนผสมต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA และเชื่อมขวางด้วย DHT (ก) อนุภาคขนาด S (ข) อนุภาคขนาด M (ค) อนุภาคขนาด L .....	106
<b>รูปที่ 4.12</b> ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยขนาด M ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ โดยเปรียบเทียบร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ด้วยวิธี Centrifugal Seeding และวิธี Agitation Seeding เพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $0.86 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม (หรือ $9.26 \times 10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo tube (a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ) .....	111
<b>รูปที่ 4.13</b> อันตรกิริยาของเซลล์ที่กระทำกับหมู่ RGD ของบนพื้นผิวของวัสดุ .....	112
<b>รูปที่ 4.14</b> (ก) จำนวนเซลล์ (ข) ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงด้วย Agitation Seeding จำนวนเซลล์เริ่มต้น $0.5 \times 10^4$ , $0.86 \times 10^4$ , $1.67 \times 10^4$ , $3.34 \times 10^4$ และ $8.33 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม (ขนาด M) ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิกรัม (a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ).....	113
<b>รูปที่ 4.15</b> (ก) จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ความหนาแน่นเซลล์ $1.05 \times 10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (ข) จำนวนเซลล์ MSC ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$ ไมโครเมตร) หลังจากการทดสอบการยึดเกาะ โดยใช้วิธี Agitation Seeding จำนวนเซลล์เริ่มต้น $0.86 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม (หรือ $9.26 \times 10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิกรัม .....	117
<b>รูปที่ 4.16</b> (ก) จำนวนเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ความหนาแน่นเซลล์ $4 \times 10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (ข) จำนวนเซลล์ MCF-7 ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาด M (520 – 585 ไมโครเมตร) หลังจากการทดสอบการยึดเกาะโดยใช้วิธี Agitation Seeding จำนวนเซลล์เริ่มต้น $8.33 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม (หรือ $89.86 \times 10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิกรัม.....	122

**รูปที่ 4.17** จำนวนเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังจากการทดสอบการยึดเกาะและเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโคร (ก) G/SF 100/0 ขนาด S (ข) G/SF 50/50 ขนาด S (ค) G/SF 100/0 ขนาด M (ง) G/SF 50/50 ขนาด M (จ) G/SF 100/0 ขนาด L (ฉ) G/SF 50/50 ขนาด L โดยใช้วิธี Agitation Seeding ความหนาแน่นเซลล์  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ..... 129

**รูปที่ 4.18** แสดงการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอิน 100/0 และ 50/50 ที่ขนาดและการเชื่อมขวางต่างๆ หลังจากการทดสอบที่เวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 75 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)..... 131

**รูปที่ 4.19** จำนวนเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และร้อยละการมีชีวิตหลังจากการทดสอบความไวต่อยาฆ่ามะเร็งที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ใน 96 well plate ( $1.25 \times 10^5$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทานีออกซิเฟนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครเมตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM), อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร, กลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm) (a-f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )..... 135

**รูปที่ 4.20** รูปร่างของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 หลังการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM), อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร, อาหารเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm) และกลุ่มของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทานีออกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของการทดสอบแบบสองมิติในห้องปฏิบัติการ..... 139

**รูปที่ 4.21** จำนวนเซลล์และร้อยละการมีชีวิตของเซลล์หลังการทดสอบความไวต่อยาที่ความหนาแน่นของเซลล์ (ก)  $8.33 \times 10^4$  และ (ข)  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมบนอนุภาคไมโครขนาด S ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาทานีออกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร และอาหารที่ผสมด้วยซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm (a-h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ ) ..... 142

**รูปที่ ก.1** ร้อยละผลได้ (Yields) ของขนาดเฉลี่ยอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ จากผลของความเร็รรอบ 3 ขนาด คือ ความเร็รรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด S, ความเร็รรอบ 130 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด M และความเร็รรอบ 110 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด L (a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ ) ..... 167

**รูปที่ ก.2** การกระจายตัวของขนาดอนุภาค S (size distribution) ของอนุภาคไมโครเจลลาติน..... 168

**รูปที่ ก.3** การกระจายตัวของขนาดอนุภาค M (size distribution) ของอนุภาคไมโครเจลลาติน .... 169

**รูปที่ ก.4** การกระจายตัวของขนาดอนุภาค L (size distribution) ของอนุภาคไมโครเจลลาติน และไฟโบรอินที่อัตราส่วนผสมต่างๆ และการคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงกรองขนาดต่างๆ..... 169

**รูปที่ ข.1** เครื่องวัดความหนืดแบบสั่นสะเทือน (Vibro Viscometer) ..... 170

**รูปที่ ค. 1** การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) กับหมู่อะมิโน -NH<sub>2</sub> อิสระของโปรตีน [Bubnis W.A. และ Ofner lii C.M. 1992]..... 171

**รูปที่ ค.2** กราฟมาตรฐาน  $\beta$ -alanine (n=3)..... 172

**รูปที่ ง.1** ร้อยละของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่เพิ่มขึ้นจากการบวมน้ำ (Swelling) ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ถูกเชื่อมขวางด้วย GA และด้วยวิธี DHT (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )... 173

**รูปที่ จ.1** ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครจากเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่าน. 174

**รูปที่ ฉ.1** กราฟมาตรฐานของการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคไมโครด้วยวิธี Agitation Seeding และวิธี Centrifugal Seeding ..... 175

**รูปที่ ช.1** กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงด้วย Agitation Seeding ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างๆ..... 176

**รูปที่ ช.1** กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูด้วยวิธี DNA assay ..... 177

**รูปที่ ฉ.1** กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมหลังจากการทดสอบเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโครขนาด M (555.66±23.58 ไมโครเมตร) และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay ..... 180

**รูปที่ ฉ.2** กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครขนาด S, M และ L ที่อัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA และ DHT ด้วยวิธี MTT assay 181

**รูปที่ ญ.1** กราฟมาตรฐานของการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสอง  
 มิติด้วยวิธี MTT assay ..... 182

**รูปที่ ญ.2** ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งในการทดสอบความไวต่อยารักษาโดยการ ..... 183

**รูปที่ ญ.3** กราฟมาตรฐานของการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสาม  
 มิติ ..... 184

**รูปที่ ญ.4** ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งในการทดสอบความไวต่อยารักษาโดยการ ..... 185

**รูปที่ ญ.5** ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งในการทดสอบความไวต่อยารักษาโดยการ ..... 186



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วยยา ตัวยาส่วนใหญ่มักส่งผลในแง่ลบอย่างรุนแรงเนื่องจากมีความเป็นพิษสูง ในการรักษามักใช้ตัวยาหลายชนิดที่มีกลไกทำลายเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกันร่วมกัน กลไกหลากหลายนี้สามารถส่งผลข้างเคียงร้ายแรงต่อผู้ป่วยได้ ดังนั้นการทดสอบความไวต่อยาในการรักษามะเร็งจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้ทราบขนาดของยาที่ใช้ในรักษา ซึ่งปัญหาที่พบในการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งคือเมื่อนำเซลล์เนื้อเยื่อของผู้ป่วยหรือเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cells) มาทำการเพาะเลี้ยง ลักษณะของเซลล์มีความหลากหลายต้องทำการคัดแยกเซลล์ก่อนการเพาะเลี้ยง อีกทั้งมีอัตราการเจริญเติบโตช้าเนื่องจากเซลล์ปกติมีกระบวนการแก่ชราของเซลล์ (cell senescence) ซึ่งทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวได้อย่างจำกัดจำนวนครั้ง และเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้มักสูญเสียลักษณะเฉพาะของเซลล์นั้นๆอย่างรวดเร็ว [Lucey P.B. และคณะ 2009] อีกปัญหาหนึ่งคือการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ การเพาะเลี้ยงสองมิติมีการเจริญเติบโตในแบบระนาบเดียว ขาดความซับซ้อนและการสื่อสารของเซลล์กับเซลล์แบบไดนามิกและการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการแพร่กระจายของโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังขาดความลึกเชิงพื้นที่ในการเชื่อมต่อของเซลล์ ทำให้การปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์หายไป รูปร่างของเซลล์ การแสดงออกของยีนส์ การเจริญเติบโตของเซลล์แตกต่างกับในร่างกาย ทำให้กลไกต่อการตอบสนองของยาแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงแบบสามมิติซึ่งมีโครงสร้างการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมรอบตัวคล้ายคลึงกับเซลล์ของเนื้อเยื่อที่อยู่ในร่างกาย [Xu X. และคณะ 2014] ดังนั้นเพื่อให้สามารถทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพในระดับห้องปฏิบัติการ และเทียบเท่ากับการทดสอบความไวต่อยาแบบสามมิติในทางการค้าที่มีราคาค่อนข้างสูง คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีและระบบเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติในร่างกายบนอนุภาคไมโครที่ผลิตจากชีววัสดุจากธรรมชาติ คือ เจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

ระบบการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติในระดับห้องปฏิบัติการได้ถูกพัฒนาให้นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างแพร่หลายในงานด้านการแพทย์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติเป็นต้นแบบที่ทำได้ง่ายโดยทั่วไป แต่ค่อนข้างมีความแตกต่างกันการแสดงออกของเซลล์บนพื้นผิว โครงสร้างของเซลล์

ที่ซับซ้อน ความหนาแน่นของเซลล์และการทำงานของเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อร่างกาย เนื่องจากการสื่อสารของเซลล์ในเนื้อเยื่อร่างกายมีลักษณะการแสดงออกที่ไม่สามารถพบได้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ ซึ่งเซลล์เกาะบนพื้นผิวแบบชั้นเดียว [Lee G.Y. และคณะ 2007] ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจึงเป็นรูปแบบการเพาะเลี้ยงที่ถูกพัฒนาเพื่อปรับปรุงการแสดงออกของเซลล์ให้มีลักษณะใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อจริงในร่างกาย ซึ่งจะสามารถกระตุ้นการทำงาน (Function) และการเปลี่ยนแปลง (Differentiation) ของเซลล์ได้ดี แม้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจะมีข้อจำกัดด้านการส่งผ่านอาหาร ออกซิเจน และความสามารถในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์

ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิตินั้นสามารถเพาะเลี้ยงได้หลายรูปแบบ เช่น เพาะเลี้ยงให้เซลล์สามารถรวมกลุ่มกันเอง (Spontaneous cell aggregation) โดยอาศัยความหนาแน่นของเซลล์และกายภาพของระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจล (Hydrogel) และเพาะเลี้ยงบนวัสดุของแข็งหรือโครงเนื้อเยื่อสามมิติ (Solid materials) ทั้งนี้ในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจึงต้องอาศัยความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยง โดยต้องศึกษาพัฒนาองค์ความรู้ 3 ส่วนสำคัญได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffolds) สารโปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth factors) และเซลล์ (Cells) วัสดุที่จะนำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ วัสดุสังเคราะห์ (Synthetic polymers) เช่น พอลิคาโพรแล็คโตน (poly caprolactone) พอลิแล็คติก แอซิด (polylactic acid) เป็นต้น วัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์มีข้อดีคือ สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ ส่งผลให้วัสดุที่ผลิตมีสมบัติต่างๆตามต้องการไม่ว่าจะเป็นสมบัติทางกายภาพและทางเคมี อาทิ การทนต่อแรงดึง อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ เป็นต้น แต่ข้อเสียคือ ไม่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับสิ่งมีชีวิต (Non-biocompatibility) อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Toxicity) และวัสดุธรรมชาติ (Natural polymers) เช่น คอลลาเจน (collagen) เจลาติน (gelatin) ไหม (silk) และไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น วัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติมีข้อดีคือสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ อีกทั้งยังส่งเสริมให้เซลล์มีการยึดเกาะและเจริญเติบโต กระตุ้นให้เซลล์เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้ แต่มีข้อจำกัดคือด้านความแข็งแรงเกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว

การเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติโดยทั่วไปมักเกิดปัญหาเรื่องข้อจำกัดการนำส่งมวลสาร (mass transfer limit) คือมีความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์เกินกว่า 5 มิลลิเมตร [Radisic M.

และคณะ 2004] ทำให้เซลล์ที่อยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ ขาดออกซิเจนและอาหาร เซลล์ตายเกิดขึ้น หากต้องการลดข้อจำกัดดังกล่าว โครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีความหนาไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร [Martin และคณะ 1998] และขนาดรูพรุนมากกว่า 100 ไมโครเมตร [Hutmacher D.W. และคณะ 2000] อนุภาคไมโครเป็นอนุภาคขนาดเล็กที่ทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อสนับสนุนการสร้างของเนื้อเยื่อสามมิติ วัสดุที่ใช้ต้องสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์และมีการเชื่อมขวางกันโดยวิธีทางเคมีหรือกายภาพเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับวัสดุ ข้อดีของโครงเลี้ยงเซลล์แบบอนุภาคไมโคร คือ สามารถดูดซับน้ำได้ สามารถควบคุมให้มีสมบัติตามที่ต้องการใช้งาน และมีสัดส่วนพื้นที่ผิวในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์สูง [Kang S.W. และคณะ 2009] นอกจากนี้การนำไปใช้งานในร่างกาย (*In vivo*) ยังสามารถทำได้โดยฉีดผ่านปลายเข็มไปยังจุดเป้าหมาย ซึ่งเป็นการรักษาที่ตรงจุดและมีความสะดวก ส่วนใหญ่อนุภาคไมโครมักนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการแพทย์ เช่น ควบคุมการปลดปล่อยยา (Control release drug) เนื่องจากสามารถนำส่งยาไปยังเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ และสามารถควบคุมปริมาณการปลดปล่อยยาได้ ทำให้ผู้ป่วยสามารถหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงของยาในปริมาณที่มากเกินไป

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซ์คอลลาเจนที่มีอยู่ในกระดูก ผิวหนัง รวมทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ประเภทต่างๆ เจลาตินมีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษ แต่เจลาตินมีอัตราย่อยสลายที่เร็ว ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งาน จึงต้องมีการผสมกับวัสดุอื่นเพื่อเพิ่มความแข็งแรงและยืดอัตราการย่อยสลายที่เร็วของเจลาติน จากรายงานมีการนำเจลาตินมาผสมกับเส้นใยไฟโบรอินเพื่อปรับปรุงสมบัติ โดยเส้นใยไฟโบรอินช่วยยืดอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของเจลาติน [Mandal, B.B. และคณะ 2009, Okhawilai, M. และคณะ 2010] เนื่องจากเส้นใยไหมไฟโบรอินเป็นโปรตีนธรรมชาติที่มีสมบัติเชิงกลที่ดี มีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งเซลล์สามารถยึดเกาะได้ จึงเป็นที่นิยมนำมาเป็นโครงเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รายงานที่ผ่านมามีการพัฒนาโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อเจลาตินที่ผสมด้วยชีววัสดุอื่นๆ เพื่อปรับปรุงสมบัติ เช่น ไฟโบรอิน ไฮดรอกซีแอปาทาइट ไคโตซาน ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของวัสดุเหล่านี้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และกระตุ้นการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลายชนิด อาทิ เซลล์ผิวหนัง (Fibroblast) เซลล์กระดูกหนู (Mouse preosteoblast cell line,

MC3T3-E1 และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow-derived stem cells, MSC) [Vachiraroj N. และคณะ 2009, Jetbumpenkul P. และคณะ 2012]

งานวิจัยนี้จุดมุ่งหมายเพื่อผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์แบบอนุภาคไมโครที่เตรียมจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย โดยจะศึกษาลักษณะทางกายภาพของอนุภาค การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และการใช้ความร้อน และระบบการเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสามมิติในร่างกายที่มีผลต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์นอกร่างกาย การทดสอบความไวต่อยารักษา มะเร็ง (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาหาขนาดของยา ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งในระบบสามมิติ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เตรียมและศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์อนุภาคไมโคร (Microspheres) ที่เตรียมจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย เพื่อการเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสามมิติในระดับห้องปฏิบัติการ

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ขึ้นรูปอนุภาคไมโครด้วยสารละลายผสมระหว่างเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่ ความเข้มข้นของของแข็งรวมร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ด้วยกระบวนการอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) โดยตัวแปรที่ทำการศึกษา ได้แก่

- ก. อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย ได้แก่ 100/0, 90/10, 70/30 และ 50/50
- ข. ขนาดของอนุภาคไมโคร 3 ขนาดคือ ขนาด S (100-315), ขนาด M (300-500) และ ขนาด L (มากกว่า 700)
- ค. วิธีการเชื่อมขวาง 2 วิธีคือ การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) และการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อน (Dehydrothermal treatment)

1.3.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของอนุภาคไมโครที่ผสมระหว่างเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย ได้แก่



- ก. ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential) ของสารละลายผสมระหว่างเจลาติน และไฟโบรอินไหมไทย
- ข. ค่าความหนืด (Apparent viscosity) ของสารละลายผสมระหว่างเจลาติน และไฟโบรอินไหมไทย
- ค. โครงสร้างสัณฐาน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)
- ง. ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคไมโครด้วยวิธี 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid (TNBS)
- จ. ความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโคร
- ฉ. ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*In Vitro* Biodegradation) ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase) ความเข้มข้น 163 U/ml, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3.3 การศึกษาการทดสอบการยึดเกาะ(attachment) และการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow-derived stem cells, MSC) และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Breast cancer cell) บนอนุภาคไมโครในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3.4 ทดสอบความไวต่อยารักษา มะเร็ง (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ยาทาม็อกซิเฟน (tamoxifen) เป็นต้นแบบในการรักษา เพื่อศึกษาหาขนาดของยาที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในระบบสามมิติ

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

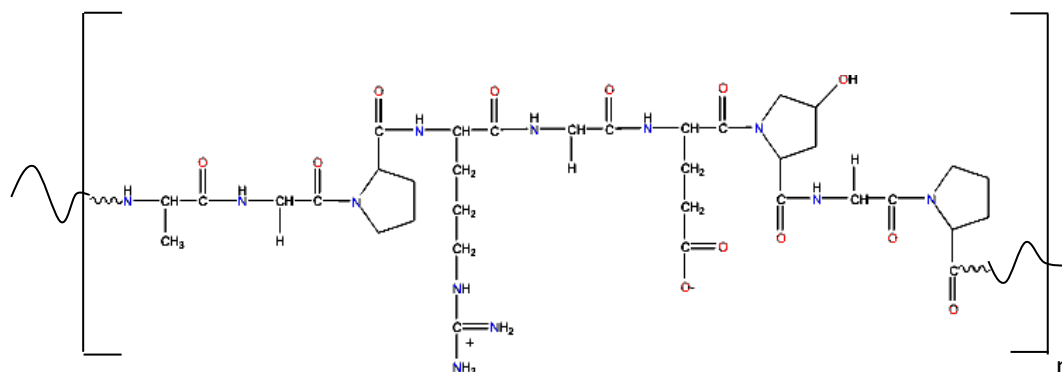
#### 2.1 ชีววัสดุ (Biomaterial)

##### 2.1.1 เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินได้จากการสลายตัวของคอลลาเจนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในหนังหมู หนังวัว กระดูก เอ็น และเขาสัตว์ โดยการใช้กรด ต่าง และสกัดด้วยความร้อนทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนถูกทำลายและเปลี่ยนเป็นเจลาติน เจลาตินจึงเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งคุณสมบัติของเจลาตินจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจนและความแตกต่างของวิธีการสกัด โดยทั่วไปเจลาตินมักทำมาจากหนังและกระดูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [Sarabia A.I. และคณะ 2000] เจลาตินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทางมักใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เมื่อเจลาตินอยู่ในรูปสารละลายหรือของเหลวสามารถเปลี่ยนรูปเป็นเจลด้วยการผันกลับด้วยความร้อน (Thermo-reversible gel) ระหว่างการลดอุณหภูมิถึงระดับหนึ่ง เจลจะมีลักษณะยืดหยุ่น และเจลสามารถละลายใหม่ได้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น ดังนั้นความแข็งของเจลในเจลาตินมีผลมาจากต่ออุณหภูมิ ความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุล [King และ Hsu 1992]

##### 2.1.1.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนสารโซ่เดี่ยวที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ เจลาตินเกิดจากการสลายตัวของคอลลาเจนในองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดหรือด่างทำให้สายโซ่ของคอลลาเจนสั้นลงและทำให้คุณสมบัติในการละลายเพิ่มขึ้น โครงสร้างเจลาตินปฐมภูมิของ เจลาตินจึงเหมือนกับคอลลาเจน โมเลกุลของเจลาตินประกอบด้วยลำดับของ Glycine-X-Y triple ที่ซ้ำกัน ซึ่ง X และ Y คือ กรดอะมิโนโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน (รูปที่ 2.1) ซึ่งจากการจัดเรียงตัวเหล่านี้ทำให้เกิดโครงสร้างเกลียว 3 สายพันกันเป็นเกลียวสาม (Triple helix structure) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งโครงสร้างเกลียว 3 สายสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 แบบ คือ โครงสร้างเกลียวคอลลาเจนชนิด I (Type I collagen) ที่ได้จากหนังและกระดูก ประกอบด้วยสายโซ่  $\alpha 1$  (I) 2 สาย และ  $\alpha 2$  (I) อีก 1 สาย ส่วนโครงสร้างเกลียวคอลลาเจนชนิด III ได้จากเฉพาะส่วนหนัง ประกอบด้วยสาย  $\alpha 1$  (III) 3 สาย



**รูปที่ 2.1** โครงสร้างของหน่วยซ้ำเจลาติน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน ได้แก่ อะลานีน, โกลซีน, โพรลีน, อาจีนีน, กลูตามิก และไฮดรอกซีโพรลีน [Lee, SB., และคณะ 2003]

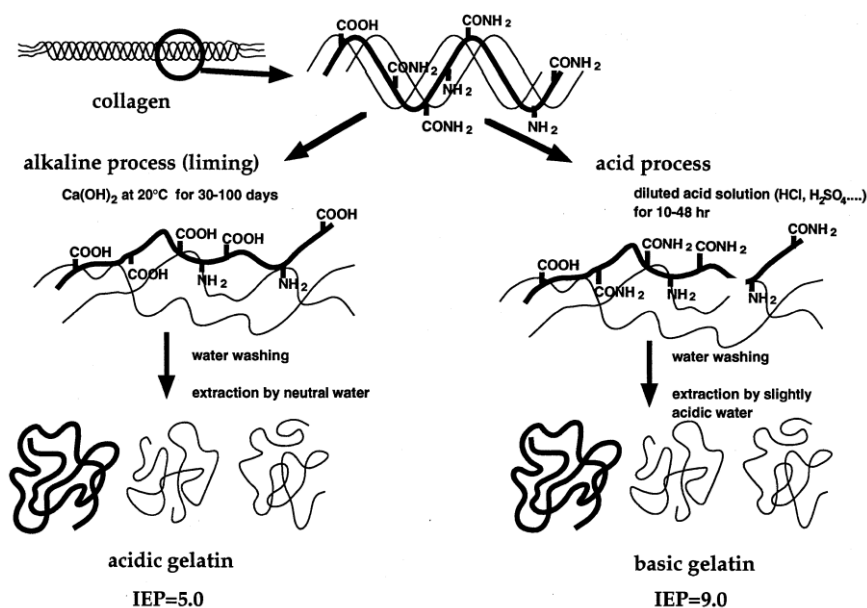
เจลาตินมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 15,000 – 250,000 ดาลตัน ซึ่งองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน ปริมาณของกรดอะมิโนที่พบในเจลาตินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแสดงดังตารางที่ 2.1 ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่นำมาสกัดและวิธีในการสกัดเป็นสำคัญ [Ward, 1997] นอกจากนี้องค์ประกอบของเจลาตินยังประกอบด้วยโปรตีน 84 – 90% น้ำและความชื้น 8 – 12% และแร่ธาตุ 2 - 4% [Kalman D.S. และคณะ 2004]

กระบวนการผลิตเจลาตินมีขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอน คือเตรียมวัสดุ การสกัด และทำเจลาตินให้แห้งซึ่งกระบวนการผลิตมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของเจลาตินที่ผลิตได้ทั้งคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เช่น ความหนืดของของเหลวเจลาติน และความแข็งแรงของเจลที่ได้ [Ockerman, 1988]

การเตรียมวัตถุดิบทำให้สามารถแบ่งเจลาตินออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. Type A Gelatin หรือ Basic gelatin เตรียมได้จากหนังหมูและผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรด กรดที่ใช้ส่วนมาก ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดซัลฟิวริก ซึ่งคอลลาเจนในหนังหมูหรือปลา เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนถึงจุดเดือดที่ทำให้คอลลาเจนละลายและจะเสียสภาพ การสกัดเจลาตินด้วยวิธีนี้จะสกัดยากกว่าการสกัดด้วยวิธีไฮโดรไลซิสด้วยเบส เจลาตินชนิดนี้มีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 9.0 (รูปที่ 2.2)

2. Type B Gelatin หรือ Acidic gelatin เจลาตินชนิดนี้เตรียมได้จากกระดูกหรือหนังของวัวและผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้เบส โดยทำการไฮโดรไลซิสหมู่เอไมด์ของคอลลาเจนทำให้เจลาตินมีหมู่คาร์บอกซิลปริมาณมาก ส่งผลให้เจลาตินชนิดนี้มีประจุเป็นลบ มีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0



รูปที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin

[ที่มา: Tabata, Y. Protein release from gelatin matrices 1998; 31: 287-301.]

ขั้นตอนการสกัดเป็นการเปลี่ยนคอลลาเจนซึ่งไม่ละลายน้ำ (Insoluble collagen) ให้อยู่ในรูปของการละลายที่สามารถละลายน้ำได้เรียกว่า สารละลาย (Soluble) คอลลาเจนมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดโพรลีนในปริมาณมากและไม่ละลายน้ำโดยเฉพาะน้ำเย็น ดังนั้นการเปลี่ยนรูปให้เป็นเจลาตินจึงต้องใช้ความร้อน ขั้นตอนการเตรียมเจลาตินโดยการใช้กรดหรือด่างจึงเป็นการไปทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างสายโซ่โมเลกุลทั้งหมดหรือบางส่วนของพันธะระหว่างโมเลกุลช่วยให้คอลลาเจนเปลี่ยนรูปได้ง่าย ซึ่งการเปลี่ยนรูปของคอลลาเจนเป็นเจลาตินเกิดได้ 2 ขั้นตอน คือ

ก. การใช้ความร้อนในระดับต่ำกว่าอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำให้โมเลกุลของ คอลลาเจนเกิดการหดตัวลง  $1/3$  ของความยาวของโมเลกุลเริ่มต้น ซึ่งเกิดจากการถูกทำลายพันธะ ไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิกส่งผลให้คอลลาเจนที่มีโครงสร้างเป็นเกลียว 3 สายของโปรตีนแยก ออกจากกัน เกิดการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบมีลักษณะเป็น random coil หรือละลายน้ำได้

ข. การใช้ความร้อนมากกว่าอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยความร้อนจะทำลาย พันธะโควาเลนต์ที่ทำหน้าที่เชื่อมกรดอะมิโนของสายโซ่โปรตีน ทำให้คอลลาเจนดูดซับน้ำและเกิดการ พองตัวนี้มีลักษณะเป็นเจลลิติน [Ward, 1997]

การทำแห้งเจลาตินหลังกระบวนการสกัดให้อยู่ในรูปลักษณะสารละลาย ต้องนำ สารละลายนั้นมารองและระเหยน้ำออกก่อนทำการกรองบางครั้งอาจเติมสารฟอกสีลงไป ใน สารละลายด้วยทำให้เจลาตินมีลักษณะใสหรือเติม activated carbon สารเหล่านี้จะถูกกำจัดออก โดยการกรอง ซึ่งสามารถกำจัดพวกไขมันหรือเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำได้ [Ockerman, 1988] ส่วนการ ระเหยน้ำออกต้องทำที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากสารละลายเจลาตินมีความไวต่ออุณหภูมิ หากใช้อุณหภูมิ สูงเกินไปจะไปทำลายพันธะเปปไทด์ [Ward, 1997] และเมื่อหลังจากการระเหยน้ำออกแล้วจะได้ เจลาตินที่มีความเข้มข้นขึ้น หลังจากนั้นจึงนำไปทำแห้งโดยวิธีที่ดีที่สุดคือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) เพื่อเจลาตินจะไม่ถูกทำลายโครงสร้างทำให้ได้เจลาตินคุณภาพดี [Mann, 1962]

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ 18 ชนิด โดยมีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีน (Glycine), โพรลีน (Proline) และ ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) เป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินชนิดเอและบี [Neuman, R. E. 1949]

Amino Acid	Type A Gelatin (g/100 g protein)	Type B Gelatin (g/100 g protein)
Alanine	11.0	8.7
Arginine	8.8	6.4
Aspartic Acid	6.7	6.9
Cystine	Trace	0.1
Glutamic Acid	11.4	12.1
Glycine	27.5	26.9
Histidine	0.8	0.6
Hydroxylysine	1.0	0
Hydroxyproline	14.1	14.4
Isoleucine	1.7	1.9
Leucine	3.3	3.1
Lysine	4.5	5.2
Methionine	0.9	0.9
Phenylalanine	2.2	1.9
Proline	16.4	14.0
Serine	4.2	2.9
Threonine	2.2	2.2
Tyrosine	0.3	0.1
Valine	2.6	2.6

### 2.1.1.2 สมบัติทั่วไปของเจลาติน

เจลาตินมีลักษณะเป็นของแข็ง โปร่งแสง เปราะ และไม่มียกมัน มีความหนาแน่น 1.3 – 1.4 กิโลกรัมต่อลิตร เจลาตินสามารถดูดซับน้ำและเกิดการพองตัวได้ประมาณ 5-10 เท่า [Poppe, 1997] เมื่อนำมาละลายน้ำที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส จะละลายกลายเป็นของเหลวหนืด นอกจากนี้เจลาตินยังสามารถละลายในสารละลายพอลิไฮดริกแอลกอฮอล์ เช่น โพรพิลีนไกลคอลหรือกลีเซอรอล และสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง เช่น กรดอะซิติก พอร์มาร์ไมด์ แต่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วน้อยเช่น อะซิโตน ไดมethylฟอร์มาดีไฮด์ [Finch C.A. และ Jobling A. 1977] โดยสมบัติของเจลาตินแสดงดังตารางที่ 2.2 โดยเจลาตินยังมีคุณสมบัติเป็นแอมโฟเทอริก คือละลายน้ำได้ทั้งกรดและด่างขึ้นอยู่กับพีเอชของน้ำที่ใช้ในการละลาย เจลาตินที่ผ่านกระบวนการกำจัดพวกแร่ธาตุออก คุณสมบัติในด้านความแข็งแรงของเจลเป็นอีกคุณสมบัติที่สำคัญ ซึ่งการวัดความแข็งแรงของเจลหรือ ความแน่นทำได้โดยการวัดการต้านทานแรงกด คุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือความหนืด ค่าความหนืดโดยทั่วไปจะอยู่ประมาณ 15-75 เซนติพอยต์ ค่าความหนืดจะขึ้นอยู่กับมวลโมลกุล [Arnesen J.A. และ Gildberg A. 2006] ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะทำให้ค่าความหนืดเปลี่ยนด้วย พบว่าความหนืดมีความสัมพันธ์กับค่าความแข็งแรงของเจล ถ้าค่าความหนืดสูงค่าความแข็งแรงของเจลจะสูงด้วย [Ward, 1997]

ตารางที่ 2.2 สมบัติของเจลาตินชนิดเอและบี

ลักษณะสมบัติ	เจลาตินชนิดเอ	เจลาตินชนิดบี	อ้างอิง
Isoelectric point (pI)	7.0-9.0	4.7-5.4	Schrieber, R. 2007
ความหนืด (เซนติพอยต์)	15 -75	20 – 75	Arnesen J.A. 2006
ปริมาณอะมิโนอิสระ (มิลลิกรัม/กรัมโปรตีน)	$1.13 \times 10^{-3}$	$0.92 \times 10^{-3}$	Ratanavaraporn J. และคณะ 2006
ความแข็งแรงของเจล (บลูม)	50-300	50-300	Schrieber, R. 2007
ปริมาณเถ้า (%)	0.3-2.0	0.5-2.0	Schrieber, R. 2007

หมายเหตุ : Gel strength คือค่าความแข็งของเจล มีหน่วยเป็นบลูม โดยวัดด้วยเครื่องบลูมเจลโลมิเตอร์ (Bloom Gellometer)

### สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน

เมื่อนำเจลาตินมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ลักษณะต่างๆ เช่น แผ่นฟิล์ม อนุภาคไมโคร ไฮโดรเจล ทำให้ลักษณะสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และชีวภาพของเจลาตินเปลี่ยนไป โดยคุณลักษณะสมบัติต่างๆ ที่เปลี่ยนไปแสดงได้ดังนี้

#### ก. สมบัติความชอบน้ำ

Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้รายงานผลค่ามัมสัมผัสน้ำของแผ่นฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าค่ามัมสัมผัสน้ำของเจลาตินเท่ากับ  $59.1 \pm 2.1$  องศา ซึ่งแสดงถึงสมบัติความชอบน้ำ (Hydrophilic) ดังแสดงในตาราง 2.3 และ Whu S.D. และคณะ 2013 ได้รายงานค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินชนิดบีที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC และกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC มีค่ามัมสัมผัสน้ำน้อยกว่ากลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งเท่ากับ  $49.4 \pm 7.9$  และ  $65.1 \pm 3.9$  องศา ตามลำดับจึงกล่าวได้ว่าฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC มีความชอบน้ำมากกว่าฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์

ตารางที่ 2.3 ค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์มชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	ค่ามัมสัมผัสน้ำ (องศา)	อ้างอิง
ฟิล์มเจลาติน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก)	$59.1 \pm 2.1$	Ratanavaraporn J. และคณะ 2013
ฟิล์มไฟโบรอินไหมไทย (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก)	$68.3 \pm 0.5$	Kaewprasit K. และคณะ 2014
ฟิล์มไคโตซาน (ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก)	$88.1 \pm 1.5$	Xu H. และคณะ 2007



#### ข. สมบัติเชิงกล

Lou X. และคณะ (1999) ได้รายงานผลของของการเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมขวางเจลาตินไฮโดรเจลขึ้นจากร้อยละ 5 - 40 โดยน้ำหนัก ส่งผลให้ค่ามอดูลัสของการกดมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 5 เป็น 15 เมกะปาสคาล แสดงถึงความแข็งแรงของไฮโดรเจลที่เพิ่มขึ้น Bigi A. และคณะ (2001) รายงานผลสมบัติเชิงกลของฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก พบว่ามีค่ามอดูลัสยังและค่าความเค้นเท่ากับ 25 และ 3.4 เมกะปาสคาล ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าฟิล์มเจลาตินที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวาง Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาสมบัติเชิงกลของค่ามอดูลัสการกดของแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS พบว่าแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางมีค่ามอดูลัสการกดมากกว่าแผ่นเส้นใยที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวางถึง 3 เท่า ซึ่งแผ่นเส้นใยที่ผ่านการเชื่อมขวางและไม่ผ่านการเชื่อมขวางมีค่ามอดูลัสเท่ากับ 340 และ 140 เมกะปาสคาล ตามลำดับ

#### ค. สมบัติทางความร้อน

Bigi A. และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลของสมบัติทางความร้อนของฟิล์มเจลาตินพบว่าอุณหภูมิการเสียสภาพของฟิล์มเจลาตินหลังการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีอุณหภูมิการเสียสภาพเพิ่มขึ้นเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส โดยต่างจากฟิล์มเจลาตินก่อนทำการเชื่อมขวางซึ่งมีอุณหภูมิการเสียสภาพเท่ากับ 43 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์สมบัติด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) และ Chen P.R และคณะ (2005) ได้ศึกษาสมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง DSC ของเจลาตินเมมเบรนที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น แต่อุณหภูมิการเสียสภาพของวัสดุลดลงเนื่องจากความวัสดุเกิดการเชื่อมขวางไม่สมบูรณ์ โดยการเชื่อมขวางเจลาตินเมมเบรนด้วยความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร มีอุณหภูมิการเสียสภาพเท่ากับ 66.2 องศาเซลเซียส

#### ง. สมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพ

Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้รายงานผลการศึกษาสมบัติการย่อยสลายทางกายภาพชีวภาพของอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาตินด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มีขนาดอนุภาคระหว่าง 194-217 ไมโครเมตร พบว่าอนุภาคไมโครเจลาติน มีอัตราการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 163 หน่วยต่อ

มิลลิกรัมที่มีค่าพีเอช 7.4 ที่เร็ว โดยย่อยสลายหมดภายในระยะเวลา 14 วัน และจากรายงานของ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) พบว่าแผ่นที่เส้นใยเจลาตินชนิดเอที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย สารละลาย EDC/NHS มีอัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อ มิลลิกรัม ที่ค่อนข้างเร็ว โดยเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีแรกหลังการแช่ด้วยเอนไซม์มีน้ำหนักคงเหลือ จากการย่อยสลายเพียงร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และหลังการย่อยสลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แผ่นเส้นใย เจลาตินเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์

#### จ. สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ

Sisson K. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง กระดูก (MG-63 cells) บนแผ่นเส้นใยเจลาตินชนิดเอที่ผ่านการเชื่อมขวาง 3 วิธีคือเชื่อมขวางด้วยกลู ตาร์ลดีไฮด์ กลีเซอรอลดีไฮด์ และเจนีพิน และวัดกิจกรรมเมทาบอลิกของเซลล์ด้วยชุดทดสอบ WST-1 Cell Proliferation Assay Kit หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ได้จากค่า วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่าแผ่นเส้นใยเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย กลีเซอรอลดีไฮด์มีการเจริญเติบโตของเซลล์สูงที่สุด รองลงมาคือแผ่นเส้นใยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลู ตาร์ลดีไฮด์และเจนีพินตามลำดับ และจากรายงานของ Tajima S. และคณะ (2012) พบว่าอนุภาคไม โครที่เตรียมจากเจลาตินขนาดอนุภาค 20-50 ไมโครเมตร และผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่ เวลา 192 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกหนู (MC3TC-E1 cell) สูงกว่าที่เวลาการ เชื่อมขวางอื่นๆและการเพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติ โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโต ( $\mu$ ) เท่ากับ  $= 4.67 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง และค่า PDT เท่ากับ 148.39 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอล คาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่ามีค่า ALP สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ monolayer อย่างมีนัยสำคัญ

#### 2.1.1.3 การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน

เจลาตินเป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในระดับอุตสาหกรรม เจลาตินจึงถูก นำมาประยุกต์ใช้งานในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร ทำเป็นขนมหวานที่มี ส่วนประกอบของเจลาติน เช่น ทอफी ช็อคโกแลต เยลลี่ หรือเป็นพวกอาหารแช่แข็งที่มีนมเป็นส่วน ประกอบ อุตสาหกรรมยา เจลาตินเป็นวัสดุสำคัญชนิดหนึ่งที่ใช้ในการผลิตโดยมีพอลิแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลาย เช่น แคปซูล ผลิตแผ่นหรือก้อนซึบเจลาตินนิยมใช้มากในงานด้านทันตกรรมและ การผ่าตัด เนื่องจากสามารถนำไปใช้ในการซึบเลือดหรือของเหลวที่ออกมาจากร่างกายได้ดี

อุตสาหกรรมภาพถ่าย เช่น นำเจลาตินมาเคลือบบนฟิล์มถ่ายภาพ ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ และกระดาษที่ใช้ในการปริ้นรูป แล้วทำให้ฟิล์มเหล่านั้นสามารถซับและคายน้ำยาที่ใช้ในการล้างฟิล์มได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้งานในทางการแพทย์และทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น นำมาทำกาวเจลาตินสำหรับติดเนื้อเยื่อ ซึ่งกาวเจลาตินนี้ใช้ในการปิดแผลเพื่อป้องกันการรั่วซึมของของไหลออกจากบาดแผล นำมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติต่างๆในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [Kalman D.S. 2004]

### 2.1.2 โปรตีนไหม (Silk protein)

โปรตีนไหมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Bombycidae* ไหมจัดเป็นแมลงที่มีกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาารูปร่างสมบูรณ์ (Holometabolous) ครบทั้ง 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และผีเสื้อ โดยไหมประกอบขึ้นจากเส้นใยโปรตีนที่หนอนไหม (Silk worm silk) สังเคราะห์ขึ้นในต่อมไหม ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือไฟโบรอินและเซรีซิน การสังเคราะห์ไฟโบรอินเกิดขึ้นที่บริเวณต่อมไหมส่วนปลายอยู่ในรูปของเหลวซึ่งอยู่ภายในท่อของต่อมไหม (Silk gland) แล้วจะถูกขับออกมาเก็บยังต่อมไหมส่วนกลาง ส่วนของไฟโบรอินจะถูกเคลือบรอบด้วยเซรีซิน ก่อนจะถูกขับออกมายังต่อมไหมส่วนต้นและผ่านออกมาทางท่อคายเส้นไหม (Spinneret) เมื่อตัวหนอนไหมพ่นโปรตีนออกมาโปรตีนไหมจะแข็งตัวกลายเป็นเส้นใยเพื่อสำหรับสร้างรังห่อหุ้มก่อนการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ [Takano, K. 1978]

#### 2.2.2.1 โครงสร้างของโปรตีนไหม

ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนที่เกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวของหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนและกรดอะมิโนอีกหนึ่งตัว เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ (Peptide) โดยไหมประกอบด้วยโปรตีนหลักคือ ไฟโบรอิน (Fibroin) เซรีซิน (Sericin) และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน (Fat) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เกลืออนินทรีย์ (Inorganic salt) และรงควัตถุ (Pigment) ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของไหมสกุล *Bombyx mori* สายพันธุ์ญี่ปุ่น

องค์ประกอบ	ปริมาณเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก
1. ไฟโบรอิน (Fibroin)	70 - 80
2. เซรีซิน (Sericin)	20 - 30
3. แวกซ์ (Wax matter)	0.4 - 0.8
4. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates)	1.2 - 1.6
5. อนินทรีย์วัตถุ (Inorganic matter)	0.7
6. สีรงควัตถุ (Pigment)	0.2

#### เซรีซิน (Sericin) [Gulrajani และคณะ 1988]

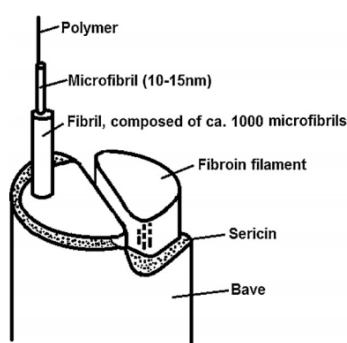
เซรีซิน ( $C_{15}H_{23}N_5O_8$ ) เป็นโปรตีนไหมที่พ่นออกมาเคลือบอยู่รอบๆเส้นใยไฟโบรอิน ทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่นและมีสภาพเป็นกาวยึดเส้นไหมกับวัสดุต่างๆประกอบกันเป็นรูปร่างไหม เซรีซินประกอบด้วยหมู่อะมิโนที่สำคัญได้แก่ ซีรีน (Serine, Ser) กรดแอสพาทิก (Aspartic Acid, Asp) กรดกลูตามิก (Glutamic Acid, Glu) ทรีโอนีน (Threonine, Thr) โครงสร้างเซรีซินแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ เซรีซิน 1 (ละลายได้ง่าย ประมาณ 40 %) เซรีซิน 2 (ละลายได้ง่ายกว่า ประมาณ 40%) และเซรีซิน 3 (ละลายยาก ประมาณ 20 %) โดยทั้งสามส่วนมีความแตกต่างกันในการละลายด้วยอุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้น นอกจากนี้เซรีซินยังถูกไฮโดรไลต์หรือทำลายพันธะเพปไทด์ด้วยกรด ต่างและเอนไซม์ให้กลายเป็นโมเลกุลเล็กๆที่สามารถละลายน้ำได้อีกด้วย [Komatsu K. 1975]

#### ไฟโบรอินไหม (Silk Fibroin)

ไฟโบรอินไหมเป็นเส้นใยโปรตีนชนิดหนึ่งที่เคลือบด้วยกาวไหมหรือเซรีซิน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 – 25 ไมโครเมตร [Matsumoto, A. 2006] โดยไฟโบรอินประกอบไปด้วย 3 หน่วยย่อย คือ สายโซ่โปรตีนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy chain) สายโซ่โปรตีนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light chain) และไกลโคโปรตีนชนิด P25 (Glycoprotein) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 391.367 กิโลดาลตัน [Zhou, C.Z. 2000] (รูปที่ 2.4) โดยสายโซ่โปรตีนขนาดใหญ่ที่มี

น้ำหนักรวมโมเลกุลสูง มีน้ำหนักรวมโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนสายยาวที่มีการจัดเรียงตัวของ Gly-X-Y ซ้ำกัน 12 หน่วย ซึ่ง X คือ อะลานีน (Ala) เซอรีน (Ser) ไทโรซีน (Tyr) วารีน (Val) ทรีโอนีน (Thr) ซึ่งมีปริมาณคิดเป็นร้อยละโดยโมล 64, 22, 10, 3 และ 1.3 ตามลำดับ แสดงโครงสร้างได้ดังนี้ Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Gly-[Ser-Gly-(Ala-Gly)<sub>n</sub>]-Tyr เชื่อมด้วยพันธะไฮโดรเจนสั้นๆระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (COOH) กับหมู่อะมิโนเกิดเป็นโครงรูปการเรียงตัวแบบพลิทเบต้าแบบไม่ขนาน ( $\beta$  - pleated sheet) หรือโครงสร้างแบบจีบ (รูปที่ 2.5) นอกจากนี้ผลได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโดยใช้เทคนิคเอ็กซ์เรย์ดิฟแฟกชัน (X-ray diffraction) พบว่า สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลสูงแสดงการจัดเรียงตัวที่เป็นผลึก (Crystalline) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำสูง [Zhou C.Z. และคณะ 2000] สำหรับสายโซ่โปรตีนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ มีน้ำหนักรวมโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน โครงสร้างของสายโซ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แสดงประจุ ซึ่งสายโซ่โปรตีนในส่วนนี้เชื่อมต่อกับสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลสูงด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) และส่วนสำคัญที่ทำให้สายโซ่เชื่อมต่อกันโดยสมบูรณ์คือ ไกลโครโปรตีนชนิด P25 มีน้ำหนักรวมโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เชื่อมสายโซ่ที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลสูงและโมเลกุลต่ำที่เข้าด้วยกัน โดยจับด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างสายโซ่ที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลสูง น้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ และไกลโครโปรตีนชนิด P25 มีค่าประมาณ 6 : 6 : 1 โดยโมล [Tanaka K. 1999, Inoue S. และคณะ 2000]

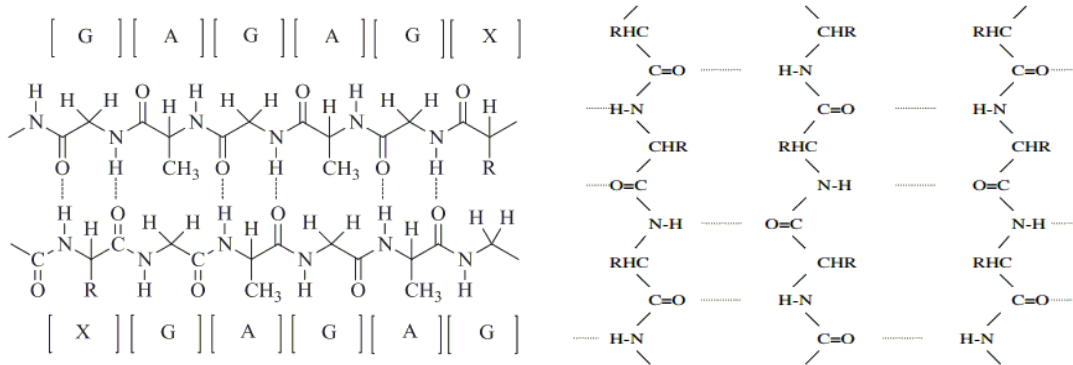
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



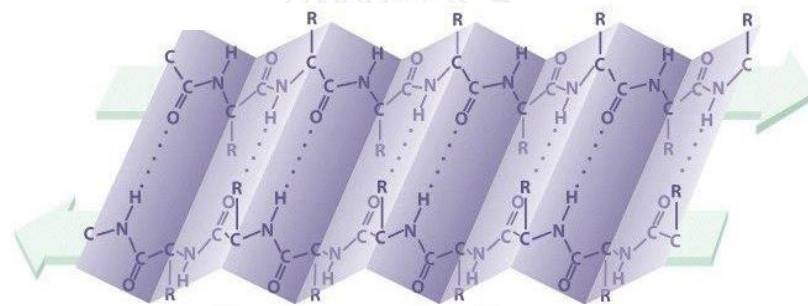
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเส้นใยไหม [Shang S. และคณะ 2013]

โครงสร้างทุติภูมิของไฟโบรอินประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ ส่วนที่มีการจัดเรียงตัวเป็นผลึก (Crystalline) และส่วนที่มีการจัดเรียงตัวแบบอสัณฐาน (Amorphous) นอกจากนี้ส่วนที่มีโครงสร้างการจัดเรียงตัวเป็นผลึกยังสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 แบบ ได้แก่ โครงสร้างไหม I โครงสร้างไหม II และโครงสร้างไหม III โดยโครงสร้างไหม I มีโครงสร้างก่อนเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลึกเส้นใย (Pre-spun pseudocrystalline) หรือที่เรียกว่าโครงสร้างแบบนี้ว่า Random coil หรือโครงสร้างแบบเกลียว  $\alpha$ -helix (รูปที่ 2.6) สามารถละลายน้ำได้ (Water soluble) เป็นโครงสร้างที่ไม่เสถียรสามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นโครงสร้างไหม II ได้ เมื่อได้รับความร้อน (Heating) การปั่นกววน (Spinning) หรือการให้แรงทางไฟฟ้า (Electric field) การเติมด้วยสารละลายที่มีซิว์ เช่น เมทานอลหรืออะซิโตน โครงสร้างไหม II มีรูปแบบโครงสร้างเป็นเส้นใยไหมสั้นและถือเป็นโครงสร้างหลักของไฟโบรอิน ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างการจัดเรียงตัวแบบพลิทเบต้า ( $\beta$  - pleated sheet) (รูปที่ 2.5) สายโซ่โปรตีนเชื่อมกันแบบไม่ขนาน (Anti-parallel) ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลกับหมู่อะมิโน โดยระหว่างแผ่นพลิทเบต้าแต่ละแผ่นซ้อนทับกันด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ส่งผลให้ไฟโบรอินมีคุณสมบัติเชิงกลที่มีความแข็งแรงสูง [Taylor, S.W. และคณะ 1997, Matsumoto, A. 2006] ทำให้ไฟโบรอินไม่สามารถละลายน้ำได้โดยตรง

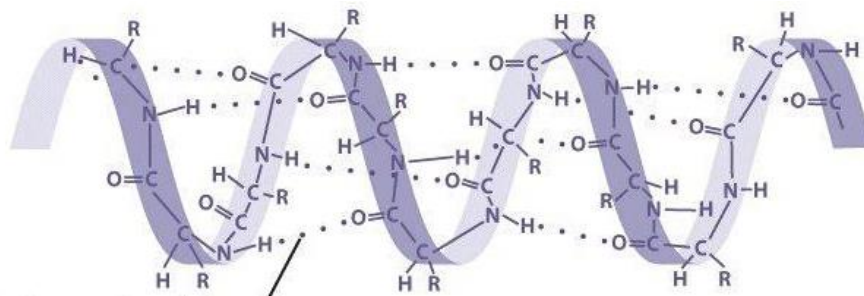
ไฟโบรอินสามารถละลายได้ในตัวทำละลายกรด เช่น กรดฟอสฟอริก (Phosphoric) กรดซัลฟูริก (Sulfuric) และกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric) เป็นต้น และละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ตัวทำละลายเกลืออินทรีย์ (Aqueous-organic solution of salts) ได้แก่ ลิเทียมไธโอไซยาเนต (LiCNS) ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) และแคลเซียมไนเตรต ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) เป็นต้น ซึ่งไอออนของตัวละลายจะทำอันตรกิริยากับไอออนที่แสดงประจุในสารละลาย และกลุ่มของไอออนของสายโซ่ไฟโบรอินจะถูกทำลายด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโซ่โมเลกุลให้สั้นลง [Taylor, S.W. และคณะ 1997] ไฟโบรอินจึงสามารถละลายน้ำได้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างพอลิเปปไทด์ของเส้นใยไฟโบรอิน  
[Sashina E.S. และคณะ 2006, Mondal M. และคณะ 2007]



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทุติยภูมิแบบพลิทเบต้าของไฟโบรอิน [Wenk E. และคณะ 2011]



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทุติยภูมิแบบ  $\alpha$ -helix ของไฟโบรอิน [Wenk E. และคณะ 2011]

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซินของไหมสกุล *Bombyx mori* สายพันธุ์ญี่ปุ่น [Vapari, C and Kaplan D. L. 2007]

กรดอะมิโน	ไฟโบรอิน	เซรีซิน
Glycine, Gly	43.7	13.9
Alanine, Ala	28.8	5.9
Serine, Ser	11.9	33.4
Tyrosine, Tyr	5.1	2.6
Valine, Val	2.2	2.7
Threonine, Thr	0.9	9.7
Isoleucine, Ile	0.7	0.7
Phenylalanine, Phe	0.6	0.5
Lysine, Lys	0.3	3.3
Aspartic Acid, Asp	1.3	16.7
Leucine, Leu	0.5	1.1
Arginine, Arg	0.5	3.1
Glutamic Acid, Glu	1.0	4.4
Proline, Pro	0.5	0.6
Methionine, Met	0.1	0.04
Histidine, His	0.2	1.3
Cysteine, Cys	0.2	0.1
Tryptophan, Trp	0.3	0.2



### ไฟโบรอินไหมไทย (Thai silk fibroin)

สายพันธุ์ไหมในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ ไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านเป็นไหมสายพันธุ์ดั้งเดิม และต่อมามีการปรับปรุงสายพันธุ์มาให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น เช่น ไหมพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 เป็นไหมสายพันธุ์ไทยแท้ ลักษณะรังไหมเป็นสี่เหลี่ยม ความยาวของเส้นใยประมาณ 370 – 410 เมตร ไหมสายพันธุ์นี้มีความแข็งแรงและมีปริมาณผลึกของเส้นใยสูง ให้ผลผลิตที่สูงเหมาะสมกับสภาพอากาศของประเทศไทย ไหมพันธุ์ต่อมาเป็นไหมพันธุ์ไทยปรับปรุง ได้จากการพัฒนาพันธุ์ไหมในประเทศไทย เช่น ไหมพันธุ์หนองคาย 4 เป็นไหมลูกผสมโดยพ่อพันธุ์เป็นพันธุ์ญี่ปุ่นและแม่เป็นพันธุ์ไทย ไหมพันธุ์ที่สามคือไหมพันธุ์ต่างประเทศ ได้จากการนำเข้ามาจากต่างประเทศ เช่น ไหมพันธุ์จีน ไหมพันธุ์ญี่ปุ่น ซึ่งไหมพันธุ์จากต่างประเทศมีรังไหมขนาดใหญ่ให้ผลผลิตสูง แต่ไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมเท่าไหมพันธุ์ไทย [สถาบันวิจัยหม่อนไหม, 2546]

นอกจากนี้เส้นใยไหมเป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่มีความแข็งแรง มีความเหนียวและยืดหยุ่นสูง สามารถทนอุณหภูมิได้สูง มีความเสถียรต่อตัวทำละลาย ไม่นำไฟฟ้า เป็นวัสดุที่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพ และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ [Altman, G.H. และคณะ 2003] นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการทนแรงดึงได้ดีเมื่อเทียบกับวัสดุอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.6

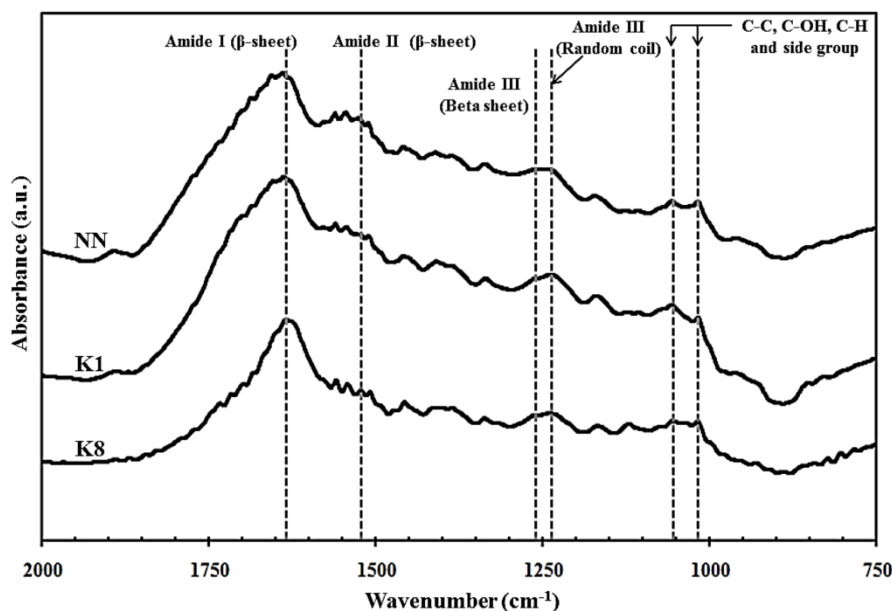
ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของเส้นใยไหมและวัสดุชนิดอื่นๆ [Altman G.H. 2003]

Material	UTS (MPa)	Modulus(GPa)	%Strain at break
B. mori silk (with sericin)	500	5-12	19
B. mori silk (without sericin)	610-690	15-17	4-16
B. mori silk	740	10	20
Spider silk	875-972	11-13	17-18
Collagen	0.9-7.4	0.0018-0.046	24-68
Bone	160	20	3
Kevlar (49 fiber)	3600	130	2.7
Synthetic Rubber	50	0.001	850

### สมบัติหลังการเปลี่ยนรูปของไฟโบรอินใหม่ (Regenerated silk fibroin)

#### ก. โครงสร้างทางเคมี (Chemical structure)

Wadbu P. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาผลของโครงสร้างทางเคมีการเปลี่ยนโครงสร้างจาก random coil เป็นโครงสร้างแบบพลิทเบต้าของแผ่นเส้นใยไฟโบรอินใหม่ไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 ผสมระหว่างเส้นใยที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำ (H-L chain mixed fibroin) หลังจากแช่ด้วย 50% เมทานอลที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าที่ตำแหน่งพีกเอไมด์ที่เลขคลื่น  $1658\text{ cm}^{-1}$  (amide I) และ  $1540\text{ cm}^{-1}$  (amide II) แสดงโครงสร้างทางเคมีแบบ random coil ซึ่งเป็นแผ่นเส้นใยที่ไม่ได้ผ่านการแช่ด้วยเมทานอล แต่เมื่อทำการแช่ด้วยเมทานอลตำแหน่งพีกเอไมด์เปลี่ยนไปที่เลขคลื่น  $1638\text{ cm}^{-1}$  (amide I) และ  $1529\text{ cm}^{-1}$  (amide II) ซึ่งมีโครงสร้างแบบพลิทเบต้า Yeo Y.H. และคณะ (2003) ได้ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงสร้างใหม่ I หรือ random coil ของไฟโบรอินที่มีโครงสร้างแบบอสัณฐานสารละลายโปรตีนที่ได้จากกระบวนการแยกสารด้วยวิธีเจลเพอเตรชันโครมาโตกราฟี และใหม่ II จากการเตรียมอนุภาคไมโครจากไฟโบรอินใหม่สายพันธุ์จีนด้วยวิธีการพ่นฝอย ซึ่งโครงสร้างใหม่ พบพีกที่ตำแหน่งเลขคลื่น  $1653\text{ cm}^{-1}$  (amide I) และ  $1531\text{ cm}^{-1}$  (amide II) โครงสร้างทางเคมีของอนุภาคไมโครพบตำแหน่งเลขคลื่นของพีกลดลงเท่ากับ  $1621\text{ cm}^{-1}$  (amide I) และ  $1526\text{ cm}^{-1}$  (amide II) ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้างที่เปลี่ยนไปจาก random coil หรือใหม่ I เป็นโครงสร้างแบบพลิทเบต้า และจากรายงานของ Kaewprasit K. และคณะ (2014) พบว่าแผ่นฟิล์มไฟโบรอินที่เตรียมจากรังไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 ถูกแช่ในสารละลายเมทานอลให้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นแบบพลิทเบต้า จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR พบตำแหน่งพีกเอไมด์ I ที่เลขคลื่น  $1630\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching) และเอไมด์ II  $1530\text{ cm}^{-1}$  (N-H bending, C-N stretching) และเอไมด์ III ที่เลขคลื่น  $1235$  และ  $1265\text{ cm}^{-1}$  (N-H deformation, C-N stretching) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 สเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN), ฟิล์มไฟโบรอินใหม่พันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินใหม่พันธุ์นครราชสีมา (K8) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) [Kaewprasit K. และคณะ 2014]

#### ข. สมบัติความชอบน้ำ

Wadbu P. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาผลของความชอบน้ำ (Hydrophilicity) ของแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) พบว่าแผ่นเส้นใยไฟโบรอินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง น้ำหนักโมเลกุลต่ำ และไฟโบรอินผสมที่ผ่านการแช่ด้วยเมทานอลมีร้อยละการดูดซับน้ำที่ต่ำกว่าก่อนแช่ด้วยเมทานอล เนื่องจากการเปลี่ยนโครงสร้างเป็นแบบพลิตที่มีความชอบเป็นผลึกสูงวิเคราะห์ได้จากค่ามุมสัมผัสของน้ำ (Water contact angle) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kaewprasit K. และคณะ (2014) พบว่าแผ่นฟิล์มไฟโบรอินที่ผลิตจากรังไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ได้จากการสกัดด้วย LiBr และผ่านการแช่ด้วยเมทานอล มีโครงสร้างแบบพลิตเบต้า ค่ามุมสัมผัสของน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่ผลิตจากรังไหมสายพันธุ์จีนและญี่ปุ่น ซึ่งแสดงถึงมีความชอบน้ำน้อย ของฟิล์มสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 แสดงดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ค่ามอดูลัสค้ำของฟิล์มไฟโบรอินไหมสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ไหม	ค่ามอดูลัสค้ำ (องศา)	อ้างอิง
พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN)	68.3±0.5	Kaewprasit K. และคณะ (2014)
พันธุ์ญี่ปุ่น (K1)	64.8±1.2	
พันธุ์จีน (K8)	66.0±0.3	

หมายเหตุ : ความเข้มข้นของสารละลายทั้งสามสายพันธุ์ที่นำมาขึ้นรูปร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

#### ค. สมบัติเชิงกล

Kim U.J. และคณะ (2005) ได้ศึกษาสมบัติเชิงกลของโครงเนื้อเยื่อไฟโบรอินสายพันธุ์ญี่ปุ่นที่สกัดด้วยสารละลาย LiBr โดยเตรียมด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก พบว่าโครงเนื้อเยื่อที่เตรียมด้วยความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก มีค่ามอดูลัสของการกด (Compressive modulus) และค่าความเครียด (Compressive stress) สูงกว่าโครงเนื้อเยื่อที่เตรียมด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่า และรายงานของ Lu Q. และคณะ (2010) พบว่าแผ่นฟิล์มไฟโบรอินไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่นที่สกัดด้วย LiBr ที่ผ่านการแช่ด้วยเมทานอลและน้ำมีค่ามอดูลัสการทนต่อแรงดึงที่สูงกว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้แช่เมทานอล และตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

#### ง. สมบัติทางความร้อน

Lu Q. และคณะ (2010) ได้ศึกษาสมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง Thermogravimetry (TGA) พบว่าผลการหลอมละลายและการระเหยของไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จะไม่ปรากฏพีคของการดูดกลืนพลังงาน (Endothermic peak) ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ญี่ปุ่นที่สกัดด้วย LiBr และแช่ด้วยเมทานอล ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแบบพอลิเตเบต้า โดยมีอุณหภูมิละลายตัว ( $T_d$ ) อยู่ที่ 257 – 260 องศาเซลเซียส และแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้ผ่านการแช่ด้วยเมทานอลมีอุณหภูมิการสลายตัว ( $T_d$ ) ที่ 247 – 252 องศาเซลเซียส Kaewprasit K. และคณะ (2014) พบว่าฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่สกัดด้วย LiBr และผ่านการแช่ด้วยสารละลายเมทานอล เมื่อวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง TGA มีอุณหภูมิการสลายตัวของแผ่นฟิล์มอยู่ในช่วง 277 – 279 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะเป็นแก้วของแผ่นฟิล์มที่ผลิตจากรังไหมสายพันธุ์

นางน้อยศรีสะเกษมีค่าเท่ากับ 146.5 องศาเซลเซียส ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)

#### จ. สมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพ

Li M. และคณะ (2003) พบว่าแผ่นไฟโบรอินไหมพันธุจีนที่มีรูพรุน (Porous silk fibroin sheet) และสกัดด้วย  $\text{CaCl}_2:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  อัตราส่วน 1:8:2 ซึ่งขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) มีอัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV ที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิกรัม ซ้ำกว่าการย่อยสลายด้วยสารละลายคอลลาจีเนสและสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยมีครึ่งชีวิตของอัตราการย่อยสลายที่เวลา 9.5 วัน ของการย่อยสลายและมีร้อยละของน้ำหนักคงเหลือเท่ากับ 30 ที่เวลา 15 วันหลังการย่อยสลาย Wadbua P. และคณะ (2010) ได้ศึกษาผลการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใยที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมพันธุนางน้อยศรีสะเกษ 1 ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าแผ่นเส้นใยผสมระหว่างน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำที่ผ่านการแช่ด้วยเมทานอล ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแบบพลิตเบต้า มีอัตราการย่อยสลายที่ช้ากว่าไฟโบรอินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 42.3%, 47.0% และ 98.5% 9 ตามลำดับ ในช่วงระยะเวลา 30 วันของการทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Okhawilai M. และคณะ (2010) พบว่าแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหมพันธุนางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่มีปริมาณอัตราส่วนของไฟโบรอินมากจะมีอัตราอัตราการย่อยสลายที่ต่ำกว่าอัตราส่วนที่มีเจลาตินมากอัตราส่วนที่มีเจลาตินมาก โดยการทดสอบด้วยสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิกรัม พีเอช 7.4

#### ฉ. สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์และร่างกาย

Wadbua P. และคณะ (2010) รายงานผลความเป็นพิษของแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยพันธุนางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่สกัดด้วย LiBr ทดสอบกับเซลล์หนู (Mouse embryonic fibroblast, NIH3T3) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F12 ที่ประกอบด้วย 10% FBS ซึ่งทำการศึกษาโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่ด้วยแผ่นเส้นใยไฟโบรอินมาเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์อยู่ในช่วง 93.0 – 99.5% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT Assay สรุปได้ว่าแผ่นเส้นใยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Kaewprasit K. และคณะ (2014) พบว่าฟิล์มไฟโบรอินที่ผลิตจากรังไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่น มีความเข้ากันได้กับเซลล์กระดูกของหนู (MSC) โดยมีร้อยละการยึด

เกาะและอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่ผลิตจากรังไหมสายพันธุ์จีนและพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ซึ่งคิดเป็นค่าร้อยละการยืดเกาะของเซลล์เท่ากับ  $79.4 \pm 10.8$ ,  $66.9 \pm 6.3$  และ  $60.6 \pm 6.2$  ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก ซึ่งวิเคราะห์จากค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและปริมาณการสะสมแคลเซียม แผ่นฟิล์มที่ผลิตจากรังไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่นแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตสและปริมาณการสะสมของแคลเซียมสูงกว่าแผ่นฟิล์มสายพันธุ์อื่นๆ

### 2.2.2.2 การประยุกต์ใช้งานของเส้นใยไหม

ไหมถูกนำมาประยุกต์ใช้งานในหลากหลายด้าน เช่น งานด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งไหมเป็นที่รู้จักแพร่หลายมาเป็นระยะเวลานาน โดยไหมทำจากเส้นใยธรรมชาติที่ได้จากสัตว์จำพวกหนอนไหมโดยคายเส้นใยออกมาทางปากมีความยาวต่อเนื่อง เมื่อนำมาทอเป็นผืนผ้าทำให้อ่อนนุ่มเป็นมัน เหนียว ยืดหยุ่นตัวดี ดูดซับความชื้น ย้อมสีง่ายและสวมใส่สบายเนื่องจากมีความชื้นในตัวเอง (Moisture Regain) มีค่าสูงประมาณร้อยละ 11 เมื่อเทียบกับผ้าฝ้ายหรือผ้าชนิดอื่นๆ งานด้านเครื่องสำอาง เช่น นำไฟโบรอินมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ทั้งในรูปของเหลวและผง โดยเครื่องสำอางที่เป็นน้ำก็จะใช้สารสกัดในรูปของเหลวผสม เครื่องสำอางที่อยู่ในรูปผงก็ใช้สารสกัดที่เป็นผง ซึ่งไฟโบรอินเป็นสารธรรมชาติ จึงไม่มีการระคายเคืองผิว และยังรักษาความชุ่มชื้นให้กับผิวได้ดี งานด้านการแพทย์ ซึ่งในงานทางการแพทย์และงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะนำส่วนไฟโบรอินของไหมมาทำการขึ้นรูปในหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับการใช้งาน เช่น นำมาทำเป็นแผ่นปิดแผล ตัวนำส่งยาเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เอ็นเทียม ผิวหนังเทียม [Wang, Y. และคณะ 2006] โครงเลี้ยงเซลล์เพื่อเป็นโครงค้ำจุนให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโต นอกจากนี้เส้นใยไฟโบรอินยังถูกเตรียมให้อยู่ในลักษณะผงหรือเจลขึ้นอยู่กับการนำไปใช้งาน [Zhang, F. และคณะ 2009]

### 2.1.3 การประยุกต์ใช้งานเจลลาตินร่วมกับไฟโบรอินไหม

#### ก. สมบัติความชอบน้ำ

Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้รายงานผลค่ามุมสัมผัสผิวน้ำของแผ่นฟิล์มที่มีผสมระหว่างเจลลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 พบว่าค่ามุมสัมผัสผิวน้ำแผ่นฟิล์มที่มีผสมระหว่างเจลลาตินและไฟโบรอินมีค่าประมาณ  $63 - 65^\circ$  ซึ่งมิตามมุมสัมผัสผิวน้ำมากกว่าค่ามุมสัมผัสผิวน้ำของฟิล์มเจลลาติน ( $59.1 \pm 2.1^\circ$ ) แสดงให้เห็นว่าแผ่นฟิล์มผสมมีความชอบน้ำมากกว่า และมีความไม่ชอบน้ำมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไฟโบรอิน

### ข. สมบัติเชิงกล

Chamchongkaset J. และคณะ (2008) ได้รายงานผลการศึกษาศสมบัติเชิงกลของโครงเนื้อเยื่อไฟโบรอินไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน พบว่าเมื่อคอนจูเกตเจลาตินบนโครงเนื้อเยื่อไฟโบรอิน ค่ามอดูลัสของการกดมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ  $506 \pm 151$  กิโลปาลคาล เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเนื้อเยื่อไฟโบรอินที่ยังไม่ได้ผ่านการคอนจูเกตด้วยเจลาตินมีค่ามอดูลัสเท่ากับ  $262 \pm 61$  กิโลปาลคาล Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาค่ามอดูลัสของการกดแผ่นเส้นใยเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC/NHS และรายงานของ Wang S. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาผลของสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์จีนที่ไม่ได้ผ่านและผ่านการแช่ด้วยเอทานอล และมีเส้นใยมีความยาว  $139 \pm 42$  นาโนเมตร พบว่าค่าความสามารถของวัสดุที่สามารถยืดออกได้โดยไม่แตกหัก (Elongation) ของแผ่นเส้นใยผสมที่ผ่านการแช่ด้วยเอทานอลมีค่าร้อยละ Elongation เท่ากับ  $30.55 \pm 3.46$  ซึ่งมีค่าสูงกว่าเส้นใยที่ไม่ได้ผ่านการแช่ด้วยเอทานอล

### ค. สมบัติทางความร้อน

Srisuwan Y. และคณะ (2012) ได้ศึกษาสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยพันธุ์อีรีและเจลาตินด้วยเครื่อง Thermogravimetry (TGA) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น อุณหภูมิของการสลายตัวเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งมีค่า Td อยู่ที่ 300 องศาเซลเซียส และฟิล์มที่มีอัตราส่วนผสมของเจลาตินมาก อุณหภูมิการสลายตัว (Td) อยู่ที่ 200 – 300 องศาเซลเซียส Tessanan W. และ Srihanam P. (2011) ได้นำฟิล์มเจลาตินและไฟโบรอินไหมสายพันธุ์นางลายที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยพอลิเอทิลีนไกลคอลไดโกลซิควิอีเธอร์ (PEGDE) มาทดสอบอุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มด้วยเครื่อง TGA พบว่าอุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มไฟโบรอินอย่างเดรยมีค่าเท่ากับ 311 องศาเซลเซียส และฟิล์มเจลาตินอย่างเดียวมี Td เท่ากับ 335 และฟิล์มผสมระหว่างเจลาตินกับไฟโบรอินที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวางด้วย PEGDE มีค่า Td เท่ากับ 326 แต่เมื่อทำการเชื่อมขวางฟิล์มผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินค่าอุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มมีค่าน้อยกว่าฟิล์มไฟโบรอินอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ

### ง. สมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพ

จากรายงานของ Mandel B.B. และคณะ (2009) พบว่าแผ่นฟิล์มหลายชั้น (Multilayer films) ที่ผลิตจากไฟโบรอินไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่นและเจลาติน หลังจากนำแผ่นฟิล์ม (ขนาด 30x10 มิลลิเมตร ความหนา 1 มิลลิเมตร) แช่ด้วยเมทานอลเพื่อให้ได้โครงสร้างแบบฟลิตเบต้าที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งการผลิตจำนวนชั้นของฟิล์ม 5 ชั้นและอัตราส่วนผสมระหว่างไฟโบรอินต่อเจลาติน 4 : 1 มีอัตราการย่อยสลายที่ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) พบว่าแผ่นที่เส้นใยเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC/NHS ซึ่งแผ่นเส้นใยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร และมีความหนา 2 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิกรัม พบว่าแผ่นเส้นใยที่มีอัตราส่วนผสมของเจลาตินมากกว่า มีอัตราการย่อยสลายที่รวดเร็วกว่าอัตราส่วนผสมที่มีไฟโบรอินมากกว่า โดยย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในเวลา 1 ชั่วโมง ขณะที่แผ่นเส้นใยที่เวลาอัตราส่วนไฟโบรอินมากมีน้ำหนักคงเหลือมากกว่า 90 หลังจากการย่อยสลายเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

### จ. สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์และร่างกาย

Chamchongkaset J. และคณะ (2008) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ถูกคอนจูเกตด้วยเจลาติน เซลล์กระดูกหนู (Mouse preosteoblast cell line, MC3TC-E1 cell) สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้คอนจูเกตด้วยเจลาติน Vachiraroj N. และคณะ (2009) ได้รายงานผลการศึกษาความเข้ากันได้ในห้องปฏิบัติการของฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 สกัดด้วยสารละลาย LiBr และเจลาตินชนิดเอกับเซลล์ไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow derived stem cells, MSC) และเซลล์กระดูกของหนู (Mouse preosteoblast cell line, MC3T3) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน บนฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/เจลาตินมีร้อยละการยึดเกาะและอัตราการเจริญเติบโตที่สุดของเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและปริมาณแคลเซียมเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก หลังการทดสอบ 28 วัน ฟิล์มและโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไฟโบรอิน/เจลาติน/ไฮดรอกซีแอปาทิต แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและปริมาณแคลเซียมสูงสุด และ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ได้ศึกษาความเข้ากันได้ของ



เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนู (MSC) กับแผ่นเส้นใยผสมระหว่างเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย นางน้อยศรีสะเกษ 1 สกัดด้วยสารละลาย LiBr ที่ไม่ได้ผ่านและผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS พบว่า แผ่นเส้นใยผสมที่ผ่านการเชื่อมขวางมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่สูงกว่าแผ่นเส้นใยที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวาง โดยแผ่นเส้นใยที่มีอัตราส่วนผสมไฟโบรอินต่อเจลาติน 40/60 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโต  $7.8 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง และมีค่า PDT เท่ากับ 88.77 ชั่วโมง

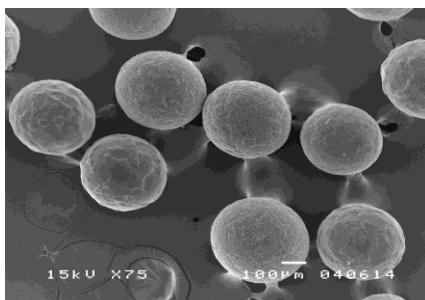
## 2.2 อนุภาคไมโคร (Microspheres)

อนุภาคไมโครเป็นอนุภาคไมโครทรงกลมสามมิติขนาดเล็ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 1 ถึง 1000 ไมโครเมตร อนุภาคไมโครมีลักษณะเป็นโครงสร้างของอนุภาคไมโครโดยไม่สามารถแยกส่วนผนังหรือส่วนที่ได้ห่อหุ้มได้อย่างชัดเจน เมื่อมีสารสำคัญ เช่น ยา สารสำคัญ เหล่านั้นจะกระจายตัวแทรกอยู่ทั่วไปในสารห่อหุ้มในลักษณะต่อเนื่องกัน ซึ่งสารสำคัญอาจอยู่ในรูปของสารละลายหรือกระจายตัวอยู่ในลักษณะของอนุภาคหรือระดับโมเลกุลก็ได้ [วันดี รังสีวิจิตร ประภา 2549] ข้อดีของอนุภาคไมโคร คือ สามารถดูดซับน้ำได้ดี อีกทั้งยังสามารถควบคุมให้มีสมบัติตามที่ต้องการได้สามารถบรรจุสารสำคัญเข้าไปในอนุภาคได้ในปริมาณมาก และมีสัดส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง นอกจากนี้อนุภาคไมโครถือเป็นโครงเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นเพื่อสนับสนุนการเนื้อเยื่อสามมิติได้ [Sahoo S.K. และคณะ 2005]

### 2.2.1 การประยุกต์ใช้งานอนุภาคไมโคร

ปัจจุบันงานด้านการแพทย์ เกษษกรรม และงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีการนำอนุภาคไมโครมาประยุกต์ในหลากหลายด้าน สามารถใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยา ระบบนำส่งยา เช่น อนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินที่เป็นตัวนำส่งและควบคุมการปลดปล่อยของเคอร์คูมิน (Curcumin) และไพเพอรีน (Piperine) ในการรักษาแบบฉีดผ่านไปยังจุดเป้าหมาย เนื่องจากอนุภาคไมโครมีความสะดวกและมีขนาดเล็กผ่านห้วซึมฉีดยาเพื่อเข้าไปรักษาที่ตรงจุดได้ [Ratanavaraporn J. และคณะ 2013] นอกจากนี้มีการนำอนุภาคไมโครใช้เป็นระบบนำส่งเพื่อให้บรรลุผลในการรักษา มะเร็งเต้านม เนื่องจากระบบเนื้อเยื่อลำเลียงของมะเร็งไม่มีความเป็นระเบียบและคาดเดาโครงสร้างหรือหน้าที่การทำงานของตัวเองไม่ได้ ทั้งนี้ความไม่เป็นระเบียบจึงเป็นอุปสรรคสำคัญในระบบการ

นำส่งยาไปยังเนื้อเยื่อมะเร็ง ดังนั้นการนำอนุภาคไมโครมาประยุกต์ใช้งานจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ลดปัญหาในการนำส่งเพื่อรักษาโรคมะเร็งได้ [Hiramath G.J. และ Kusin D. 2010]



รูปที่ 2.8 โครงเลี้ยงเซลล์อนุภาคไมโครผลิตจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

## 2.2.2 วิธีการขึ้นรูปอนุภาคไมโคร (Fabrication of microspheres)

[Alagusudaram M. และคณะ 2009]

โดยกระบวนการขึ้นรูปสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

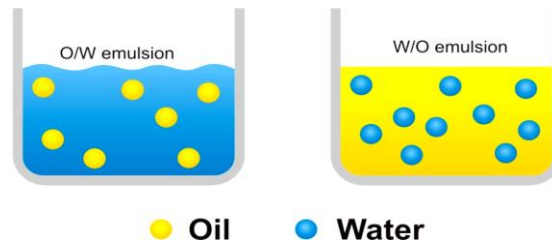
### 2.2.2.1 Single evaporation method

ความหมายของอิมัลชัน (emulsion) คือเป็นของเหลวสองชนิดหรือมากกว่าที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (immiscible liquids) หรือเป็นระบบที่เรียกว่า heterogeneous system ระบบของอิมัลชันประกอบด้วย 2 ส่วน โดยที่ของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ของเหลวที่กระจายตัวเป็นหยดเล็กๆซึ่งมักเป็นส่วนที่มีปริมาณน้อย จะเรียกส่วนนั้นว่าส่วนกระจายตัวหรือวัฏภาคภายใน (dispersed หรือ discontinuous หรือ internal phase) ส่วนของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่กระจายตัวอยู่รอบนอกเรียกว่าส่วนต่อเนื่องหรือวัฏภาคภายนอก (continuous หรือ external phase) โดยชนิดของอิมัลชันจะแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ

ก. กระบวนการอิมัลชันเดี่ยว (Single emulsification process) สามารถแบ่งออกได้อีก 2 ระบบ คือ

1. อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion หรือ o/w) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันทั่วไป เตรียมได้โดยนำวัฏภาคภายในที่ประกอบด้วยสารสำคัญ เช่น ยา ละลายในสารละลายพอลิเมอร์ จากนั้นนำวัฏภาคภายในหยดลงไปในวัฏภาคภายนอก ซึ่งเป็นสารพวกอิมัลซิไฟเออร์หรือสารลดแรงตึงผิว (emulsifier) ในน้ำ และการทำป่นเพื่อลดขนาดของอิมัลชัน โดยใช้เครื่องปั่นชนิดมีใบพัด (Propeller) เป็นระยะเวลาสั้น ซึ่งการเกิดเป็นอนุภาคนั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่าย เช่น ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม จากวัฏภาคภายนอกจะแพร่เข้าไปยังวัฏภาคภายใน สารสำคัญเกิดการกระจายตัวจากวัฏภาคภายในไปภายนอกและพอลิเมอร์จะเปลี่ยนรูปจากหยดอิมัลชันเป็นอนุภาคไมโครที่มีผนังแข็ง เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ถูกระเหยไป ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในวัฏภาคภายในใช้สำหรับละลายพอลิเมอร์ และขณะการก่อตัวเป็นอนุภาคไมโคร ตัวทำละลายอินทรีย์จะค่อยๆระเหยออกไปในขณะปั่นกวน ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์นั้นมีความเป็นพิษเมื่อถูกสัมผัส ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้สามารถทำได้โดยง่ายแต่ผลผลิตที่ได้ต่ำเมื่อใช้กับสารสำคัญที่ละลายได้มากในน้ำทำให้ไม่สามารถกักเก็บสารสำคัญไว้ในพอลิเมอร์ได้ในปริมาณน้อย

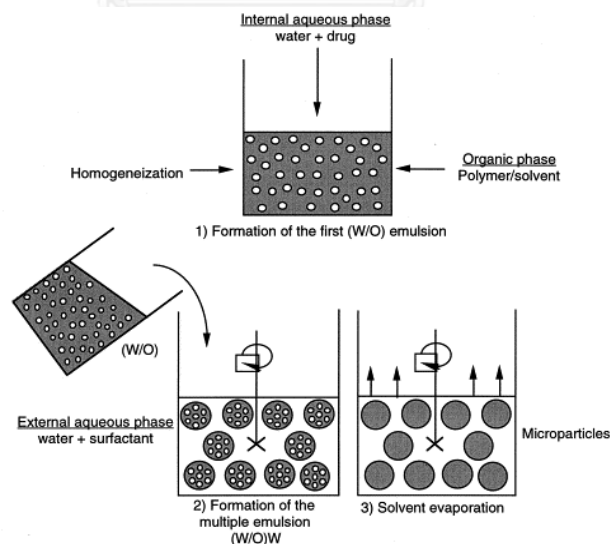
2. อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำมัน (oil-in-oil emulsion หรือ o/o) เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับใช้กับสารสำคัญที่ละลายน้ำได้ดี (รูปที่ 2.9) โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นวัฏภาคภายในต้องไม่ละลายในน้ำมันหรือวัฏภาคภายนอก ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถกักเก็บสารสำคัญหรือยาที่สามารถละลายน้ำได้ให้คงตัวอยู่ในน้ำมันในปริมาณน้อย และอีกทั้งการใช้น้ำมันยังเป็นการลดการแพร่ของพอลิเมอร์ไปยังวัฏภาคภายนอก แต่ข้อเสียคือการล้างน้ำมันออกจากพื้นผิวของอนุภาคไมโครทำได้ยากและทำให้เกิดการละลายสารสำคัญที่เกาะบริเวณพื้นผิวของอนุภาคออกไป ซึ่งน้ำมันที่ใช้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง โดยกระบวนการเตรียมต้องอาศัยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ไดคลอโรมีเทนหรืออะซิโตนไตรีน มาละลายพอลิเมอร์ได้เป็นวัฏภาคภายใน จากนั้นจึงนำวัฏภาคภายในมาหยดในวัฏภาคภายนอก และตัวทำละลายอินทรีย์จะค่อยๆถูกสกัดโดยวัฏภาคภายนอกทำให้พอลิเมอร์เกิดการก่อตัว ผนังของอิมัลชันจะเริ่มเปลี่ยนรูปจากหยดที่อ่อนนุ่มกลายเป็นผนังที่แข็งและคงตัว จากนั้นจึงนำอนุภาคไมโครมากำจัดน้ำมันออกโดยการล้างด้วยตัวทำละลายที่ไม่ละลายพอลิเมอร์ เช่น อะซิโตน และ n-hexane



รูปที่ 2.9 การเตรียมไมโครพาร์ติเคิลโดยวิธี w/o emulsion และ o/o emulsion

ข. อิมัลชันเชิงซ้อนหรืออิมัลชันเชิงคู่ (Multiple-emulsion technique)

เทคนิคเป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับสารสำคัญหรือยาที่มีความสามารถในการละลายสูง ละลายในน้ำได้ดี นอกจากนี้วิธีนี้ยังไม่ต้องใช้น้ำมันเหมือนเช่นวิธี w/o ซึ่งมีกระบวนการล้างอนุภาค ไมโครที่ยาก ส่วนใหญ่วิธีนี้ใช้กับกลุ่มโพรตีนพอลิเมอร์และกลุ่มของเพปไทด์ วิธีการทำได้โดยนำ สารสำคัญมาละลายในน้ำแล้วจึงนำสารละลายที่ได้มาเทลงในสารประกอบที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ และตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเรียกว่าวัฏภาคภายนอกเพื่อเตรียมให้เป็นอิมัลชันชั้นปฐมภูมิ (Primary w/o emulsion) หลังจากนั้นนำ w/o ที่ได้มาลงในวัฏภาคภายนอกอีกครั้ง ซึ่งวัฏภาคภายนอกนี้มีการผสมสารลดแรงตึงผิวลงไปปั่นกวนในวัฏภาคภายนอกด้วย เพื่อให้เกิดเป็นอิมัลชันเชิงซ้อน w/o/w จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก ล้างและตากให้แห้ง แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การเตรียมอนุภาคไมโครด้วยวิธีอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple-emulsion technique)

[De Verdier, A. C. 1997]

### 2.2.2.2 วิธีแยกวัฏภาคแบบ Phase separation หรือ Coacervation

วิธีนี้เป็นการแยกวัฏภาคของสารละลายที่เป็นน้ำและไม่ใช่น้ำของพอลิเมอร์โดยแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

#### ก. Simple coacervation

วิธีนี้เป็นวิธีช่วยลดการละลายของพอลิเมอร์ในพอลิเมอร์ที่ถูกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์และสารสำคัญ เช่น ยา เมื่อเริ่มกั่นปั่นกวนจะทำการเตรียมสารละลายที่ไม่ทำละลายพอลิเมอร์ตัวนั้นลงไป จากนั้นพอลิเมอร์จะเกิดการเปลี่ยนสถานะไปจับกับสารสำคัญและเกิดการตกตะกอนทำให้สามารถแยกวัฏภาคที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำได้ ทั้งนี้นอกจากจะเติมตัวที่ไม่ละลายพอลิเมอร์ได้ แล้วยังสามารถเติมเกลือ เปลี่ยนอุณหภูมิ พีเอชหรือเติมพอลิเมอร์ตัวอื่นๆลงไปอีกซึ่งต้องไม่ละลายพอลิเมอร์ตัวแรกที่เติมด้วยเช่นกัน

#### ข. Complex coacervation

วิธีนี้เกิดจากการที่สารมีประจุบวก ประจุลบ และที่มีประจุทั้งสองชนิด เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างกัน ถ้าเกิดปฏิกิริยากับสารพอลิเมอร์ชนิดเดียวกันเรียกว่า unicomplexation และถ้าเกิดปฏิกิริยา 2 หรือ 3 ชนิดจะเรียกว่า dicomplex และ tricomplex coacervation

### 2.2.2.3 วิธีการทำแห้งโดยการฉีดพ่นด้วยสเปรย์ (Spray drying)

วิธีการนี้จะอาศัยลมร้อนทำให้น้ำเกิดการระเหยออกมาเป็นของแข็ง โดยของเหลวที่พ่นออกมานั้นคือ ยาหรือสารสำคัญที่ถูกละลายอยู่ในพอลิเมอร์ และถูกพ่นออกมากลายเป็นเม็ดผงเล็กๆ นอกจากนี้ยังมีการทำด้วยกระบวนการที่เรียกว่า supercritical fluid technology ทำโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหลวทำละลายตัวยาและตัวพอลิเมอร์ จากนั้นนำมาผ่านเครื่องควบแน่นและการให้กระแสมร้อนโดยการลดความดันลงทำให้ของเหลวกลายเป็นไอได้พอลิเมอร์ออกมาเป็นอนุภาคไมโครขนาดเล็ก

### 2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคไมโคร

- อัตราส่วนน้ำและน้ำมัน
- อัตราเร็วในการปั่นกวนสารละลายผสม
- ความหนืดของแต่ละวัฏภาค

## 2.3 การเชื่อมขวาง (Crosslinking)

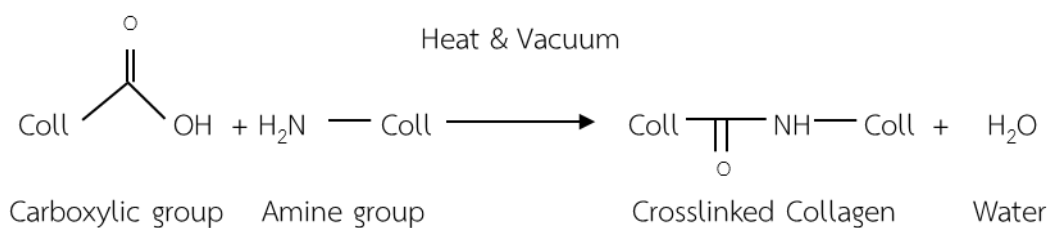
การเชื่อมขวางเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงสมบัติของวัสดุหรือโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์ทำให้พอลิเมอร์มีสมบัติเชิงกลที่ดีขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น ทำให้อัตราการย่อยสลายช้าลง และมีความสามารถในการบวมน้ำได้ดี การเชื่อมขวางมีทำได้หลากหลายวิธีโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ การเชื่อมขวางทางกายภาพและเคมี

### 2.3.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical Crosslinking)

การเชื่อมขวางทางกายภาพเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากไม่ใช้สารเคมีทำให้ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีบนวัสดุ การเชื่อมขวางทางกายภาพ ได้แก่ การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (dehydrothermal treatment; DHT) และการเชื่อมขวางการด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เช่น UV-irradiation

#### 2.3.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment; DHT)

เทคนิคการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อน เป็นที่เทคนิคหนึ่งที่ยิยมเนื่องจากไม่ใช้สารเคมีในการเชื่อมขวางจึงไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างหลังเสร็จสิ้นกระบวนการ เทคนิคนี้เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 98 องศาเซลเซียส กระทำภายใต้สภาวะสุญญากาศ โดยจะเกิดการเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีนของโปรตีน และหมู่คาร์บอกซิลของสายโปรตีนที่อยู่ใกล้กัน ทำให้มีการจับโมเลกุลของน้ำออกมา ดังรูปที่ 2.11 การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้จะส่งผลให้ความสามารถในการกักกกับน้ำของวัสดุลดลง แต่เป็นการเพิ่มสมบัติทางกลคือมีความสามารถในการทนต่อแรงดึงได้มากขึ้นและวัสดุย่อยสลายได้ช้าลง แต่ข้อเสียคือการเชื่อมขวางด้วยความร้อนนี้เป็นการเชื่อมกันระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและหมู่เอมีนที่อยู่ใกล้กันเท่านั้น ทำให้ได้คาร์บอนการเชื่อมขวางน้อยจึงมักทำการเชื่อมขวางควบคู่กับการเชื่อมขวางวิธีอื่นๆ [Friess W. 1998, Haugh M.G.และคณะ 2009]



รูปที่ 2.11 การเชื่อมขวางคอลลาเจนด้วยความร้อน [ดัดแปลงจาก Haugh, M.G.และคณะ 2009]

Ratanavaraporn J. และคณะ (2006) ได้ศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน และคอลลาเจนด้วยกระบวนการขึ้นรูปการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) เชื่อมขวางพันธะ โดยใช้ความร้อนที่สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความเข้ากันได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์ผิวหนังหนู (Fibroblast cell) จากการศึกษาพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีค่าร้อยละการเชื่อมขวาง (ร้อยละ 32) สูงกว่า โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน (ร้อยละ 8) แต่เมื่อทดสอบสมบัติเชิงกล โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนค่ามอดูลัสของการกดสูงกว่า (17 กิโลปาลกาล) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (5 กิโลปาลกาล) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสมบัติการเป็น Random coil ของเจลาติน ซึ่งมีสมบัติเชิงกลที่ต่ำส่งผลให้มอดูลัสที่น้อยกว่าคอลลาเจน แต่อัตราการดูดซับที่เวลาการเชื่อมขวางเดียวกันของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและไฟโบรอินไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีสัดส่วนการดูดซับน้ำอยู่ระหว่าง 6-8 เท่าของน้ำหนักเดิม ผลการทดสอบทางชีวภาพ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและคอลลาเจน สามารถส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนูได้ [Ratanavaraporn J. และคณะ 2006]

Haugh, M.G. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาผลของการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนที่มีผลต่อสมบัติเชิงกลและโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากคอลลาเจนและไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเชื่อมขวางอยู่ในช่วง 105-180 °C และเวลาในการเชื่อมขวางอยู่ที่ 24-120 ชั่วโมง จากการศึกษาสมบัติเชิงกลพบว่าเมื่ออุณหภูมิในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์จะมีค่าแรงดึง (Tensile) และความต้านทานแรงกด (Compression) เพิ่มขึ้น และเมื่อศึกษาสมบัติด้วย Fourier transform infrared microscopy (FTIR) พบว่า การเชื่อมสภาพของคอลลาเจนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการเชื่อมขวางมากขึ้น ในทำนองเดียวกันความหนาแน่นของการเชื่อมขวางจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นด้วย [Haugh, M.G. และคณะ 2009]

### 2.3.1.2 การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV-irradiation)

การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นกระบวนการนำรังสีมาเชื่อมขวางกันระหว่างอิเล็กตรอนอิสระของหมู่อะโรมาติกและหมู่เอมีนของเจลาติน การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้จะมีค่าความหนาแน่นที่สูง และระยะเวลาในการเชื่อมขวางก็มีผล เช่น เมื่อฉายรังสีนานเกินไปอาจทำให้สาย

โไซของเจลาตินสั้นลง ข้อดีของวิธีนี้คือไม่ใช้ความร้อนจึงไม่ส่งผลต่อโปรตีนที่ใช้และไม่มีสารเคมีตกค้าง [Sionkowska, A. และคณะ 2006]

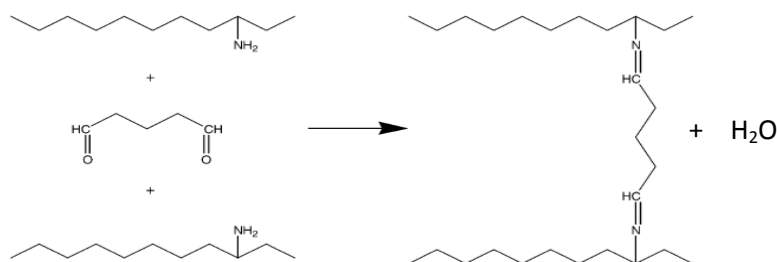
### 2.3.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical Crosslinking)

การเชื่อมขวางทางเคมีเป็นการวิธีที่ได้รับความนิยมวิธีหนึ่งโดยใช้สารเคมีในการเชื่อมขวาง ทำการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันสองหมู่ ได้แก่ การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide esters (NHS)

#### 2.3.2.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)

กลูตารัลดีไฮด์ เป็นสารกลุ่มอัลดีไฮด์ชนิดหนึ่ง ลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน ใสไม่มีสี มีกลิ่นฉุน ในทางการแพทย์กลูตารัลดีไฮด์ถูกนำมาใช้ในเป็นสารฆ่าเชื้อและทำความสะอาดเครื่องมือแพทย์อีกด้วย โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์ประกอบไปด้วยคาร์บอน 5 ตัวต่อแบบสายโซ่ตรงมีปลายทั้งสองข้างเป็นหมู่อัลดีไฮด์ ซึ่งหมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) จะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมขวาง โดยทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) ของโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 2.12 ข้อดีของวิธีนี้คือการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์จะทำได้อย่างรวดเร็วและให้ประสิทธิภาพสูง พอลิเมอร์มีความแข็งแรงมีสมบัติเชิงกลที่ดี อัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์ทำได้ช้าลงทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ เมื่อปริมาณความเข้มข้นของ GA เพิ่มขึ้นส่งผลให้อัตราการบวมตัวของพอลิเมอร์ลดลง เนื่องจากพอลิเมอร์หลังเชื่อมขวางพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น แต่ข้อเสียของการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์คือหลังจากเชื่อมขวางพันธะเกิดพิษตกค้าง เนื่องจากกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารที่เป็นพิษและเป็นอันตรายต่อร่างกายเป็นอย่างมาก ดังนั้นหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวางต้องทำการกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ให้หมดด้วยการใช้ไกลซินซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีหมู่อะมิโนเหมือนโปรตีนกำจัดออก หากมีกลูตารัลดีไฮด์หลงเหลืออยู่เมื่อนำไปใช้ในร่างกาย กลูตารัลดีไฮด์จะทำการเชื่อมขวางกับเซลล์เนื้อเยื่อในร่างกายได้ [Lee C.R. 2001]





**รูปที่ 2.12** การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [Lee C.R. 2001]

Bigi A. และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาศสมบัติเชิงกล สมบัติความชอบน้ำของฟิล์มเจลาตินชนิดเอ พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เดียวกัน (ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก) ทำการเพิ่มเวลาการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้นจาก 5 นาที ถึง 24 ชั่วโมง พบว่าค่าร้อยละการดูดซับน้ำมีค่าสูงขึ้น (180-300) ตามลำดับเวลาที่ถูกแช่น้ำเพิ่มขึ้น และอัตราการดูดซับน้ำเริ่มคงที่ที่เวลา 24 ชั่วโมง และขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งใช้เป็นสารเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าร้อยละการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น แต่อัตราการดูดซับน้ำลดลง และจากการศึกษาศสมบัติเชิงกลพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ค่ามอดูลัสของการกดและค่าความเค้น ณ จุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาศสมบัติด้วย Differential scanning calorimetry (DSC) พบว่า อุณหภูมิการเสถียรภาพของเจลาตินก่อนทำการเชื่อมขวางเท่ากับ 43 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 %โดยน้ำหนัก ทำให้อุณหภูมิการเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเป็น 72 องศาเซลเซียส [Bigi, A และคณะ 2001]

Ma L. และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนและไคโตซาน ซึ่งขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและทำการเชื่อมขวางพันธะด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ปัจจัยที่ศึกษาคือ ปริมาณความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ (0.05-0.25 % โดยน้ำหนัก) การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ ส่งผลโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากยิ่งขึ้น สามารถลดอัตราการย่อยสลายให้ช้าลงได้ และส่งผลให้ความสามารถในการบวมน้ำลดลง ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปด้วยคอลลาเจนอย่างเดียวมีอัตราการย่อยสลายที่ค่อนข้างเร็ว และเมื่อเพิ่มไคโตซานในอัตราส่วนที่เหมาะสมทำให้อัตราการย่อยสลายช้าลงเล็กน้อย แต่ถ้านำโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน/ไคโตซานมาทำการเชื่อมขวางพันธะด้วยกลูตารัลดีไฮด์ทำให้อัตราการย่อยสลายช้าลงเป็นอย่างมาก จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการ

เชื่อมขวางด้วยกลูตาไรต์ไฮโดรไปทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast Cell) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี [Ma L. และคณะ 2003]

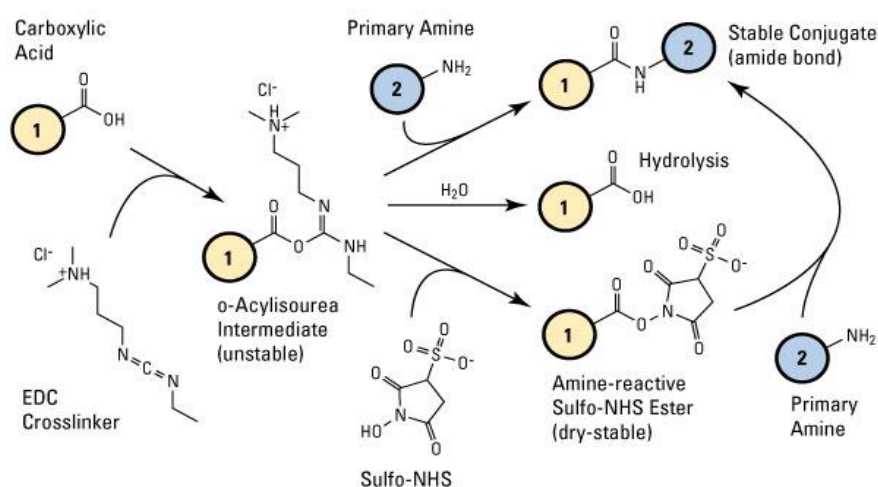
Wongputtaraksa, T. และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลของการคอนจูเกตสารผสมระหว่างเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ คือ 100/0, 90/10, 80/20, 70/30 และทำการเชื่อมขวางพันธะด้วยกลูตาไรต์ไฮโดร ความเข้มข้นของกลูตาไรต์ไฮโดรที่ใช้คือ 0.5, 0.1, 0.15, 0.2 %โดยปริมาตร พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารกลูตาไรต์ไฮโดร 0.1% สารผสมระหว่างเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ จะถูกคอนจูเกตเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน ประมาณร้อยละ 28-29 ทำให้ค่าความหนาแน่นและค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น จึงช่วยส่งเสริมความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อนำไปทดสอบสมบัติทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู พบว่าอัตราส่วนไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกคอนจูเกตเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดีขึ้น สังเกตจากปริมาณแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณแคลเซียม และลักษณะของเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ [Wongputtaraksa, T. และคณะ 2011]

### 2.3.2.2 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde)

ฟอร์มัลดีไฮด์หรือที่รู้จักกันในชื่อของฟอร์มาลีน โครงสร้างทางเคมีคือ  $\text{CH}_2\text{O}$  โดยฟอร์มัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของโปรตีนเกิดเป็นสารที่อยู่ในรูปไม่เสถียรเรียก aminomethylol derivative ซึ่งจะทำการเชื่อมขวางกับหมู่อะมิโนของโปรตีน เช่น แอสพาราจีน (Asparagine) และกลูตามีน (Glutamine) เกิดเป็น methylene brid ที่มีความเสถียร ดังแสดงในรูปที่ 2.13 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์มีข้อเสียคือวัสดุที่ได้มีความเปราะ และมีการเปลี่ยนแปลงสีของวัสดุ [Tonin, C. และคณะ 2006]

### 2.3.2.3 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide (EDC)

การเชื่อมขวางด้วย EDC เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากอีกวิธีหนึ่งเนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีพิษ โดย EDC จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิกในโปรตีนสายโซ่ที่ 1 เกิดเป็นสารที่อยู่ในรูปไม่เสถียรเรียกว่า O-acylisourea intermediate โดย O-acylisourea intermediate ที่เกิดขึ้นมีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จึงสามารถกลับมาอยู่ในรูปของหมู่คาร์บอกซิลิกได้อีก ในบางครั้งจะมีการเชื่อมขวางด้วย EDC ทำร่วมกับ N-hydroxysuccinimide esters (NHS) เพื่อให้เกิดความเสถียรในการเชื่อมขวาง โดย NHS จะทำปฏิกิริยากับ o-acylisourea intermediate ที่ไม่เสถียร เกิดเป็นพันธะที่เสถียรมากยิ่งขึ้นนั่นก็คือ NHS-ester จากนั้น NHS-ester จะทำปฏิกิริยากับ -NH<sub>2</sub> ในโปรตีนสายโซ่ที่ 2 เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ที่มีความเสถียร ดังแสดงในรูปที่ 2.14 หลังเสร็จสิ้นกระบวนการจะได้อนุพันธ์ของยูเรียหรือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea สามารถกำจัดได้โดยนำมาละลายน้ำ ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างบนพอลิเมอร์ [Pieper J.S. และคณะ 2000]



รูปที่ 2.13 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วย EDC/NHS

[<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F3305493-0FBC-93DA-2720-4412D198A9C9>]

#### ความแตกต่างของการเชื่อมขวางทางเคมีด้วย EDC และ GA

ความแตกต่างของการเชื่อมขวางทางเคมีด้วย EDC และ GA คือ การเชื่อมขวางด้วย EDC หลังเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวางแล้วไม่หลงเหลือสารเชื่อมขวาง เนื่องจากหลังเสร็จสิ้น

กระบวนการจะได้อนุพันธ์ของยูเรีย ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นจึงไม่ก่อให้เกิดสารพิษ [Pieper J.S. และคณะ 2000] แต่การเชื่อมขวางด้วย GA สารละลาย GA มีความเป็นพิษสูง หลังเสร็จสิ้นกระบวนการจึงเกิดสารพิษตกค้าง แต่สารตกค้างเหล่านี้สามารถกำจัดด้วยสารละลายไกลซิน โดยหมู่อะมิโนอิสระของไกลซินจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อัลดีไฮด์ของ GA ที่หลงเหลืออยู่ จากนั้นจึงล้างออกน้ำน้ำปราศจากไอออน [Lee C.R. 2001]

Mao J. และคณะ 2003 ได้ศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานและเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS ใน 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกเตรียมด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) โคโตซานที่ใช้มีค่า deacetylation degree เท่ากับ 85% ค่าความหนืดเฉลี่ยของน้ำหนักรวมเท่ากับ  $2.0 \times 10^5$  จากการศึกษพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางมีขนาดรูพรุน 80-250 ไมโครเมตร โดยเมื่อเพิ่มอัตราส่วนผสมของเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานที่ผ่านการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นเป็น 30/70 ทำให้อัตราการดูดซับน้ำมีอัตราที่เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าของโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน มีอัตราการดูดซับน้ำที่น้อยและมีอัตราการย่อยสลายช้าเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวาง [Mao J. และคณะ 2003]

Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอโดยใช้แรงทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic Blending) และทำการเชื่อมขวางโดยใช้เทคนิค EDC/NHS จากการศึกษพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวางที่มีอัตราส่วนไฟโบรอินและเจลาติน 50/50 มีสมบัติคล้ายกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางแล้ว โดยดูความสามารถในการทนต่อแรงดึงได้ดี โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทั้งแบบผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวางมีลักษณะรูพรุนที่สม่ำเสมอ การทดสอบอัตราการย่อยสลายในสารละลายคอลลาจีเนส พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางและมีปริมาณไฟโบรอินมากคือที่อัตราส่วน 50/50 อัตราการย่อยสลายจะช้าที่สุด โดยหลังการย่อยสลายที่เวลา 168 ชั่วโมง มีน้ำหนักคงเหลือของวัสดุถึงร้อยละ 90 จากนั้นนำไปทดสอบโดยนำไปเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางเซลล์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS [Jetbumpenkul P. และคณะ 2012]

ตารางที่ 2.8 สรุปงานวิจัยการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนและการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ของเจลาติน

วิธีการขึ้นรูป	วิธีการเชื่อมขวาง	เวลาการเชื่อมขวาง	ร้อยละของการเชื่อมขวาง	สมบัติการบวมน้ำ	ค่ามอดูลัสของการกีด	การย่อยสลาย	อ้างอิง
โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาติน ขนาด 14.5x5 มิลลิเมตร	วิธี DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส	24 ชั่วโมง	29%	580%	4 กิโลปาสคาล	-	Ratanavaraporn J. และคณะ (2006)
	วิธี DHT ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส	48 ชั่วโมง	33%	600%	5 กิโลปาสคาล	-	
อนุภาคไมโครเจลาติน ขนาด 0.24 ไมโครเมตร	วิธี DHT ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส	48 ชั่วโมง	98%	-	-	2 วัน	Doi, N. และคณะ (2011)
	อนุภาคไมโครเจลาติน ขนาด 20-50 ไมโครเมตร	6,18,48,140,192,288 ชั่วโมง	-	-	-	1-12 ชั่วโมง	Tajima, S และคณะ (2012)
ฟิล์มเจลาตินขนาด 0.12mm 3x30mm <sup>2</sup>	วิธี GA ความเข้มข้น 0.05 %wt	24 ชั่วโมง	80%	310%	20 เมกะปาสคาล	-	Bigi, A และคณะ (2001)
	เส้นใยนาโนเจลาติน 100-500นาโนเมตร	24 ชั่วโมง	-	550%	2 เมกะปาสคาล	-	Nguyen, T.H. และคณะ (2010)

## 2.4 ระบบการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (Three dimensional cell culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติในห้องปฏิบัติการได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเป็นเวลาอย่างน้อยหลาย 10 ปี ซึ่งการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิตินั้นเป็นแม่แบบที่ทำได้ง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไป แต่ค่อนข้างมีความแตกต่างในการแสดงออกของเซลล์บนพื้นผิว โครงสร้างของเซลล์ที่ซับซ้อน ความหนาแน่นของเซลล์ และการทำงานของเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อร่างกาย เนื่องจากการสื่อสารของเซลล์ในเนื้อเยื่อร่างกายนั้นมีลักษณะการแสดงออกของเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถพบได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ(monolayer cell culture) [Kim, J.B. 2005, Xu, F และคณะ 2007] ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติจึงเป็นรูปแบบการเพาะเลี้ยงที่ถูกพัฒนาเพื่อปรับปรุงการแสดงออกและการเจริญเติบโตของเซลล์ให้มีลักษณะใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อจริงภายในร่างกาย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งรายงานว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิตินอกจากทำให้เข้าใจถึงโครงสร้างเนื้อเยื่อได้แล้วยังสามารถใช้เป็นต้นแบบทางพรีคลินิกเพื่อศึกษาผลของความเป็นพิษของสารต้านมะเร็งได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ [Jagadeesh H.G. และคณะ 2010] ปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่สนใจการเพาะเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบสามมิติเป็นจำนวนมาก โดยระบบการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติสามารถแบ่งออกได้ 3 วิธีได้แก่

### 2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้เซลล์เกิดการเกาะตัวกันตัวเอง (Spontaneous cell aggregation)

โดยทั่วไปหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดในร่างกายคือเซลล์ แต่ส่วนที่จะนำไปใช้งานหรือใช้ประโยชน์ได้คือ การรวมกลุ่มกันของเซลล์ (Cell aggregation) ซึ่งในร่างกายเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ส่วนใหญ่จะมีการรวมกลุ่มกันเอง โดยเซลล์กับเซลล์เกิดการปฏิสัมพันธ์กันหรือการสื่อสารและเกิดการรวมกลุ่มกันขึ้นเพื่อเพิ่มอัตราการมีชีวิตอยู่หรือเพิ่มประชากร และเพิ่มประสิทธิภาพทางชีววิทยาของตัวเซลล์เอง ส่วนใหญ่เซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์มะเร็ง (Cancer cell) ซึ่งคุณลักษณะของเซลล์มะเร็งเมื่อเข้าไปในร่างกายถ้าเป็นเซลล์เดี่ยวๆที่มีปริมาณไม่มากร่างกายเกิดการต่อต้าน ดังนั้น เซลล์มะเร็งจึงเกิดการรวมกลุ่มเพื่อเพิ่มศักยภาพ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในการขนส่งมวลสาร ซึ่งสารอาหารที่ส่งผ่านไปเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ภายในไม่เพียงพอเมื่อเซลล์เกิดการรวมกลุ่มกัน และเกิดการขาดออกซิเจนทำให้เซลล์ที่ถูกทับถมกันภายในเกิดการตายขึ้น ในปี 1970 Inch, W. R. และคณะ ได้ศึกษาถึงต้นแบบของสเฟียรอยด์หลายชั้น (Multispheroid) และความสัมพันธ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและกลุ่มของเนื้อเยื่อ ซึ่งการรวมกลุ่มกันของเซลล์ทำให้เกิดลักษณะสเฟีย

รอยดัดได้นั้นต้องอาศัยแรงในการยึดเกาะที่มีความแข็งแรงกว่าแรงยึดเกาะที่เกิดจากเซลล์และพื้นผิว ดังนั้นปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลต่อการรวมกลุ่มกันคล้ายสเฟียรอยดัด ได้แก่

ก. พื้นผิวที่ไม่มีแรงยึดเหนี่ยว (Nonadhesive surface)

การก่อตัวของสเฟียรอยดัดสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนพื้นผิวที่ไม่ทำให้เซลล์ยึดเกาะ เช่น พื้นผิวที่มีประจุบวก (Positively charged surfaces) วัสดุที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic polymer) พอลิเมอร์จำพวกโพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol) การเคลือบด้วยสารอัลบูมิน (Albumin coating) พิล์มอะกาโรส (Agarose thin films) [Koide และคณะ 1990, Lin และ Chang 2008, Emfietzoglou และคณะ 2005]

ข. แรงจากภายนอก (External force)

สเฟียรอยดัดสามารถก่อตัวได้เองตามธรรมชาติโดยอาศัยกลไกทางฟิสิกส์ ซึ่งคือแรงจากภายนอกกระบวนที่ทำให้ระบบเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกววน (Spinner flask) และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) เป็นที่นิยมถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อควบคุมสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ เครื่องปฏิกรณ์ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่จะใช้ระบบปั่นกววนในถัง ดังนั้นแรงกลจากการปั่นกววนและการควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น ปริมาณอาหาร อากาศและพีเอช จะชักนำให้เซลล์เกิดการก่อตัวเป็นสเฟียรอยดัด ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยเครื่องปฏิกรณ์ยังสามารถจำลองสภาวะแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับการทำงานของร่างกายมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งอยู่กับที่ ข้อดีของการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้คือ เซลล์สามารถได้รับอาหารและอากาศที่เพียงพอ มีการกระจายตัวอย่างทั่วถึง ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีและเกิดการรวมกลุ่มได้ [Rodday และคณะ 2011, Liu, B. H. และคณะ 2013]

ค. Liquid overlay

เทคนิคลิควิดโอเวอร์เลย์เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่เซลล์สามารถรวมกลุ่มเป็นสเฟียรอยดัดได้ กระบวนการเริ่มต้นทำได้โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเคลือบพื้นผิวให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาไม่กี่วันเซลล์เกิดการรวมกลุ่มขนาดเล็กและเพิ่มจำนวนกลายเป็นสเฟียรอยดัดที่มีปริมาณเซลล์ทับถมกันมาก แล้วจึงทำการ

ย้ายสเฟียรอยด์ไปยังพื้นผิวที่ปกคลุมด้วยเจล (Agar) และเพาะเลี้ยงต่อในระยะเวลาที่นานมากขึ้น [Metzger และคณะ 2011]

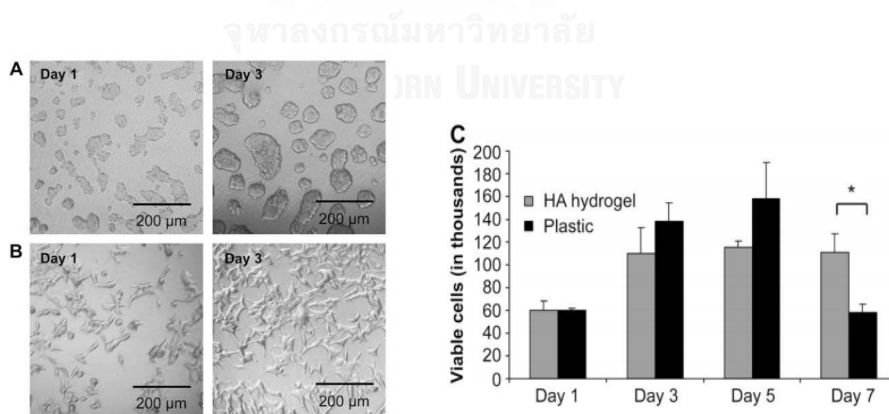
Jianming, L. และคณะ (2012) รายงานผลการศึกษาการรวมกลุ่มตัวของเซลล์เป็นรูปคล้ายสเฟียรอยด์ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Gastric cancer cell line, MKN-45) ทำโดยนำเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารมาเพาะเลี้ยงให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ผสมกับ 10% Fetal bovine serum เพาะเลี้ยงใน flask ชนิด T-75 เมื่อได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอแล้วจึงทำการเปลี่ยนมาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น RPMI-1640 ที่ประกอบไปด้วย 1% N-2, 2% B-27, 1% antibiotic mixture, 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของ FGF-2 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของ EGF ซึ่ง FGF และ EGF เป็นสารกระตุ้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Growth factor) โดย FGF-2 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างเซลล์ คอลลาเจน และ EGF เป็นโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ทำหน้าที่สร้างเซลล์ใหม่แทนที่เซลล์เก่าที่ถูกทำลาย การเติมสารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตจึงเป็นเหตุผลหนึ่งทำให้เซลล์ก่อตัวเป็นสเฟียรอยด์ได้ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน เซลล์เกิดการเกาะต่อกันเป็นสเฟียรอยด์มีขนาดของสเฟียรอยด์ประมาณ 100 ไมโครเมตร และมีปริมาณเซลล์ประมาณ  $1.2 \times 10^4$  เซลล์ (รูปที่ 2.15) จากการศึกษาพบว่าผลของการเติมสารกระตุ้นมีผลต่อการรวมกลุ่มกันของเซลล์เกิดเป็นรูปร่างคล้ายสเฟียรอยด์ [Jianming, L. และคณะ 2012]

#### 2.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์บนไฮโดรเจลที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ (Natural and Synthetic hydrogels)

ไฮโดรเจลเป็นพอลิเมอร์ชนิดไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic) ที่มีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติ สามารถผลิตได้จากวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ นอกจากนี้ไฮโดรเจลยังเป็นต้นแบบเนื้อเยื่อสามมิติที่ง่ายต่อการควบคุมความหนาแน่นของการเชื่อมต่อระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ได้ มีความยืดหยุ่นสามารถเลียนแบบเอ็กซตราเซลล์ลูลาเมตริกซ์ได้ (Extracellular matrix, ECM) ข้อดีของการใช้ไฮโดรเจลในการเพาะเลี้ยงแบบสามมิติคือมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษากลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration) เนื่องจากไฮโดรเจลเป็นพอลิเมอร์ที่มีความยืดหยุ่น มีรูพรุนเหมาะสมสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติได้



Gurski L.A. และคณะ (2009) ได้รายงานผลการพัฒนาระบบการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติไฮโดรเจลที่เตรียมจากกรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid) ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer cells, C4-24) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการหาปริมาณยาต่ออกซีทาเซล (Docetaxel) และราพามัยซิน (Rapamycin) โดยใช้เซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^5$  เซลล์ ใน 24 well plate จากการศึกษ้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่า เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในไฮโดรเจลที่เตรียมจากกรดไฮยาลูรอนิก หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน (รูปที่ 2.15c) เซลล์เกิดการรวมกลุ่มบนไฮโดรเจลมากกว่า 2 เท่า (ประมาณ  $12 \times 10^5$  เซลล์) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุมที่ไม่มีไฮโดรเจล เมื่อศึกษาร้อยละการตายของเซลล์ (Dead cells) พบว่าที่ระยะเวลา 7 วัน ของเพาะเลี้ยงเซลล์บนไฮโดรเจลมีอัตราการตายน้อยกว่าเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุมหรือแบบสองมิติ มีค่าเท่ากับ 15% และ 24% ตามลำดับ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ 5 วัน เซลล์เริ่มหนาแน่นและหลุดจากจานเพาะเลี้ยงและมีอัตราการยึดเกาะที่ต่ำ ซึ่งมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจลคือเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งเวลา 5 วันหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ  $12.63 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง ค่า PDT เท่ากับ 54.89 ชั่วโมง กล่าวได้ว่าไฮโดรเจลเป็นวัสดุที่สามารถใช้เป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติได้ [Gurski L.A. และคณะ 2009]



รูปที่ 2.14 ภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ C4-24 จากกล้องจุลทรรศน์ (A) เพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติ (B) เพาะเลี้ยงบนไฮโดรเจล (C) แผนภูมิแสดงจำนวนเซลล์ [Gurski L.A. และคณะ 2009]

### 2.4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์บนวัสดุของแข็งที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ (Natural and Synthetic solid materials)

การประยุกต์ใช้โครงเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือวัสดุของแข็งในการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติเป็นอีกวิธีที่ได้รับความสนใจนำมาเป็นแบบจำลองการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อสามมิติ วัสดุที่นำมาผลิตเป็นโครงเลี้ยงเนื้อเยื่อมีทั้งที่มาจากธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ โดยข้อดีของวัสดุจากธรรมชาติคือสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพ และข้อดีของวัสดุสังเคราะห์คือมีความแข็งแรง สามารถออกแบบรูปร่างและสมบัติเชิงกลได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติสามารถนำทั้งสองวัสดุมาประยุกต์ใช้ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์แต่ละชนิดที่นำมาใช้ ข้อดีของการใช้วัสดุของแข็งมาเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติคือ มีโครงร่างที่เป็นสามมิติ สามารถเลียนแบบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เป็นที่อยู่ของเซลล์ เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ และสามารถศึกษาการปฏิสัมพันธ์ของเซลล์กับเซลล์และเซลล์กับเมตริกซ์เพื่อศึกษากลไกการทำงานของเซลล์ได้เป็นอย่างดี

Zhu, X.H. และคณะ (2007) ได้การศึกษการพัฒนาาระบบเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยใช้โครงเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุภาคไมโครที่เตรียมจากพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) ด้วยเทคนิคการขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันในน้ำ (w/o/w emulsion) เพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อตับ โดยเปรียบเทียบขนาดของอนุภาคไมโคร ซึ่งทำการปั่นกวนด้วยเครื่อง Homogenizer เป็นเวลา 15 นาที ที่ความเร็วรอบ 16,000, 19,000 และ 22,000 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้ขนาดของอนุภาค 3 ขนาดคือ  $361.8 \pm 40.1$  (M<sub>3</sub>),  $242.25 \pm 38.2$  (M<sub>2</sub>) และ  $153.2 \pm 31.6$  (M<sub>1</sub>) ไมโครเมตร ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าลักษณะพื้นผิวของอนุภาคไมโครมีลักษณะขรุขระและมีรูพรุน เมื่อศึกษาจากภาพตัดขวางอนุภาคหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่า ภายในอนุภาคมีความเป็นรูพรุนและมีขนาดรูพรุนประมาณ 10 – 20 ไมโครเมตร และเมื่อนำอนุภาคไมโครมาทำการทดสอบอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (Liver cell, HepG<sub>2</sub>) โดยจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิกรัมของอนุภาคไมโคร หลังจากเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการยึดเกาะของเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue พบว่า ขนาดของอนุภาคไมโครมีผลต่อการยึดเกาะเซลล์ ซึ่งอนุภาคไมโครที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ 153.2 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะสูงที่สุดประมาณร้อยละ 28 และร้อยละการ

ยึดเกาะของเซลล์มีอัตราการลดลงเมื่อเพิ่มขนาดของอนุภาค เนื่องจากเซลล์มะเร็งระดับมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 – 20 ไมโครเมตร ซึ่งเซลล์มีขนาดเล็กทำให้การปฏิสัมพันธ์กันระหว่างเซลล์กับเซลล์ช้า หลังเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน พบว่า ขนาดอนุภาคไมโครที่เล็กที่สุดมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเช่นกัน โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) มีค่าเท่ากับ  $8.87 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time, PDT) เท่ากับ 78.09 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เซลล์เกิดการทับถมกันหลายชั้น (Multilayer cells) เซลล์เกิดการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างเซลล์เกิดการรวมตัวกันขึ้น (aggregation) จึงสรุปได้ว่า อนุภาคไมโครที่เตรียมจากพอลิไฮดรอกซีบีวทีเรตโคไฮดรอกซีวาลอเรตสามารถนำไปใช้เป็นวัสดุสำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ [Zhu, X.H. และคณะ 2007]

Zhang, Y. และคณะ (2010) ได้พัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติของอนุภาคไมโครที่เตรียมจากพอลิเมอร์ 2 ชนิดคือ poly(caprolactone) (PCL) homopolymer และ poly(3-caprolactone-b-ethyleneoxide) (PCL-b-PEO) amphiphilic block copolymer โดยใช้เทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำมันในน้ำ (w/o/w emulsion) จากการศึกษาพบว่า ขนาดของอนุภาคไมโครอยู่ระหว่าง 100 – 150 ไมโครเมตร พื้นผิวของอนุภาคไมโครที่เตรียมด้วย PCL มีลักษณะพื้นผิวเรียบไม่มีรูพรุน ในขณะที่อนุภาคไมโครที่เตรียมด้วย PCL-P-PEO มีลักษณะพื้นผิวหยาบและขรุขระทั่วทั้งอนุภาค นอกจากนี้ได้ทำการปรับปรุงเคมีพื้นผิว (Surface chemistry) ด้วยเอนไซม์ lipase เพื่อส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ ส่งผลให้พันธะเอสเทอร์ของสายโซ่พอลิเมอร์เกิดการสลายตัวออกเป็นหมู่คาร์บอกซิล และไฮดรอกซิล หลังการปรับปรุงพื้นผิวอนุภาคไมโครที่ได้ของทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะของพื้นผิวที่ขรุขระมากขึ้น เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระดูก (Human osteosarcoma cells, MG-63) โดยใช้เซลล์เริ่มต้นจำนวน  $5.0 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ใน 24-well plate ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วย MTT Assay พบว่า เซลล์สามารถเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโครได้ทั้งก่อนและหลังการปรับปรุงพื้นผิว แสดงร้อยละการเจริญเติบโตมากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษอยู่ในระดับ 0 – 1 ผลคืออนุภาคไมโครไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากการศึกษาพฤติกรรมการเจริญเติบโตของเซลล์จากภาพโครงสร้างพื้นฐานทั้งก่อนและหลังการปรับปรุงด้วยเอนไซม์ พบว่าพฤติกรรมการเจริญเติบโตของเซลล์มี

ลักษณะที่แตกต่างกัน ผลเนื่องมาจากคุณสมบัติพื้นผิวที่ต่างกัน และเซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ PCL-b-PEO ได้ดีกว่า PCL ทั้งก่อนและหลังการดัดแปรพื้นผิวโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ( $\mu$ ) มีค่าเท่ากับ  $4.15 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time, PDT) เท่ากับ 167 ชั่วโมง [Zhang Y. และคณะ 2010]

Verma S. และคณะ (2010) ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยใช้โครงเนื้อเยื่ออนุภาคไมโครที่ผลิตจากพอลิแลคติกไกลโกลิคแอซิด (Poly Lactic-co-Glycolic Acid , PLGA) ที่สัดส่วน 50:50 ด้วยเทคนิคการเตรียมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (o/w emulsion) เพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมกระดูก โดยทำการดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคไมโครที่ผลิตจาก PLGA ด้วยโปรตีนชนิด P15 (P15-peptide ; GTPGPQGIAGQRGVV) เพื่อส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่า ขนาดของอนุภาคไมโคร  $102.74 \pm 12.38$  ไมโครเมตร คิดเป็นผลได้ร้อยละ 90 จากการขึ้นรูปและวิเคราะห์สมบัติความชอบน้ำ ซึ่งวิเคราะห์ได้จากค่ามุมสัมผัสของน้ำ (Water contact angle) พบว่าองศาของค่ามุมสัมผัสมีค่าลดลงเมื่อดัดแปรพื้นผิวของฟิล์ม PLGA ด้วยโปรตีนชนิด P15 จาก  $65.93 \pm 1.09^\circ$  เป็น  $57.21 \pm 2.15^\circ$  เพื่อเพิ่มความชอบน้ำให้แก่วัสดุ สำหรับการวิเคราะห์ความขรุขระบนพื้นผิวด้วย (Surface roughness) พบว่าค่า Ra มีค่าเพิ่มขึ้นจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic force microscopy (AFM) และเมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระดูกของหนู (Osteoblast like cells, MG-63) พบว่าประสิทธิภาพของเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่เลี้ยงบนอนุภาคไมโครที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยโปรตีนชนิด P15 มีจำนวนเซลล์สูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปรพื้นผิว เนื่องจากโปรตีนชนิด P15 มีความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์และลดระดับการตายของเซลล์ได้ (Apoptosis) นอกจากนี้การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลคาลีนฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase activity, ALP) และปริมาณของ Osteopontin ที่บ่งบอกถึงการงอกใหม่ของกระดูก พบว่าอนุภาคไมโครที่ผ่านการดัดแปรด้วยมีค่า ALP และปริมาณของ Osteopontin สูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครที่ไม่ได้ดัดแปรพื้นผิวและเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.6 และ 26 เท่าตามลำดับ จากผลที่กล่าวมาจึงสรุปได้ว่าอนุภาคไมโครที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวด้วยโปรตีนชนิด P15

สามารถส่งเสริมการยึดเกาะการเจริญเติบโต และสามารถนำอนุภาคไมโครไปประยุกต์ใช้งานโดยการฉีดผ่านเพื่อการเติมเต็มช่องว่างของกระดูกได้

Hayashi, K. และ Tabata, Y (2011) ได้ศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยใช้มีอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาติน โดยใช้เทคนิคการเตรียมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) และผ่านเชื่อมขวางพันธะโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลของการรวมกลุ่มของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (rat bone marrow-derived stem cells, MSC) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ โดยเปรียบเทียบขนาดของอนุภาคไมโครขนาดต่างๆ ( $17.6 \pm 7.4$ ,  $47.9 \pm 22.2$  และ  $106.8 \pm 17.8$  ไมโครเมตร) จำนวนของอนุภาคไมโคร (0-1000 อนุภาค) และการเพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยง 2 แบบ คือ แบบพื้นเรียบ (plate-bottom) และแบบพื้นกลม (U-bottom) จากผลการศึกษาพบว่าจำนวนของอนุภาคไมโคร ( $1 \times 10^4$  อนุภาค) และขนาดของอนุภาค  $106.8 \pm 17.8$  ไมโครเมตร มีอัตราการเจริญเติบโตสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนอนุภาคและขนาดอนุภาคอื่นๆ เนื่องจากจำนวนของอนุภาคที่มากเกินไปเซลล์ไม่สามารถเกิดการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ได้จึงไม่เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงแบบก้นกลมด้วยจำนวนอนุภาค  $1 \times 10^4$  อนุภาค และขนาดของอนุภาค  $106.8 \pm 17.8$  ไมโครเมตรทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ได้ เซลล์ได้รับสารอาหารและออกซิเจนเพียงพอส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ  $20.27 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time, PDT) เท่ากับ 34.02 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาระบบการเมทาบอลิซึมของเซลล์พบว่า การรวมกลุ่มของเซลล์ที่ประกอบด้วยอนุภาคเจลาติน มีปริมาณการถูกใช้ไปมากกว่าและปริมาณของกรดแลคติกที่ผลิตได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการรวมกลุ่มของเซลล์ที่ไม่มีอนุภาค แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ที่ประกอบด้วยอนุภาคไมโครเจลาตินทำให้เซลล์ได้รับอาหารและอากาศเพียงพอให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง และเมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) พบว่าการเพิ่มจำนวนของอนุภาคไมโครในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์สามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ [Hayashi, K. และ Tabata, Y. 2011]

Tajima, S. และ Tabata, Y (2012) ได้ศึกษาพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยการนำอนุภาคไมโครจากเจลาติน ด้วยเทคนิคการเตรียมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) และผ่านการเชื่อมขวางพันธะโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส มาทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง 6-288 ชั่วโมง ขนาดอนุภาคไมโครอยู่ระหว่าง 20 – 50 ไมโครเมตร จากผลการทดสอบอัตราการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกในเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นเท่ากับ 288 ชั่วโมง ส่งผลให้มีอัตราการย่อยสลายช้าที่สุดสำหรับการทดสอบกับเซลล์กระดูกของหนู (mouse preosteoblast cell line, MC3T3-E1) พบว่าเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครด้วยความหนาแน่น  $1 \times 10^3$  เซลล์/หลุม เป็นเวลา 21 วัน พบว่าอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางที่เวลา 6, 18, 48 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มเวลาในการเพาะเลี้ยง ขนาดของเซลล์ที่เกิดการรวมกลุ่มกันจะมีขนาดเล็กลง ในขณะที่อนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางเป็นเวลา 192 ชั่วโมง เซลล์เกิดการรวมกลุ่มกันมีขนาดใหญ่สุด มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด  $\mu = 4.67 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time, PDT) เท่ากับ 148.39 ชั่วโมง เมื่อศึกษาผลของกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์พบว่า อัตราส่วนระหว่างปริมาณของกรดแลคติกที่ผลิตได้ต่อปริมาณของกลูโคสที่ถูกใช้ไปของอนุภาคไมโครที่ผ่านการเชื่อมขวาง 18 – 288 ชั่วโมง มีค่าต่ำอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการรวมกลุ่มของเซลล์ที่ไม่มีอนุภาคไมโคร เมื่อพิจารณาค่า alkaline phosphatase activity และสัดส่วนของแคลเซียม เวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ค่า ALP และปริมาณแคลเซียมมีสัดส่วนการเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางเป็นเวลา 192 ชั่วโมงมีค่า ALP เท่ากับ  $5 \times 10^{-7}$  IU/เซลล์ และปริมาณแคลเซียมเท่ากับ  $3.4 \times 10^{-7}$  มิลลิกรัม/เซลล์ ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุด ทั้งนี้จึงสรุปได้ว่า เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก [Tajima, S. และ Tabata, Y 2012]

Zhang T. และคณะ (2014) ได้พัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ โดยการใช้อนุภาคไมโครที่ผลิตจากพอลิแลคติกไกลโกลิคแอซิด (Poly Lactic-co-Glycolic Acid , PLGA) ที่มีพื้นผิวเรียบและขรุขระ และมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน (20 และ 50 กิโลดาลตัน) ด้วยสัดส่วนของ LG : GA แตกต่างกันได้แก่ 50 : 50, 65 : 35 และ 75 : 25 โดยใช้เทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำ (Oil in water emulsion) โดยมีขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 132 – 156 ไมโครเมตร นอกจากนี้มีการปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคไมโครด้วยการเคลือบคอลลาเจน(I) เพื่อส่งเสริมการยึดเกาะและการ

เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด H08910 เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์เริ่มต้น  $3 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ในจานบนเลี้ยงแบบ 24 หลุม จากการศึกษาหลังเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคไมโครที่มีพื้นผิวขรุขระได้ดีกว่าอนุภาคไมโครที่มีพื้นผิวเรียบ ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวที่วัดเท่ากับ  $5.73 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง และ 120.9 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายด้วยการย้อมสี FDA (เซลล์เป็น) และ PI (เซลล์ตาย) และการแสดงออกของยีนส์ E-cadherin ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ยึดโครงสร้างของเซลล์เข้าด้วยกัน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fluorescent intensity พบว่า อนุภาคไมโครที่ถูกปรับปรุงพื้นผิวด้วยคอลลาเจน เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่าอนุภาคที่ไม่ถูกปรับปรุงพื้นผิว โดยวิเคราะห์จากการแสดงออกของยีนส์ E-cadherin เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ ซึ่งไม่พบการแสดงออกของยีนส์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติไม่มีการสื่อสารกับเซลล์อื่นๆ และ ECM ที่เป็นข้อจำกัดของการแสดงออกของเส้นใยโปรตีนที่แสดงโครงร่างของเซลล์ด้วย E-cadherin

จากรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโครสามารถสรุปได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ได้แก่ วัสดุที่เลือกใช้ พื้นผิวของวัสดุ การย่อยสลายของวัสดุ ขนาดของอนุภาคไมโคร กล่าวคือ วัสดุที่มีความชอบน้ำสูง (Hydrophilic) สามารถช่วยส่งเสริมการยึดเกาะ การแผ่ขยายตัวของเซลล์ รวมถึงมีการจัดเรียงตัวของ Cytoskeleton ได้ดีกว่าวัสดุที่มีความชอบน้ำต่ำ นอกจากนี้พื้นผิวที่ขรุขระ มีส่วนสำคัญในการยึดเกาะของเซลล์เนื่องจากการลดแรงต้านทานการไหลของอาหาร ช่วยให้เซลล์มีอัตราการยึดเกาะที่สูงขึ้น ในขณะเดียวกันการย่อยสลายเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลให้เซลล์เกิดการรวมกลุ่มกันเนื่องจากทำให้เกิดการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ได้เร็วขึ้น (cell-cell interaction) จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ปัจจัยที่มีผลมากที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครคือขนาดของอนุภาคไมโคร กล่าวคือ การเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาดใหญ่ การปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์เกิดได้ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาดเล็กไม่ว่าจะเป็นเซลล์ชนิดใดก็ตาม เนื่องพื้นที่ผิวมากทำให้เกิดระยะ lag phase นานส่งผลให้มีระยะ log phase ที่สั้น เซลล์เข้าสู่กระบวนการ stationary phase และ dead phase เร็ว จึงไม่ก่อให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติบนอนุภาคไมโครจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมที่มีต่อการเจริญเติบโตและการเลือกวัสดุที่เหมาะสมและส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโต

ตารางที่ 2.9 สรุปงานวิจัยที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครนอก ร่างกาย (In Vitro)

วัสดุที่ขึ้นรูป	ขนาดอนุภาค (ไมโครเมตร)	เซลล์/สัตว์ทดลอง	การทดลอง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ )	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT)	อ้างอิง
poly lactic-co-glycolic acid, PLGA และ poly lactic acid, PLA)	150 – 170	เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer Cells, MCF-7)	ความหนาแน่นของเซลล์ $0.25 \times 10^6$ cell/well ใน 6 well plate นับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะด้วย Haemocytometer	$\mu = 14.78 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง	46.87 ชั่วโมง	Sahoo, S.K. และคณะ 2005
poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV	153.2, 242.5 และ 361.8	เซลล์มะเร็งตับ (Liver cell, HepG2)	ความหนาแน่นของเซลล์ $2.5 \times 10^4$ cell/ml ใน 24 well plate นับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะด้วยการย้อมสี Trypan blue	$\mu = 8.87 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง	78.09 ชั่วโมง	Zhu, X.H. และคณะ 2006
poly lactic-co-glycolic acid, PLGA	$393 \pm 5$	เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer Cells, MCF-7)	ความหนาแน่นของเซลล์ $5 \times 10^5$ cell/ml ใน spinner flask วิเคราะห์ผลเกาะยึดเกาะของเซลล์ด้วยการย้อม Hematoxylin	$\mu = 6.75 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง	102.7 ชั่วโมง	Kang, S. W. และคณะ 2009



ตารางที่ 2.9 สรุปงานวิจัยที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครนอกร่างกาย (*In Vitro*) (ต่อ)

วัสดุที่ใช้ขึ้นรูป	ขนาดอนุภาค (ไมโครเมตร)	เซลล์/สเต็มเซลล์	การทดลอง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ( $\mu$ )	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT)	อ้างอิง
PCLและ PCL-b-PEO	100 – 150	เซลล์มะเร็งกระดูก (Human osteosarcoma cells , MG-63)	ความหนาแน่นของเซลล์ $5 \times 10^4$ cell/ml ใน 24 well plate ทดสอบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay	$\mu = 4.15 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง	167 ชั่วโมง	Zhang Y. และคณะ 2010
เจลาติน	17.6±7.4, 47.9±22.2 และ 106.8 ±17.8	เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (rat bone marrow-derived stem cells, MSC)	ความหนาแน่นของเซลล์ $1 \times 10^4$ cell/well ใน 96 well plate ทดสอบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วย การย้อมสี crystal violet	$\mu = 20.27 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง	34.02 ชั่วโมง	Hayashi, K. และ Tabata, Y. 2011
เจลาติน	20 – 50	เซลล์กระดูกของหนู (MC3T3-E1)	ความหนาแน่นของเซลล์ $2 \times 10^4$ cell/well ใน 96 well plate ทดสอบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วย การย้อมสี crystal violet	$\mu = 4.67 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง	148.39 ชั่วโมง	Tajima, S. และ Tabata, Y 2012

## 2.5 ประเภทของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อถือเป็นกระบวนการเริ่มต้นของการทดสอบวัสดุหรือโครงสร้างเซลล์เพื่อทดสอบความสามารถของวัสดุในการเหนี่ยวนำให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถแบ่งประเภทของเซลล์ได้ 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่

1. เซลล์ขั้นปฐมภูมิ (Primary cells) เป็นเซลล์ที่แยกจากสิ่งมีชีวิตหรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตได้โดยตรง เช่น เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs) ข้อดีของเซลล์ชนิดนี้คือ มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกประการ และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่นได้ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยง องค์ประกอบของเนื้อเยื่อนอกเซลล์ (Extracellular matrix) แต่ข้อเสียคือเลี้ยงได้ไม่นานนัก เนื่องจากเซลล์จะมีกระบวนการแก่ชราและตายไปในที่สุด

2. เซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (Continuous cell line) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติแบ่งตัวได้ไม่สิ้นสุด จึงสามารถเลี้ยงต่อไปได้เรื่อยๆและได้รับการปรับปรุงมาจากเซลล์ขั้นปฐมภูมิ เช่น เซลล์มะเร็ง (cancer cell) mouse fibroblast cell (L929) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีการนำเซลล์ประเภทนี้มาทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย แต่ข้อจำกัดของเซลล์ชนิดนี้คือ เซลล์อาจมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเซลล์ปกติเล็กน้อย ซึ่งโดยมากมักใช้ศึกษากระบวนการพื้นฐานทั่วไปเบื้องต้นของเซลล์ เช่น การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุกับเซลล์ [Gstraunthaler, G., 2003]

## 2.6 เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cell line, MCF-7)

เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cell line) เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 ได้จากการแยกเนื้อเยื่อของเต้านมที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมของผู้ป่วยผู้หญิงอายุ 69 ปี เซลล์ MCF-7 ส่วนใหญ่จะถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นเซลล์ไลน์ที่สามารถแบ่งตัวและเลี้ยงต่อไปได้เรื่อยๆอย่างไม่มีที่สิ้นสุด อีกทั้งยังคงรักษารูปร่างไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์เดิม ความสามารถของเซลล์ MCF-7 ในฮอร์โมนเพศหญิงหรือเอสโตรเจนจะอยู่ในรูปของเอสตราไดโอล (estradiol) เซลล์ MCF-7 จะมีความไวต่อไฮโดรโคเรตินเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการเซลล์จะมีรวมตัวกันในลักษณะโคงคล้ายโดมหรือลักษณะคล้าย

เซลล์เยื่อผิวในการเพาะเลี้ยงแบบ monolayer การเจริญเติบโตของเซลล์สามารถยับยั้งได้โดยใช้ tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ และ การใช้ยากลุ่ม anti-estrogen ยาที่สำคัญที่ได้รับการใช้อย่างแพร่หลายในกลุ่มนี้ คือ tamoxifen ยาชนิดนี้ออกฤทธิ์โดยการแย่งจับกับตัวรับสัญญาณของเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้นจึงนิยมนำเซลล์ MCF-7 มาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และทางด้านเภสัชกรรมในระบบการนำส่งยาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7 ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's modified eagles medium) ผสมกับ 10% Fetal bovine serum แล้วนำไปเพาะเลี้ยงนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ปัมที่ความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ (5% CO<sub>2</sub>) เหมาะสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ [Dhiman H.K และคณะ 2005]

Sahoo, S.K. และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการขึ้นรูปอนุภาคไมโครจากวัสดุ 2 ชนิดคือ พอลิแลคติกโคไกลโกลิก แอซิด (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) และพอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid, PLA) โดยใช้เทคนิค Water/oil/water emulsion ขนาดของอนุภาคไมโครอยู่ระหว่าง 150 – 170 ไมโครเมตร และทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer Cells, MCF-7) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเพาะเซลล์มะเร็งเต้านมลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยความหนาแน่น  $1 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิกรัม ใน 6-well plate ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน จากนั้นประเมินอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate,  $\mu$ ) โดยวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer มีค่าเท่ากับ  $1.32 \times 10^{-2}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณหรือระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population Doubling Time, PDT) มีค่าเท่ากับ 100.6 ชั่วโมง และเซลล์มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคไมโคร หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วันเซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่ม ดังนั้นอนุภาคไมโครจึงเป็นวัสดุชีวภาพที่ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติได้ [Sahoo, S.K. และคณะ 2005]

Kang, S. W. และคณะ (2009) ศึกษาอนุภาคไมโครที่เตรียมที่จากพอลิแลคติกโคไกลโกลิก แอซิด (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) ขนาดอนุภาคไมโครอยู่ระหว่าง  $393 \pm 5$

ไมโครเมตร ขนาดรูพรุนของอนุภาค  $38 \pm 7$  ไมโครเมตร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก คือ การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*In Vitro*) ศึกษาการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer Cells, MCF-7) บนอนุภาคไมโครในการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบปั่นกววน (Spinner flask) พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน เซลล์มีการยึดเกาะบนอนุภาคไมโคร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ  $1.129 \times 10^{-2}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time, PDT) เท่ากับ 61.4 ชั่วโมง และก่อตัวคล้ายเนื้อเยื่อมะเร็งโดยดูจากการย้อมสี H&E ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษาการมีชีวิตอยู่ของเซลล์โดยใช้ยา doxorubicin (ความเข้มข้นของยาที่ใช้ 0-7000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาส่งผลให้เซลล์มีการตายมากขึ้น ดังนั้น doxorubicin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดี สำหรับส่วนที่สอง คือ การทดลองในระดับสัตว์ทดลอง โดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเต้านมและอนุภาคไมโครลงในหนูชนิดไม่ช้ำ 5 ตัวเป็นเวลา 3 เดือน ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครพบก้อนมะเร็ง 4 ใน 5 ตัว และการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติพบก้อนมะเร็ง 1 ใน 5 ตัว จึงกล่าวได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครสามารถส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโต และยังสามารถใช้แม่แบบในการศึกษาในสัตว์ทดลองได้ [Kang, S. W. และคณะ 2009]

## 2.7 การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity Assay)

เป็นที่ทราบกันดีว่ายารักษาโรคมะเร็งมีผลกระทบต่อหลากหลายของยาต่อผู้ป่วย ด้วยส่วนใหญ่มักส่งผลในแง่ลบอย่างรุนแรงเนื่องจากมีความเป็นพิษสูง นอกจากนี้ในการรักษามักใช้ตัวยาหลายชนิดที่มีกลไกทำลายเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกันร่วมกันในการรักษา กลไกที่หลากหลายนี้สามารถส่งผลข้างเคียงร้ายแรงต่อผู้ป่วยจนนำไปสู่การเสียชีวิต อย่างไรก็ตามหากแพทย์สามารถคาดการณ์หาปริมาณยาที่เหมาะสมเพื่อให้ใช้ยาได้มากที่สุดแต่ส่งผลน้อยสุดต่อผู้ป่วย ก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการรักษาโดยรวมมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

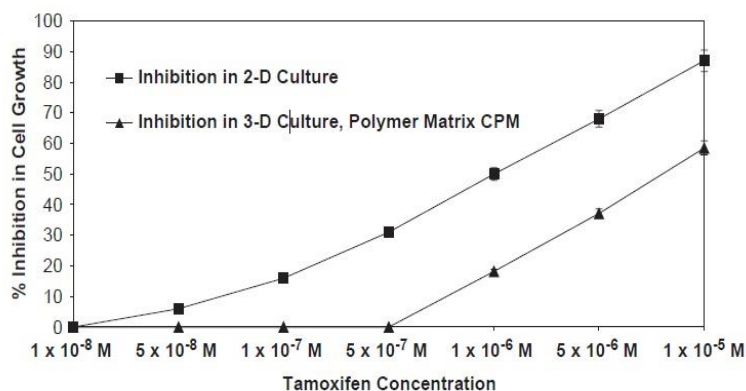
การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งเริ่มต้นจากศึกษาในทางคลินิก Cortazar และ Johnson (1999) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด โดยทำการทดสอบความไวของยารักษามะเร็งกับผู้ป่วยมะเร็งจำนวน 500 คน โดยการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อหรือสารคัดหลั่งของผู้ป่วยนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์มะเร็งในห้องทดลอง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยแต่ละรายมาทดสอบกับยาหรือกลุ่มของยาชนิด ในระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนที่จะติดตามอัตราการตายหรือการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย หากยาใดส่งผลให้เซลล์มะเร็งของผู้ป่วยตาย แสดงว่ายานั้นมีแนวโน้มที่ดีในการนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วย ในทางตรงกันข้ามหากยาใดไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง แสดงว่าไม่ควรใช้ยานั้นในการรักษาผู้ป่วย ซึ่งทำการเปรียบเทียบกับการรักษาแบบสุ่ม พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับการทดสอบความไวของยาที่นำมาใช้จะมีระยะเวลาอยู่รอดสูงขึ้นเนื่องจากได้รับยาที่เข้ากันได้กับร่างกายผู้ป่วย ขั้นตอนการติดตามผลอัตราการตายหรือการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งถูกประเมินโดยการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay หรือ (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay [Cortazar และ Johnson 1999]

#### ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการทดสอบไวต่อยาในระดับห้องปฏิบัติการ

Kijima I. และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลการทดสอบความไวต่อยาทาม็อกซิเฟนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด MCF-7 และ T-47D ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมสองชนิดนี้เป็นเซลล์ที่มีตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนเป็นบวกและมีการแสดงออกของเอนไซม์อะโรมาเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ในเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์ไขมัน และเซลล์กล้ามเนื้อ โดยทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้ง 2 วิธี ได้แก่ ผลการยับยั้งจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสองมิติหรือแบบระนาบเดียวบนจานเพาะเลี้ยง (Monolayer) เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $5 \times 10^4$  เซลล์ ในขวดเพาะเลี้ยงชนิด T-25 เป็นเวลา 3 วันด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Phenol red-free medium ที่ประกอบด้วย 10%FBS จากนั้นเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 วัน จึงเติมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ (200-1000 นาโนโมลาร์) เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 วันและวิเคราะห์โปรตีนของเซลล์ด้วยวิธี Bradford จากการศึกษาพบว่า ทาม็อกซิเฟนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองชนิดได้ โดยเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด T-47D มีความไวต่อทาม็อกซิเฟนมากกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

ซึ่งเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1000 นาโนโมลาร์ ส่วนการเพาะเลี้ยงอีกวิธีคือ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสเฟียรอยด์ (Spheroid) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดบน 15% agarose ที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 มิลลิเมตร ด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^6$  เซลล์เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นเติมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ (200-1000 นาโนโมลาร์) เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 7 วัน จากการศึกษาพบว่า ทาม็อกซิเฟนที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100-200 นาโนโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองชนิดที่เพาะเลี้ยงบนสเฟียรอยด์ได้ และยังพบอีกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่ได้รับทาม็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $IC_{50}$  เท่ากับ 200-1000 นาโนโมลาร์) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด T-47D เซลล์ชนิดนี้มีความไวต่อทาม็อกซิเฟนมากกว่า มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 100-500 นาโนโมลาร์ ซึ่งค่า  $IC_{50}$  เป็นค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายเป็นครึ่งหนึ่ง เมื่อทำการวิเคราะห์ทึ่กิจกรรมของเอนไซม์อะโรมาเตสที่อยู่ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Microsomal assay (วัดเพื่อหาปริมาณของเอนไซม์อะโรมาเตสที่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม) พบว่าความเข้มข้นต่างๆของทาม็อกซิเฟนไม่มีผลต่อการลดลงของปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [Kijima I. และคณะ (2005)]

Dhiman, H.K. และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างเซลล์สามมิติที่ผลิตจากโคโตซานพอลิเมอร์ ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer Cells, MCF-7) และทดสอบการยับยั้งการทำงานของเซลล์มะเร็งด้วยยา tamoxifen ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงสร้างเซลล์สามมิติ 2 มิลลิกรัมด้วยความหนาแน่นของเซลล์  $6 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิกรัม เมื่อศึกษาความเข้มข้นขนาดของยาที่ใช้ ( $1 \times 10^{-8}$  -  $1 \times 10^{-5}$  โมลาร์) พบว่า ความเข้มข้นของยา  $1 \times 10^{-5}$  โมลาร์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งถึง 59% (ดังรูปที่ 2.16) ที่เลี้ยงบนโครงสร้างเซลล์สามมิติโคโตซาน โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เลี้ยงบนโครงสร้างเซลล์สามมิติมีค่า  $\mu = 0.759 \times 10^{-2}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 91.3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติมีค่า  $\mu = 1.958 \times 10^{-2}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 35.4 ชั่วโมง [Dhiman, H.K. และคณะ 2005]

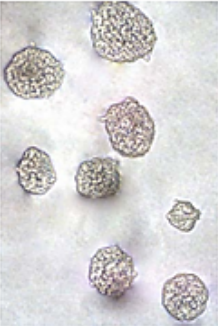
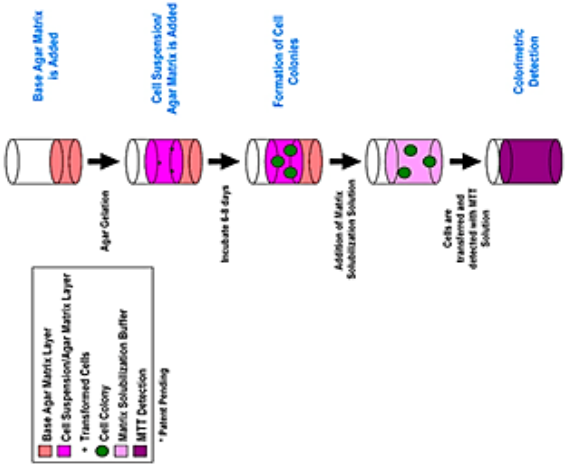


**รูปที่ 2.15** เปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ความเข้มข้นขนาดของยาที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ [Dhiman, H.K. และคณะ 2005]

### 2.7.1 การทดสอบความไวต่อยาที่มีในระบบการค้ำ

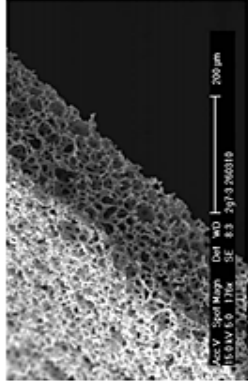

ในปัจจุบันมีการผลิตชุดทดสอบระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติเพื่อการตรวจสอบประสิทธิภาพยาในรูปแบบสามมิติในการประยุกต์ใช้งานด้านคลินิก ซึ่งวัสดุส่วนใหญ่ที่นำประยุกต์ใช้งานจะเป็นวัสดุที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์ เช่น วัสดุจากธรรมชาติ ได้แก่ แอลจินตเจลคอลลาเจน (Collagen gel) วัสดุสังเคราะห์ ได้แก่ โพลีสไตรีน (Polystyrene) เป็นต้น ตัวอย่างข้อมูลการทดสอบความไวต่อยาที่มีในระบบการค้ำ ดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.10 ข้อมูลการทดสอบความไวต่อยาที่มีในระบบการค้า (ต่อ)

ชื่อผลิตภัณฑ์	วัสดุที่ใช้เตรียม	ข้อมูล	ที่มา
<p>CytoSelect™ 96-Well In Vitro Tumor Sensitivity Assay</p>  <p>(บริษัท Cell Biolabs, Inc. สหรัฐอเมริกา, ราคา 670 USD)</p>	<p>ชุดทดสอบประกอบด้วย</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10X CytoSelect™ Agar Matrix Solution (หรือ เจลคอลลาเจน)</li> <li>- CytoSelect™ Matrix Diluent</li> <li>- 5X DMEM Solution</li> <li>- MTT Solution</li> </ul> <p>วัสดุเพิ่มเติม</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumor Cells (cancer cell line or cells prepared from solid tumor)</li> <li>- Anticancer Agents (e.g. Taxol, 5-Fluorouracil, anticancer mAb)</li> </ul>	 <p>- วัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (cell viability) ด้วย MTT assay วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร</p> <p>- ได้ผลการทดสอบภายในเวลา 6 – 8 วัน</p>	<p>Cell Biolabs, Inc. Available at URL: <a href="http://www.cellbiolabs.com/tumor-sensitivity-assay?">http://www.cellbiolabs.com/tumor-sensitivity-assay?</a></p>



ตารางที่ 2.10 ข้อมูลการทดสอบความไวต่อยาที่มีในระบบการค้า (ต่อ)

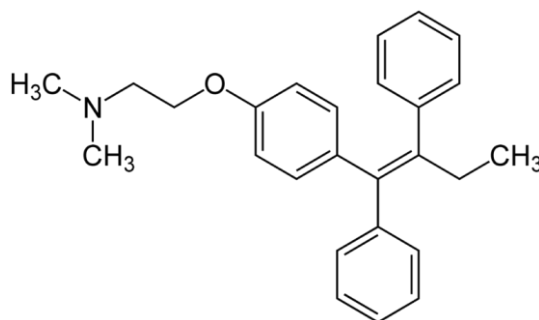
ชื่อผลิตภัณฑ์	วัสดุที่ใช้เตรียม	ข้อมูล	ที่มา
<p>Alvetex®Scaffold96</p>   <p>(บริษัท Reinnervate Ltd, อังกฤษ, ราคา 200 EUR)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ทำจากพอลิสไตรีน (Polystyrene)</li> <li>- มีความหนา 200 ไมโครเมตร</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้เป็นต้นแบบการทดสอบการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ</li> <li>- ขุดทดสอบความไวต่อยารักษา มะเร็งชนิดต่าง ในรูปแบบสามมิติ</li> <li>- สามารถศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ สูงสุด 21 วัน</li> <li>- วัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (cell viability) ด้วย MTT assay วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร</li> </ul>	<p>Reinnervate Available at URL: <a href="http://reinnervate.com/why-alvetex/what-is-alvetex/">http://reinnervate.com/why-alvetex/what-is-alvetex/</a></p>

## 2.8 ทาม็อกซิเฟน (Tamoxifen)

ทาม็อกซิเฟน (Tamoxifen) เป็นยาต้านฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไดฟีนิลเอทิลีน (Diphenylethylene) ที่มีสมบัติการละลายน้ำได้ [Gao S. และ Singh 1998] ทาม็อกซิเฟนเป็นยาที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการรักษามะเร็งเต้านมด้วยการฮอร์โมน ซึ่งสามารถใช้รักษาได้ทั้งผู้ป่วยระยะเริ่มต้นและลุกลามของมะเร็งและรักษาได้ทั้งผู้ป่วยวัยก่อนและหลังหมดประจำเดือนที่มีผลตอบสนองทางฮอร์โมนเป็นบวก (ER-positive breast cancer cells) คือผลที่ได้ถูกยับยั้งการเติบโตของเซลล์หรือโปรเจสโตรโรนมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 1 จากการตรวจทางพยาธิวิทยา [Quasar Collaborative, Group, 2007] นอกจากนี้ทาม็อกซิเฟนยังเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่ม Selective estrogen modulator (SERM) คือยาต้านฮอร์โมนที่ทำงานโดยขัดขวางการจับกันระหว่างเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจน

ทาม็อกซิเฟนมีลักษณะเป็นผงสีขาว มีชื่อเรียกตาม IUPAC คือ (Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine หรือทาม็อกซิเฟน ซิเตรท (Tamoxifen citrate) ชื่อการค้า โนวาเด็กซ์ (Nolvadex) ไบเลม (Bilem) สูตรโมเลกุลคือ  $C_{26}H_{29}NO$  และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 371.515 กรัมต่อโมล [Thomas, C. และคณะ 2011] โครงสร้างของทาม็อกซิเฟนแสดงดังรูปที่ 2.17

ทาม็อกซิเฟนมีค่าสมมูลของการละลายน้ำที่ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พีเอช 3 – 3.5 และสามารถละลายที่ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.02 N HCl ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และสามารถละลายได้เล็กน้อยในอะซิโตน [Pienta K.J. และคณะ 1995]



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของทาม็อกซิเฟน [Monteagudo E. และคณะ 2011]

### 2.8.1 สมบัติของทาม็อกซิเฟน

ทาม็อกซิเฟนถือเป็นยามาตรฐานที่ใช้กันมาเป็นระยะเวลานานในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพื่อลดการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งเต้านมภายหลังได้รับการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การผ่าตัดรังสีวิทยา ในงานด้านคลินิก และเภสัชกรรม โดยทาม็อกซิเฟนมีสมบัติเด่น ได้แก่

#### ก. ด้านเภสัชวิทยาและกลไกการออกฤทธิ์

ทาม็อกซิเฟนที่เข้าสู่ร่างกาย 50-80% จะถูกเมตาบอไลต์เป็น N-desmethyl tamoxifen ระดับยาในกระแสเลือดจะคงตัว (Steady state) หลังจากได้รับยาต่อเนื่องเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ยาส่วนใหญ่จะถูกขับออกทางอุจจาระอย่างช้าๆ และขับออกทางปัสสาวะเพียงเล็กน้อย ทาม็อกซิเฟนทั้งรูปเดิมและรูปเมตาบอไลต์จะออกฤทธิ์โดยไปแย่งที่กับเอสโตรเจน โดยในการจับกับ Cytoplasmic estrogen receptor (ER-alpha) ซึ่งตัวรับสัญญาณตัวนี้จะพบทั้งในเนื้อเยื่อของเต้านม มดลูก ช่องคลอด และเซลล์มะเร็งบางชนิดเซลล์มะเร็งเต้านมของแต่ละคนจะมีปริมาณตัวรับสัญญาณตัวนี้ไม่เท่ากัน กรณีมีตัวรับสัญญาณตัวนี้ positive 80% จึงสามารถให้ยาตัวนี้รักษาได้ เมื่อยาจับกับตัวรับสัญญาณแล้วก็จะไปยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มะเร็งทำให้เซลล์เกิด apoptosis [Thomas, C. และคณะ 2011]

#### ข. การต้านมะเร็งในการศึกษาทางคลินิก

จากการศึกษาขนาดของยาทาม็อกซิเฟนในการรักษาเสริม (Adjuvant Treatment) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่าการศึกษาแบบ meta-analysis มีการแนะนำให้ใช้ยาขนาด 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวต่อวัน โดยผลการศึกษายืนยันว่าการให้ยาแก่ผู้ป่วยขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 2 ครั้ง มีผลเทียบเท่ากับการให้ยา 20 มิลลิกรัม วันละครั้ง และไม่ผลทางคลินิกที่ยืนยันว่าขนาดยาที่มากกว่า 20 มิลลิกรัม ให้ผลที่ดีกว่า [Mondzac A.M. 1994] และจากการศึกษาของ Decensi A. และคณะ (2003) พบว่าการศึกษาแบบสุ่ม (Randomized trials) ในผู้ป่วยหญิงที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดที่มีตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนเป็นบวก จำนวน 120 คน โดยศึกษาผลของให้ยา 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 5, และ 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวต่อวัน วันละครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การให้ยาความเข้มข้นต่ำมีผลเช่นเดียวกับการให้ยาขนาดสูง อย่างไรก็ตาม การให้ยาความเข้มข้นต่ำให้ผลข้างเคียงที่น้อยกว่า แต่ไม่มีความแตกต่างของผลการรักษามะเร็งที่ลดลง และมีรายงานผลการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมนทาม็อกซิเฟนต่อการกลับมาเป็นซ้ำของโรคและ

อัตราการรอดชีวิตหลังจากติดตามผลการทดสอบเป็นเวลา 15 ปีของกลุ่ม Early Breast Cancer Trialists's Collaborative Group (EBCTCG) พบว่าในผู้ป่วยระยะต้นจำนวน 145,000 รายที่มีการให้ยา 20 มิลลิกรัมต่อวัน นาน 5 ปี ภายหลังจากผ่าตัดสำหรับผู้ป่วยที่มีตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนเป็นบวก สามารถลดอัตราการกลับมาเป็นซ้ำได้ต่อปีและอัตราการเสียชีวิตได้ร้อยละ 41 และ 31 ตามลำดับ และสามารถลดการเกิดมะเร็งเต้านมได้ถึงร้อยละ 50 [Hamilton A. และคณะ 2002]

## 2.9 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

สิทธิบัตรในไทย: สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นรูปอนุภาคไมโครจากเจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทยและการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโครยังไม่มีรายงาน

สิทธิบัตรต่างประเทศ :

1. United States Patent : US 20120187591 A1, Jul 26, 2012

เจ้าของสิทธิบัตร Wang X. and Kaplan D.L

ชื่อสิทธิบัตร Silk nanospheres and microspheres and methods of making same

การเตรียมอนุภาคนาโนและอนุภาคไมโครจากไหมสกุล *Bombyx mori* สายพันธุ์ญี่ปุ่น และขึ้นรูปแบบด้วยวิธีแยกวัฏภาคแบบ Phase separation เพื่อใช้ในงานด้านการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น การควบคุมการปลดปล่อยยา ทำได้โดยนำสารละลายไหมผสมกับสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการขึ้นรูป และศึกษาตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อขนาดและรูปร่างของอนุภาค เช่น ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ขึ้นรูป หลังจากการขึ้นรูปเสร็จนำสารผสมของไหมและ PVA ไปตากแห้ง จะได้เป็นฟิล์มไหมและ PVA จากนั้นนำฟิล์มไปละลายน้ำ ได้เป็นอนุภาคนาโนและอนุภาคไมโคร โดยอนุภาคนาโนที่ได้มีขนาดประมาณ 300 นาโนเมตร และอนุภาคไมโครมีขนาดประมาณ 2-440 ไมโครเมตร

### ข้อถือสิทธิ

- การขึ้นรูปสารละลายไหมผสมกับสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) หลังกระบวนการขึ้นรูปนำไปตากแห้งและนำไปละลายน้ำ

- ความเข้มข้นของสารละลายใหม่ร้อยละ 0.02-15 โดยน้ำหนัก เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาค ประมาณ 1 – 30 ไมโครเมตร
- ความเข้มข้นของสารละลายใหม่ในสารละลายผสมร้อยละ 0.2-5 โดยน้ำหนัก
- ตามข้อ 1 แล้วนำไปอนุภาคที่ได้ไปกรองหรือปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge หรือทำทั้งสองอย่าง เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กอยู่ในช่วงนาโน (330-500 นาโนเมตร) ถึงไมโคร (1-5 ไมโครเมตร)

2. United States Patent : US 7282220 B1, October 16, 2007

เจ้าของสิทธิบัตร Sung H.w et al

ชื่อสิทธิบัตร Genipin-crosslinked Gelatin Microspheres As Drug Carrier

การเตรียมอนุภาคไมโครเจลลาตินที่มีขนาดประมาณ 20 – 100 ไมโครเมตร ด้วยวิธี

emulsification-solvent-extraction และทำการเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสาร กลูตารัลดีไฮด์และสาร เจนินิน เพื่อควบคุมการปลดปล่อยยาในสัตว์ทดลอง เตรียมอนุภาคทำโดยนำเจลลาติน 2.5 กรัม ละลายใน 10 มิลลิลิตร ของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ในอ่างทำความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปั่นกวนเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้เกิดเป็นอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) จากนั้นลดอุณหภูมิลงเป็น 4 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว เพื่อให้เกิดเจล จากนั้นนำอนุภาคไมโครมา ล้างด้วยอะซิโตนและทำแห้ง แล้วนำมาเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.22 โมลาร์ และ เชื่อมขวางด้วยเจนินินที่ความเข้มข้น 0.44 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ร้อยละของการเชื่อม ขวางมากกว่า 60

ข้อถ้อยสิทธิ

- วิธีการขึ้นรูปเพื่อให้ได้ขนาดอนุภาค 20 – 100 ไมโครเมตร
- การขึ้นรูปด้วยวิธี emulsification-solvent-extraction

3. United States Patent : US 2012/0225483 A1, Sep. 6, 2012

เจ้าของสิทธิบัตร Tabata Y.

### ชื่อสิทธิบัตร Microsphere-Containing Cell Aggregate

การเตรียมอนุภาคไมโครเจลลาตินที่มีขนาดระหว่าง 20-100 ไมโครเมตร สำหรับการเลี้ยง เซลล์แบบสามมิติของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (rat bone marrow-derived stem cells, MSC) เพื่อให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตรวมกลุ่มกันของเซลล์แบบสามมิติได้ เนื่องจาก เซลล์ได้รับสารอาหารและออกซิเจนเพียงพอส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ทำการเตรียมอนุภาคด้วย วิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 200 – 600 รอบต่อนาที และเชื่อม ขวางด้วย 0.1% Tween 80 ที่ประกอบอยู่ในสารละลายที่ใช้เชื่อมขวาง และล้างสารตกค้างออก ทั้งนั้นสารละลายที่ใช้ล้างขึ้นกับสารที่ใช้เชื่อมขวาง จากนั้นนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งและทำให้ ปราศจากเชื้อก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู โดยใช้ อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ประกอบด้วย 10% FBS เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เซลล์เกิดการรวมกลุ่ม

### ข้อดีสิทธิ

- วิธีการด้วยวิธี w/o emulsion ขึ้นรูปเพื่อให้ได้ขนาดอนุภาค 20 – 100 ไมโครเมตร
- ความเข้มข้นของของแข็งรวม 1-20 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง 0.01-1 โดยน้ำหนัก
- การเพาะเลี้ยงเซลล์ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

ความแตกต่างของสิทธิบัตรและงานวิจัยนี้ ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของอนุภาค (พื้นผิว) ขนาดของอนุภาคเฉลี่ยที่มีขนาดใหญ่กว่า ผลของการเชื่อมขวางที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เซลล์ ที่ใช้สำหรับการทดลอง (เซลล์มะเร็ง) และส่วนที่คล้ายกัน เช่น วัสดุที่ใช้คือเจลลาติน ซึ่งเป็นที่ทราบกัน ดีว่า เจลลาตินมีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เป็นอย่างดี ทำให้ในหลายงานวิจัยนำเจลลาติน มาประยุกต์ใช้งาน นอกจากนี้ยังกล่าวถึงระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นแบบสามมิติที่มีลักษณะ คล้ายคลึงกัน แต่อย่างไรก็ตามอนุภาคไมโครถือเป็นทางเลือกที่ดีในการนำไปประยุกต์ใช้งานในด้าน ต่างๆได้ เช่น เป็นระบบนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์สำหรับการทดสอบนอกร่างกาย หรือสำหรับ ทดสอบความไวต่อยาในการรักษา (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็ง

### บทที่ 3

#### วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

##### 3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 ไหมไทย (พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1, สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา)
- 3.1.2 หนูวิสตา (เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์, ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล)
- 3.1.3 Acetone (SR Lab,Thailand)
- 3.1.3  $\beta$ -Alanine (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto , Japan)
- 3.1.5 Collagenase (191 units/mg, Fluka, USA)
- 3.1.6 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich,USA)
- 3.1.7 Dulbecco's modified eagle powder medium (D-MEM(s), Hyclone, USA)
- 3.1.8 Ethanol (99.7-100%, VWR International Ltd., United Kingdom)
- 3.1.9 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone or Biochrom or ICP)
- 3.1.10 Gelatin Type A (pl = 9, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- 3.1.11 Glutaraldehyde solution (25%, Fluka, Buchs, Germany)
- 3.1.12 Glycine (Sigma-Aldrich, Germany)
- 3.1.13 Hoechst 33258 (Sigma-Aldric, USA)
- 3.1.14 Hydrochloric acid (HCl, 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, USA)
- 3.1.15 Litiumbromide (LiBr, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany)
- 3.1.16 MEM/ALPHA minimum essential medium alpha modification (Hyclone, USA)
- 3.1.17 Penicillin-Streptomycin Solution (Pen/Strep, Hyclone, USA)
- 3.1.18 Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3-7.5, Bio basic Inc.)
- 3.1.19 Sodium azide (Labchem, APS, Australia)
- 3.1.20 Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; Ajax Finechem, Pty'Ltd, Australia)

- 3.1.21 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO<sub>3</sub> 99%, Fluka, Buchs, Germany)
- 3.1.22 Soybean oil (Cook, Thanakorn Vegetable Oil Products Co.,Ltd, Thailand)
- 3.1.23 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)
- 3.1.24 Tamoxifen (Mw 371.51 g/mol, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany)
- 3.1.25 Trypsin-EDTA (0.25% trypsin, Hyclone, Thermo Scientific, USA)
- 3.1.26 Zinc acetate (LOBA Chemie, India)

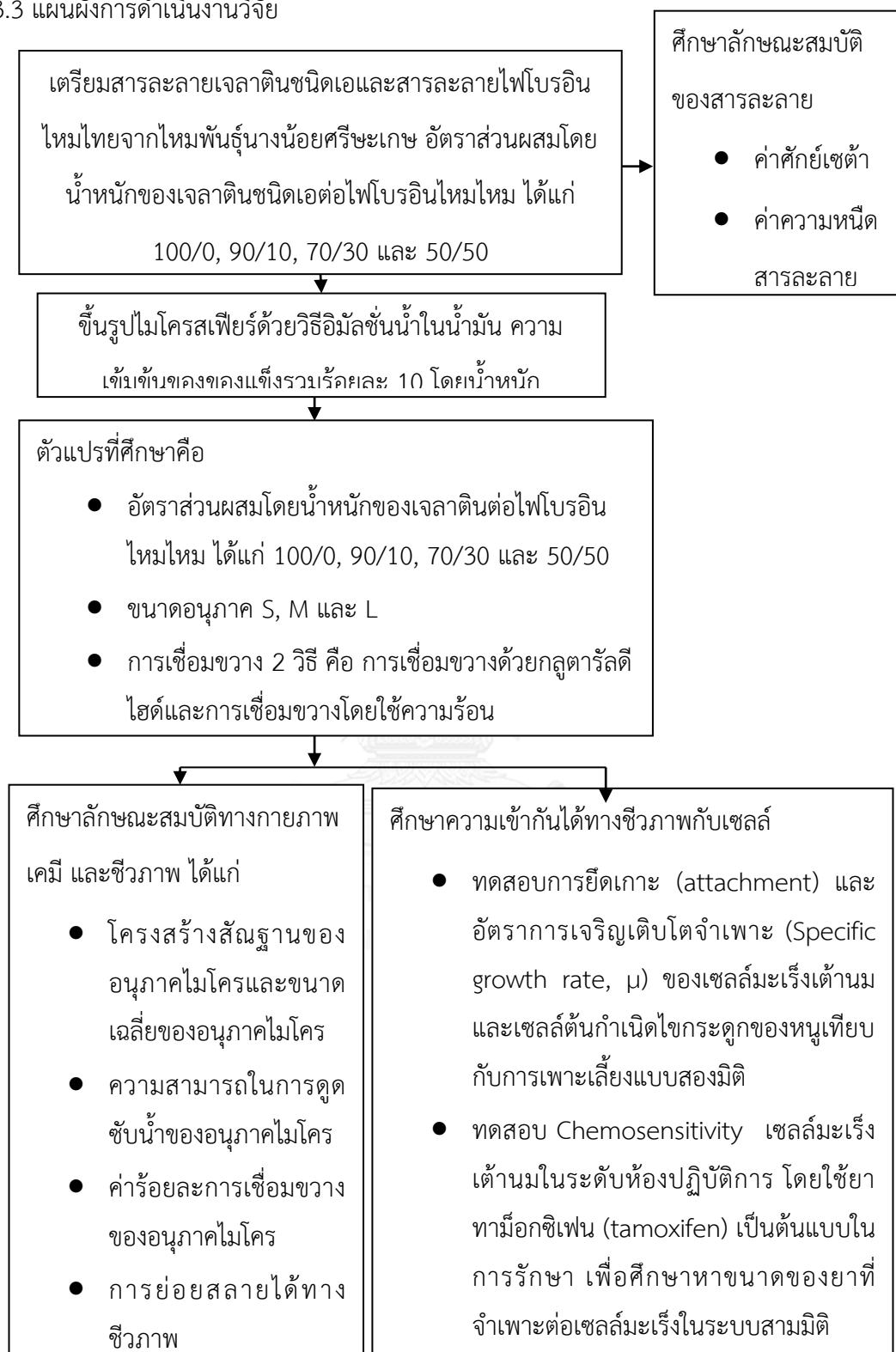
### 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 Autopitte (100-5,000 µl with tips, Eppendorf, Germany)
- 3.2.2 Centrifuge (Universal 320R, Hettich, Germany)
- 3.2.3 CO<sub>2</sub> incubator (HEPA CLASS 100, USA)
- 3.2.4 Cryo vial (1.8 ml, SPL Life Sciences Co.,Ltd, Korea)
- 3.2.5 Dialysis tube (MWCO 12000-16000, Viskase Companies, Inc., Japan)
- 3.2.6 Fluorescence microplate reader (Perkin elmer, multilabel counter, USA)
- 3.2.7 Freeze dryer (CHRIST®, Germany)
- 3.2.8 Freezer (-20 °C, Sandenintercool, Thailand)
- 3.2.9 Freezer (-40 °C, Haier, China)
- 3.2.10 Freezer (-80 °C, New Brunswick scientific, USA)
- 3.2.11 Hemocytometer (Counting chamber, Boeco, Germany)
- 3.2.12 Hotplate Stirrer (Cimarec 3, Thermolyne, USA)
- 3.2.13 Inverted Microscopes (Eclipse TS100, Nikon, Japan)
- 3.2.14 Laminar Flow (Cabinet, ScanLaf, Mars 1800, Danmark)
- 3.2.15 Micro centrifuge tube (Hycon Plastic, Thailand)
- 3.2.16 Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
- 3.2.17 Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Germany)



- 3.2.18 Overhead stirrer (IKA Labortechnik, Germany)
- 3.2.19 6-well plate polystyrene tissue culture plates (Costar®, Corning, USA)
- 3.2.20 24-well plate polystyrene tissue culture plates (Costar®, Corning, USA)
- 3.2.21 96-well plate polystyrene tissue culture plates (Costar®, Corning, USA)
- 3.2.22 Polystyrene tissue culture flask (T-75 Costar®, Corning, USA)
- 3.2.23 Scanning Electron Microscopy (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan)
- 3.2.24 Sieve (OSAKA IIDA Co.Ltd., Japan)
- 3.2.25 10 cm Tissue culture dish (Costar®, Corning, USA)
- 3.2.26 Triple-neck round bottom flask (Becthai, Thailand)
- 3.2.27 UV-Vis spectrophotometer (UV -2450, Shimadzu, Japan)
- 3.2.28 Vortex (Chemoscience, Thailand)
- 3.2.29 Waterbath (SUB6, Grant, England)
- 3.2.30 Zetasizer (650, Malvern, United Kingdom)

## 3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

### 3.4 การดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การเตรียมสารละลายเจลาติน

การเตรียมเจลาตินชนิดเอ (pl=9, Mw 100,000 Da, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan) ทำโดยแช่เจลาตินในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินดูดซับน้ำเต็มที่ จากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

#### 3.4.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

##### ก. การกำจัดกาวไหม

การเตรียมไหมพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 ทำโดยชั่งน้ำหนักรังไหม 40 กรัม กำจัดกาวไหมหรือเซรีซินจากรังไหม โดยเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ให้ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ จากนั้นนำรังไหมต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไหมที่ต้มไปล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) 4 - 5 ครั้ง เพื่อกำจัดเซรีซินออก และทำซ้ำในข้อ 2 - 3 อีกครั้ง นำไหมไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน และฉีก (ใส่ถุงมือ) ให้ฟูเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวเตรียมทำสารละลายไฟโบรอิน

##### ข. การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

ไหมที่ลอกกาวไหมเรียบร้อยแล้วมา 8 กรัม ละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ 24 กรัม ความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมโบรไมด์ 9.3 โมลาร์ แล้วนำไหมไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จนได้สารละลายสีเหลืองเหนียวหนืดคล้ายน้ำผึ้ง จากนั้นนำสารละลายไหมมาไดอะไลซ์ (MWCO 12000-16000, Viskase Companies, Inc., Japan) ในน้ำปราศจากไอออน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำทุกๆ 15 นาที ในชั่วโมงแรก วันถัดไปทำการเปลี่ยนน้ำเป็นเวลา 3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารละลายลิเทียมโบรไมด์ และวัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำที่ได้จากการไดอะไลซ์กระทั่งได้ค่าที่ได้มีค่าเท่ากับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำเริ่มต้นก่อนทำการไดอะไลซ์ เพื่อตรวจสอบปริมาณสารละลายลิเทียมโบรไมด์ที่ยังหลงเหลือ เมื่อไดอะไลซ์เสร็จนำสารละลายไฟโบรอินมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดฝุ่นหรือสิ่งเจือปน และได้ปริมาณสารละลายไฟโบรอินประมาณ 90

มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินประมาณร้อยละ 7-8 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำสารละลายที่ได้เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส



รังไหม 40 กรัม  
(พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1)



ต้มด้วยสารละลาย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
20 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง



ล้างด้วยน้ำ DI 3-4 รอบ



ไดอะไลซิสในน้ำ DI  
(MWCO 12000-16000)



อบเส้นใยไฟโบรอินใน 9.3 M  
LiBr 60 องศาเซลเซียส  
4 ชั่วโมง



เส้นใยไฟโบรอินที่ลอก  
กาวไหมแล้ว



เปลี่ยนน้ำ 3 ครั้ง



ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสิ่งเจือปนออก



สารละลายความเข้มข้น  
 $7.5 \pm 2.43$  (โดยน้ำหนัก)

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

### 3.4.3 การขึ้นรูปอนุภาคไมโครที่เตรียมจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย

อนุภาคไมโครผลิตด้วยวิธี Water-in-oil emulsion [ดัดแปลงจากวิธีของ Tabata Y. และคณะ 1999, Ratanavaraporn J. และคณะ 2013] โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่าง เจลาตินไฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้นของของแข็งทั้งหมด (Total solid weight) ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก คือ 100/0, 90/10, 70/30, 50/50 ตามลำดับ โดยปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารละลายทั้งสองละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และเตรียมน้ำมันถั่วเหลือง (Cook, Thanakorn Vegetable Oil Products Co.,Ltd, Thailand) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเติมลงไปในน้ำมันถั่วเหลืองที่ปั่นกวนไว้ โดยปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 110, 130, 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงเป็น 4 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็วด้วยการเติมน้ำแข็งลงในอ่างให้ความร้อน รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และปั่นกวนทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดอนุภาคก่อเจลอย่างคงตัว จากนั้นเติมอะซิโตนเย็นลงปั่นกวนเป็นเวลา 20 นาที เพื่อล้างน้ำมันออกจากผิวอนุภาคไมโครและนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที คัดแยกขนาดอนุภาคไมโครโดยใช้ตะแกรงร่อน (sieves, OSAKA IIDA, Japan) ขนาด 100-315 (S), 315-500 (M) และมากกว่า 710 (L) ไมโครเมตร และทิ้งให้แห้งในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเก็บอนุภาคไมโครในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

### 3.4.4 การเชื่อมขวาง

#### ก. การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์

การเชื่อมขวางทำได้โดยนำอนุภาคไมโครมา 1 กรัมแช่ในสารละลายที่ใช้ในการเชื่อมขวางปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยมีอัตราส่วนผสมระหว่างอะซิโตนต่อน้ำ 3:1 (โดยน้ำหนัก) โดยน้ำหนัก เติมกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก ในที่มืดและปั่นกวนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำอนุภาคไมโครที่ผ่านการเชื่อมขวางเรียบร้อยแล้วมาล้างด้วยสารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที เพื่อกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างออก นำอนุภาคไมโครที่ได้

ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dry) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง [Tabata Y. และคณะ 1999]

### ข. การเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อน

อนุภาคไมโครถูกทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dry) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไมอนุภาคไมโครแห้งสนิท จากนั้นนำอนุภาคไมโครที่ได้มาทำการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal) โดยนำไปอบในตู้อบ (VD23, Binder, Germany) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ที่สภาวะสูญญากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 3.4.5 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติ

#### 3.4.5.1 ลักษณะสมบัติของสายละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

##### ก. ค่าศักย์ゼต้า (Zeta potential)

การวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้า เริ่มจากการเตรียมสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก ได้แก่ 100/0, 90/10, 70/30, 50/50 และ 0/100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 5.5 และ 7.4 จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายไปส่งตรวจด้วยเครื่อง Zetasizer (650, Malvern, United Kingdom)

##### ข. ค่าความหนืด (Apparent viscosity)

สารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก ได้แก่ 100/0, 90/10, 70/30, 50/50 และ 0/100 ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 (โดยน้ำหนัก) ในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำไปสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ค่าความหนืดด้วยเครื่อง Viscometer (SV-10 Vibro Viscometer, A&D Company Ltd., Japan)



สารละลายโพรพีนถูกเทลงในน้ำมัน ปิดเครื่องให้ความร้อนและเติม (40 องศาเซลเซียส) และปั่นจนที่ น้ำแข็ง และปั่นจนเป็นเวลา 110, 130 และ 150 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง

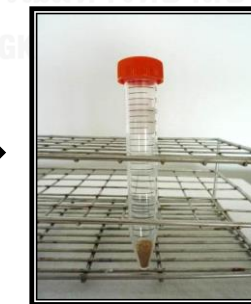
เติมอะซิโตนเย็นแล้วปั่น เหวียงเพื่อล้างน้ำมันออก



นำอนุภาคไมโครมาเชื่อมขวาง ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

อนุภาคไมโครที่แห้งแล้ว

คัดขนาดโดยใช้ ตะแกรงกรอง



ล้างกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างด้วย สารละลายไกลซีนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยน้ำ DI จำนวนมาก

อนุภาคไมโครเจลาติน/ไฟโบรอินที่ ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเก็บในตู้ดูดความชื้น

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการเตรียมอนุภาคไมโครโดยการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์

### 3.4.5.2 ลักษณะสมบัติของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

#### ก. โครงสร้างสัณฐาน (Morphology) และรูปร่างของอนุภาคไมโครเปปไทด์

ลักษณะโครงสร้างสัณฐานของอนุภาคไมโครถูกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM, JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan) โดยนำอนุภาคไมโครแห้งไปติดบนแท่นเตรียมชิ้นงานและนำไปเคลือบทอง แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ เพื่อดูลักษณะรูปร่างพื้นผิวภายนอกและตัดขวางอนุภาคเพื่อดูลักษณะพื้นผิวภายใน และวิเคราะห์รูปร่างของอนุภาคเปปไทด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon, Eclipse 80i, Japan) ขนาดกำลังขยาย 4 เท่า บันทึกภาพและนำมาวิเคราะห์รูปร่าง โดยใช้โปรแกรม Image J วัดขนาดของอนุภาคไมโครทั้งหมด 100 อนุภาค จากนั้นนำขนาดของอนุภาคไมโครที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

#### ข. ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระวิเคราะห์จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนด้วยเทคนิค 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) [ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bubnis W.A. และคณะ 1992 และ Ratanavaraporn J. และคณะ 2013] เพื่อวิเคราะห์ความสำเร็จในการเชื่อมขวางของโปรตีน เริ่มจากชั่งน้ำหนักอนุภาคไมโคร 5 มิลลิกรัม เติมสาร 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่ง TNBS จะทำปฏิกิริยากับหมู่  $-NH_2$  อิสระของโปรตีน และเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ( $NaHCO_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในอ่างให้ความร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยปริมาตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้เจลลาตินและไฟโบรอินไหมละลายอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน  $\beta$ -Alanine ซึ่งมีหมู่  $-NH_2$  1 หมู่ต่อ 1 โมล แล้วคำนวณร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวาง

#### ค. การดูดซับน้ำ

การทดสอบการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโคร โดยชั่งน้ำหนักของอนุภาคไมโครก่อนแช่น้ำ ( $W_d$ ) 10 มิลลิกรัม นำไปแช่ในสารละลาย PBS พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37



องศาเซลเซียส ที่เวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคไมโครเปียกซับด้วยกระดาษไม่มีขุย และชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักหลังแช่น้ำ ( $W_w$ ) คำนวณความสามารถในการดูดซึมน้ำได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการดูดซึมน้ำ (โดยน้ำหนัก)} = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

โดยที่  $W_w$  น้ำหนักเปียกของอนุภาคไมโคร หลังแช่ในสารละลาย PBS

$W_d$  น้ำหนักแห้งของอนุภาคไมโคร ก่อนแช่ในสารละลาย PBS

### ง. ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ

ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยชั่งน้ำหนักอนุภาคไมโครก่อนแช่ ( $W_i$ ) 10 มิลลิกรัม แล้วนำไปแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase = 191 units/mg, Fluka, United States) ความเข้มข้น 163 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ pH 7.4 [Ratanavaraporn J. และคณะ 2013] และสารละลายโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บผลตามเวลา ได้แก่ 1, 3, 6, 8, 10, 14 วัน โดยจะเปลี่ยนสารละลายเอนไซม์ทุกๆ 2 วัน อนุภาคไมโครที่ได้ถูกนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนก่อนนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คงเหลือของอนุภาคไมโครได้เป็นน้ำหนักแห้ง ( $W_f$ ) โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

โดยที่  $W_f$  น้ำหนักแห้งของอนุภาคไมโครหลังแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส

$W_i$  น้ำหนักแห้งของอนุภาคไมโครก่อนแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส

### 3.4.6 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Mesenchymal Stem Cells, MSC)

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูถูกสกัดได้จากกระดูกต้นขาหลังของหนูวิสต้า (เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ตามวิธีของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2009) ทำโดยการผ่ากระดูกต้นขาหลังของหนูเริ่มจากบริเวณสะโพกลงไปตัดชิ้นเนื้อส่วนที่ยื่นออกแล้ว จากนั้นตัดบริเวณปลายขาทั้งสองข้างจะพบไขกระดูก ใช้เข็มเบอร์ 21 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (alpha-modified eagle medium,  $\alpha$ -MEM ที่ประกอบด้วย 15 % FBS และ 50

U/ml penicillin streptomycin) ทำการเพาะไขกระดูกผ่านช่องของไขกระดูกจนกระทั่งก้อนไขกระดูก ออกหมด กระดูกมีลักษณะสีซีด จากนั้นดูดใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหาร 10 มิลลิลิตร และทำการ เพาะเซลล์ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 % CO<sub>2</sub> แล้วจึงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใน วันที่ 4 หลังจากการเพาะเซลล์ เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดออก และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ในวันที่ 7-10 หลังการเพาะเซลล์สามารถทำการแบ่งเซลล์ (subculture) ได้โดยใช้สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี ทริปซิน (Trypsin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยมวล และ EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยมวล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และขยายจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 90 สำหรับเซลล์ MSC ใช้จำนวน passage ที่ 2-3 เท่านั้น เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Differentiation)

### 3.4.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมบนโครงเลี้ยงเซลล์อนุภาคไมโคร

การประเมินความเข้ากันได้ของอนุภาคไมโครกับเซลล์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer Cell line ; MCF-7 cell) โดยการวัดปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะ (attachment) ที่เวลา 6 ชั่วโมง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยง เซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's modified eagles medium) ผสมกับ 10% Fetal bovine serum ในตู้บ่มที่มีสภาวะความดันบรรยากาศ (5% CO<sub>2</sub>) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการวัดปริมาณ ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983] โดยประเมินความหนาแน่นของเซลล์ที่ เพาะเลี้ยงเริ่มต้น ขนาดของอนุภาคไมโคร โดยเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ใน ระบบสองมิติ การเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติตามมาตรฐานและกับรายงานวิจัยอื่นๆ

#### 3.4.7.1 การยึดเกาะของเซลล์ (attachment) บนอนุภาคไมโคร

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cells) ทำโดยเตรียมอนุภาคไมโคร ทำ ให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เพาะเลี้ยงใน cryo vial (1.8 ml, SPL Life Sciences Co.,Ltd, Korea) ที่ จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $0.86 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิกรัม โดยใช้อุณหภูมิ 3 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปในตู้ เพาะเชื้อที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 30 นาที และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มอีก 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพาะเซลล์ (Seeding) โดยการเปรียบเทียบ 2 วิธี ดังนี้

### - การเพาะเลี้ยงด้วยการเขย่า (Agitation Seeding)

เซลล์ที่ความหนาแน่นของเซลล์  $0.86 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิกรัม ถูกเพาะบนอนุภาคไมโครแล้วถูกนำไปเขย่าด้วย Shaker (Galaxy 170R, New Brunswick, USA) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้เพาะเชื้อที่มี 5 % CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Takahashi Y. และคณะ 2005) และประเมินผลการยึดเกาะของเซลล์ที่เวลา 6 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T.1983] โดยทำการเปรียบเทียบผลของชนิดของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักต่างๆ

### - การเพาะเลี้ยงด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Seeding)

เซลล์ที่ความหนาแน่น  $0.86 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิกรัม ถูกเพาะบนอนุภาคไมโครไปปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 320R, Hettich, Germany) เป็นเวลา 5 นาที ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำมาเลี้ยงต่อในเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Godbey W.T. และคณะ 2004) ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T.1983] และประเมินผลการยึดเกาะของเซลล์ทำการเปรียบเทียบผลของชนิดของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักต่างๆ

#### 3.4.7.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) บนอนุภาคไมโคร

##### ก) การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนอนุภาคไมโคร

เพาะเลี้ยงเซลล์ทำโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด  $\alpha$ -MEM (Alpha-modified eagle medium) ที่ประกอบด้วย 15 % FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin บนอนุภาคไมโคร (3 มิลลิกรัม) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $1.67 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิกรัม เพาะเลี้ยงใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร (1.8 ml, SPL Life Sciences Co.,Ltd, Korea) เพาะเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 % CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน ประเมินปริมาณเซลล์ด้วยวิธี DNA assay โดยการใส่สารเรืองแสง เช่น Bisbenzidine (Hoechst) ที่มีคุณสมบัติจำเพาะกับ DNA โดยย้อมบริเวณเบส A-T ให้เรืองแสงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์มีการกระตุ้นด้วย

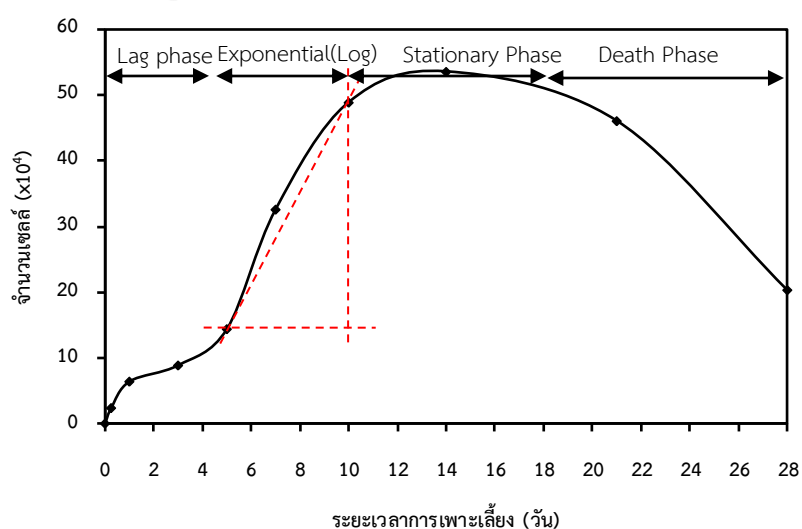
ความถี่ 340-380 นาโนเมตร และปลดปล่อยพลังงานแสงที่ 430-450 นาโนเมตร [Takahashi Y.และคณะ 2005]

### ข) การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโคร

การเพาะเลี้ยงเซลล์ทำโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM บนอนุภาคไมโคร (3 มิลลิกรัม) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิกรัม เพาะเลี้ยงใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร (1.8 ml, SPL Life Sciences Co.,Ltd, Korea) หลังจากนั้นประเมินผลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) บนอนุภาคไมโครที่ 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน โดยการวัดปริมาณของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T.1983]

1. การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งสาร MTT มีโครงสร้างเป็นวงแหวนสี่เหลี่ยมของเกลือ Tetrazolium โดยสาร MTT จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่หลั่งมาจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีม่วงของ Formazan ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และผลิตภัณฑ์ Formazan ที่เกิดขึ้นจะถูกละลายด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือ DMSO ได้เป็นสารละลายสีม่วง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร [Mosmann T. 1983] และหาปริมาณของเซลล์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเซลล์

### 2. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, $\mu$ )



**รูปที่ 3.4** กราฟตัวอย่างแสดงผลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์โดยแสดงถึงช่วง (phase) ต่างๆของการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ

จากรูปที่ 3.4 อัตราการเจริญเติบโตคำนวณจาก Log phase (Exponential) ดังสมการต่อไปนี้

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (\text{ต่อชั่วโมง}) \dots \dots \dots (3)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{X} dx \quad \dots \dots \dots (4)$$

$$\mu (t_2 - t_1) = \ln x_2 - \ln x_1 \quad \dots \dots \dots (5)$$

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad \dots \dots \dots (6)$$

โดย  $X_1$  คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา  $t_1$

$X_2$  คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา  $t_2$

คำนวณ เวลาแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time ; PDT (ชั่วโมง))

$$\text{โดยที่ } PDT = T_2 - T_1 \text{ และ } X_2 = 2X_1$$

$$\text{จากสมการ (3) } \mu (PDT) = \ln(2X_1) - \ln X_1 \quad \dots \dots \dots (7)$$

$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \dots \dots \dots (8)$$

### 3.4.8 ทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็งเต้านม

#### ในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบขนาดความเข้มข้นของยาที่จำเพาะต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งการทดสอบนี้ได้ดัดแปลงวิธีมาจาก Tehrani, F.K. และคณะ (2003)

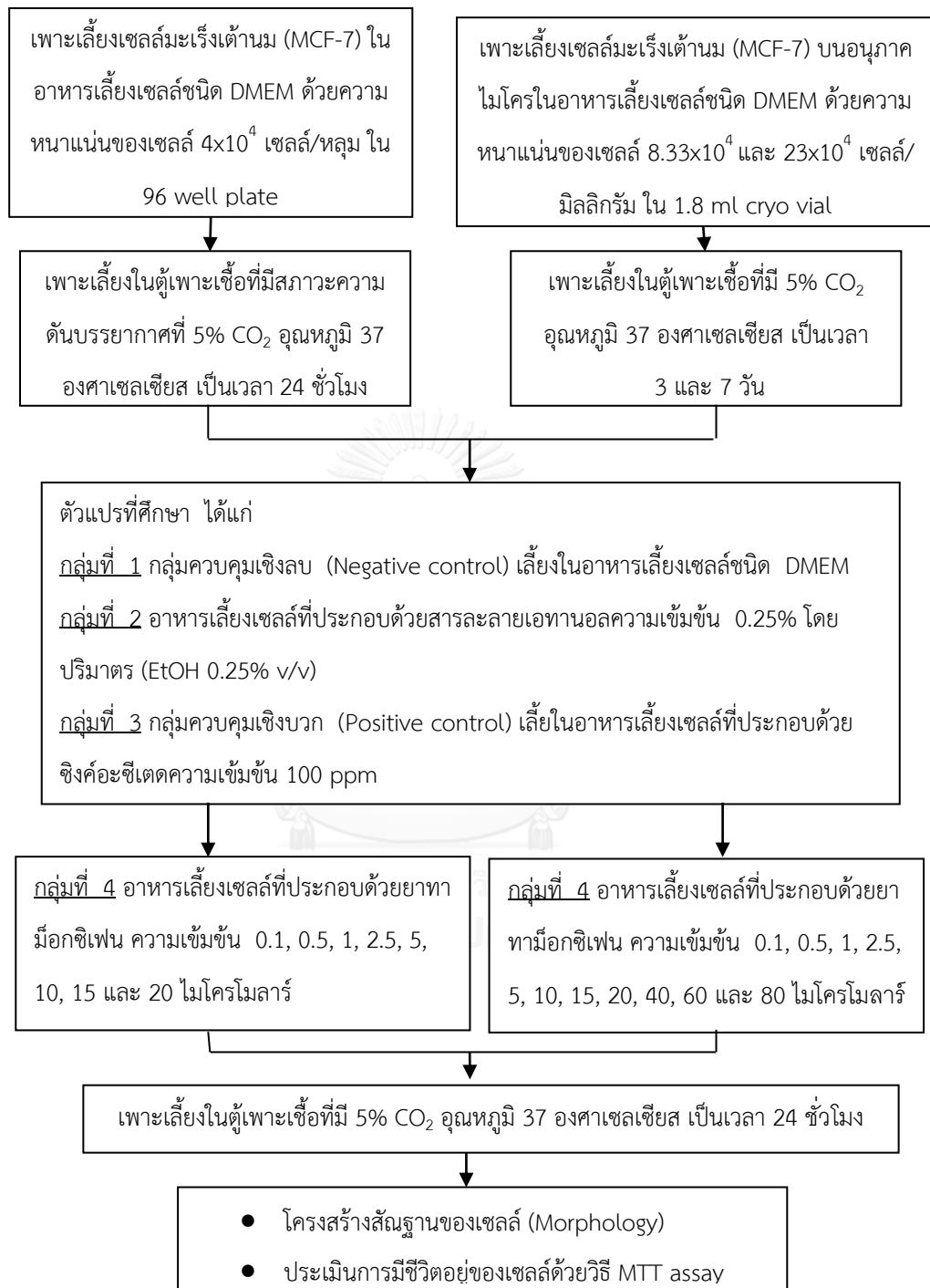
การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ

ก. การทดสอบความไวต่อยาโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงตามปกติด้วยหนาแน่นของเซลล์  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ใน 96 well plate ( $1.25 \times 10^5$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ จากนั้นวัดหาปริมาณ

การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983] หลังเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM), กลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร, อาหารที่มีซิงค์อะซิเตรดความเข้มข้น 100 ppm เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาม็อกซิเฟน โดยยาทาม็อกซิเฟนจะถูกละลายในสารละลายเอทานอลร้อยละ 99.9 โดยปริมาตร เพื่อเตรียมเป็น Stock solution จากนั้นจึงนำมาเจือจางเป็นความเข้มข้นต่างๆด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์

ข. การทดสอบความไวต่อยาโดยการเลี้ยงเซลล์สามมิติ บนอนุภาคไมโครเจลลาติน และไฟโบรอินไหมไทย ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์หนาแน่นเริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $1.29 \times 10^6$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) และ  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $3.56 \times 10^6$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) บนอนุภาคไมโครขนาด S ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ใน cryo tube 1.8 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และความเข้มข้นของเซลล์  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตครอบคลุมทั่วทั้งอนุภาค โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM), อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร, อาหารที่มีซิงค์อะซิเตรดความเข้มข้น 100 ppm เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาม็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นวัดหาปริมาณการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983]

ทดสอบความไวต่อยาโดยการเลี้ยงแบบ 2 มิติ    ทดสอบความไวต่อยาโดยการเลี้ยงแบบ 3 มิติ



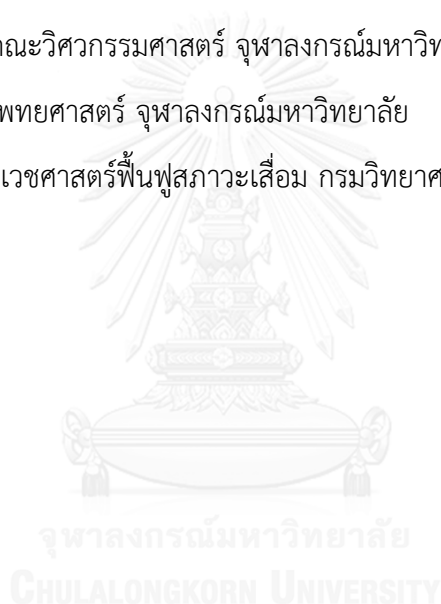
รูปที่ 3.5 แผนผังการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งเต้านมด้วยกลุ่มควบคุมต่างๆ โดยการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและการเลี้ยงแบบสามมิติบนอนุภาคไมโคร

### 3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย และค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)

### 3.6 สถานที่ทำงานวิจัย

- ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ศูนย์เซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข





## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตอนุภาคไมโคร เพื่อพัฒนาระบบทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทยคือ 100/0, 90/10, 70/30 และ 50/50 จากนั้นทำการเชื่อมขวาง (crosslink) ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักและเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส จากการทดลองทำการศึกษาความเร็วรอบในการปั่นกววน 3 ความเร็วรอบ เพื่อให้แต่ละขนาดมีร้อยละผลได้ (Yields) ของการผลิต 70-90 (ภาคผนวก ก) ซึ่งต้องใช้ความเร็วรอบในการปั่นกววนต่างกันได้แก่ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด S (ขนาดเฉลี่ย  $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด M (ขนาดเฉลี่ย  $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) และความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด L (ขนาดเฉลี่ย  $736.64 \pm 17.51$  ไมโครเมตร) และศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของอนุภาคไมโครที่ผลิตได้ และศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติของอนุภาคไมโครกับเซลล์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cell line, MCF-7 cell) ในระดับห้องปฏิบัติการ

#### 4.1 สมบัติของสารละลายและอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

##### 4.1.1 สมบัติของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

###### ก. ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential)

การศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเพื่อทราบถึงสมบัติทางประจุ ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการออกแบบวัสดุหรือโครงเลี้ยงเซลล์ โดยค่าศักย์เซต้าบ่งบอกถึงค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าที่บริเวณผิวอนุภาคกับศักย์ไฟฟ้าในชั้นสารละลายว่ามีค่าศักย์เซต้าเป็นลบหรือบวกมาก ซึ่งแสดงถึงความเสถียรของการกระจายตัว ในทางตรงกันข้ามค่าศักย์เซต้าที่เป็นค่าลบหรือบวกน้อยจะไม่เกิดความเสถียรและสารละลายเกิดการจับกลุ่มรวมกัน [Hunter R. และคณะ 1981]

เมื่อพิจารณาสารละลายเจลาตินและสารละลายไฟโบรอินละลายในน้ำปราศจากไอออน พีเอช 5.5 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ พีเอช 7.4 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าค่าศักย์เซต้าของสารละลายเจลาติน แสดงประจุบวก มีค่าเท่ากับ  $+2.96 \pm 0.21$  มิลลิโวลต์ และค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอิน แสดงประจุลบ มีค่าเท่ากับ  $-3.07 \pm 0.32$  มิลลิโวลต์ เนื่องจากเจลาตินที่ใช้ คือเจลาตินชนิดเอมีค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) เท่ากับ 9 ซึ่งค่าไอโซอิเล็กทริกของเจลาตินมีค่ามากกว่าค่าพีเอชของสารละลาย (พีเอช 5.5 และ 7.4) ทำให้ค่าศักย์เซต้าที่วัดได้ แสดงประจุบวก ขณะที่สารละลายไฟโบรอินใหม่จากรายงานของ Malay O. และคณะ 2007 ที่ทำการเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ (ใหม่บ้าน) สกัดด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าไอโซอิเล็กทริกประมาณ 3.8-4.2 [Malay O. และคณะ 2007] ดังนั้น ค่าพีเอช 5.5 และ 7.4 ของสารละลายไฟโบรอิน จึงแสดงประจุลบ

เมื่อพิจารณาสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยอัตราส่วนต่างๆ ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน พีเอช 5.5 และ 7.4 พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนไฟโบรอินในสารละลายผสมระหว่าง 10-50 ทำให้ค่าศักย์เซต้าเป็นบวกลดลง และที่อัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอิน 50/50 ค่าศักย์เซต้าที่ได้มีค่าเป็นกลางเข้าใกล้ 0 แสดงถึงความสมดุลทางประจุของสารละลายโปรตีนทั้งสองเมื่อผสมรวมกันที่อัตราส่วนเหมาะสม สอดคล้องกับรายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้ศึกษาผลของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทย ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารละลาย พบว่าเมื่อมีอัตราส่วนของไฟโบรอินในสารละลายผสมที่สูง (0-70 โดยน้ำหนัก) ค่าศักย์เซต้าจะมีค่าเป็นบวกลดลง เนื่องจากสารละลายไฟโบรอินมีประจุเป็นลบมาก ทำให้เมื่อไฟโบรอินเพิ่มขึ้นในสารละลายผสม ค่าประจุลบของไฟโบรอินจะไปปิดกั้นการแสดงออกของประจุบวกที่อยู่เจลาติน ส่งผลให้ค่าศักย์เซต้าที่มีไฟโบรอินมากมีประจุเป็นลบมาก เช่นเดียวกับกับรายงานของ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ที่รายงานว่าสารละลายเจลาตินชนิดเอที่พีเอช 5.6 มีค่าศักย์เซต้าเท่ากับ  $2.61 \pm 0.22$  มิลลิโวลต์ และสารละลายไฟโบรอินที่พีเอชเดียวกันนี้ มีค่าศักย์เซต้า  $-4.58 \pm 0.09$  มิลลิโวลต์ ซึ่งค่าศักย์เซต้าของสารละลายโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันที่อัตราส่วน จะพบว่าสารละลายผสมที่มีไฟโบรอินมาก ค่าประจุที่ได้มีแนวโน้มไปทางประจุลบ และที่

อัตราส่วนผสมระหว่างไฟโบรอินกับเจลาตินที่ 50/50 ค่าศักย์ゼต้ามีค่าเข้าใกล้ 0 มีผลสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

**ตารางที่ 4.1** ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากไอออนที่พีเอช 5.5 และในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.4

ตัวอย่าง	ค่าศักย์ゼต้าของสารละลาย (มิลลิโวลต์)	
	pH 5.0	pH 7.4
G/SF 100/0	+2.96±0.21 <sup>a</sup>	+1.24±0.74 <sup>e</sup>
G/SF 90/10	+2.75±0.43 <sup>a,b</sup>	+1.05±0.93 <sup>f</sup>
G/SF 70/30	+2.28±0.45 <sup>b</sup>	+0.19±0.83 <sup>c,f</sup>
G/SF 50/50	-0.45±0.3 <sup>c</sup>	-0.81±0.47 <sup>c</sup>
G/SF 0/100	-3.07±0.32 <sup>d</sup>	-5.82±0.10 <sup>g</sup>

(a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

#### ข. ความหนืดของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

ความหนืดของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของอนุภาคไมโคร โดยทั่วไปค่าความหนืดของสารละลายมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่แสดงพฤติกรรมการไหลของสารละลายที่แตกต่างกัน และอุณหภูมิที่ต้องควบคุม เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะส่งผลให้ความหนืดของสารละลายเปลี่ยนแปลง [Ward และคณะ 1977] ค่าความหนืดในการทดลองนี้วิเคราะห์ได้จากเครื่องวัดความหนืด (SV-10 Vibro Viscometer, A&D Company Ltd., Japan) โดยใช้สารละลายผสมความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาค

ผลจากการวิเคราะห์ค่าความหนืดของสารละลายที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าสารละลายเจลาติน (100/0) มีค่าความหนืดเท่ากับ  $4.42 \pm 0.04$  เซนติพอยส์ และสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (0/100) มีค่าความหนืด  $5.22 \pm 0.05$  เซนติพอยด์ แสดงให้เห็นว่าสารละลายไฟโบรอินมีค่าความหนืดสูงกว่าสารละลายเจลาตินอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากเจลาตินชนิดเอทีใช้ มีน้ำหนักโมเลกุล 100.6 กิโลดาลตัน และไฟโบรอินไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

1 มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 390 กิโลดาลตัน จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE [Kaewprasit K. และคณะ 2014] ซึ่งเมื่อน้ำหนักโมเลกุลมากส่งผลให้มีความหนืดมากด้วยเช่นกัน

เมื่อพิจารณาสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ความเข้มข้นของสารละลายร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก พบว่าเมื่อปริมาณไฟโบรอินในอัตราส่วนผสมเพิ่มขึ้น ค่าความหนืดที่ได้จากการวิเคราะห์ มีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนไฟโบรอิน เนื่องจากสารละลายไฟโบรอินไหมไทยมีค่าความหนืดสูงกว่าค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นของสารละลายและอุณหภูมิที่สภาวะเดียวกัน สำหรับค่าความหนืดที่ความเข้มข้นของสารละลายผสมร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ค่าความหนืดมีผลไปในทิศทางเดียวกับค่าความหนืดที่ความเข้มข้นของสารละลายร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก กล่าวคือ เมื่อร้อยละของอัตราส่วนของปริมาณไฟโบรอินที่เพิ่มขึ้น (0-50 โดยน้ำหนัก) ค่าความหนืดจะมีค่าเพิ่มตามปริมาณไฟโบรอิน สามารถกล่าวได้ว่าความหนืดมีค่าขึ้นอยู่กับอัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินต่อไฟโบรอิน และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆ

ผลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Okhawilai M. และคณะ (2010) ที่รายงานผลค่าความหนืดของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินชนิดบีและไฟโบรอินไหมไทยที่ละลายในกรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 99 โดยปริมาตร โดยวัดค่าความหนืดที่อุณหภูมิ  $27 \pm 1$  องศาเซลเซียส พบว่าสารละลายเจลาตินมีค่าความหนืดเท่ากับ 351 เซนติพอยส์ และค่าความหนืดจะมีค่ามากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไฟโบรอินถึงร้อยละ 60 โดยน้ำหนักในสารละลายผสม ซึ่งมีค่าความหนืดเท่ากับ 475 เซนติพอยส์ แสดงให้เห็นว่าค่าความหนืดมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณไฟโบรอินที่เพิ่ม [Okhawilai M. และคณะ 2010] นอกจากนี้รายงานของ Chemtob C. และคณะ (1988) พบว่าค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน

**ตารางที่ 4.2** ค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ความเข้มข้นของสารละลายร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตัวอย่าง	ความหนืดของสารละลายผสม (cP) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	
	ความเข้มข้นของ สารละลายร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก	ความเข้มข้นของ สารละลายร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก
Gelatin (G/SF 100/0)	4.42±0.04 <sup>a</sup>	20.40±0.20 <sup>f</sup>
G/SF 90/10	4.58±0.03 <sup>b</sup>	24.80±0.17 <sup>g</sup>
G/SF 70/30	4.85±0.05 <sup>c</sup>	33.30±0.10 <sup>h</sup>
G/SF 50/50	4.95±0.02 <sup>d</sup>	38.30±0.10 <sup>i</sup>
Silk fibroin (G/SF 0/100)	5.22±0.05 <sup>e</sup>	N/A

(a-i แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

#### 4.1.2 สมบัติของอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

##### ก. โครงสร้างพื้นฐาน (Morphology)

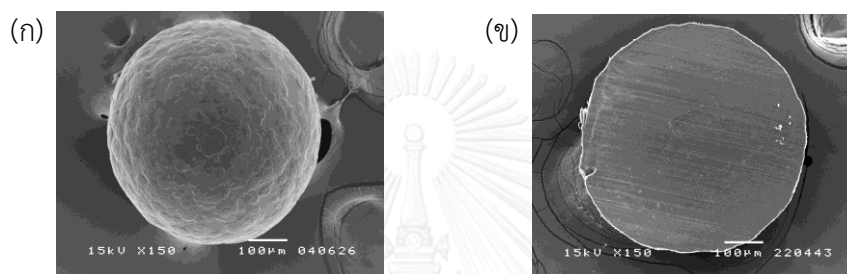
การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานและลักษณะพื้นผิวภายนอกของอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมและขนาดอนุภาคต่างๆ วิเคราะห์โดยใช้เครื่องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) ดังรูปที่ 4.2 และ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นพื้นผิวภายนอกของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากลักษณะโครงสร้างพื้นฐานที่แสดงในรูปดังกล่าว พบว่าอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางทั้งสองวิธี ในทุกขนาดและทุกอัตราส่วนผสม มีลักษณะพื้นผิวเรียบ และอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลม เมื่อทำการตัดขวางอนุภาคเพื่อดูลักษณะโครงสร้างพื้นฐานภายใน พบว่ามีลักษณะตันและไม่มีรูพรุน (รูปที่ 4.1) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการขึ้นรูปมีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก

ทำให้โครงสร้างภายในมีความหนาแน่นสูง และผลจากการเชื่อมขวางก่อนทำแห้งของอนุภาคทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนมีการสร้างพันธะโควาเลนต์ของโปรตีนทั้งสองชนิดเชื่อมต่อกันอย่างแข็งแรง จากรายงานของ Peng Z.Y. และคณะ (2012) รายงานว่าการผลิตอนุภาคไมโครเจลลาตินที่ขึ้นรูปอนุภาคด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) สามารถทำให้เกิดรูพรุนภายในโครงสร้างได้ โดยเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการขึ้นรูปให้นำอนุภาคไมโครเจลลาตินไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) เช็งก่อนนำมาเชื่อมขวาง จึงจะได้อนุภาคไมโครที่โครงสร้างสัณฐานทั้งภายนอกและภายในเกิดรูพรุน [Peng Z.Y. และคณะ 2012]

เมื่อพิจารณาถึงขนาดของอนุภาคแห้งหลังผ่านการเชื่อมขวางทั้งสองวิธี พบว่าที่ขนาดเฉลี่ยอนุภาค S, M และ L ในทุกอัตราส่วนผสมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ทำการควบคุมความเร็วรอบในการการขึ้นรูปที่ความเร็วรอบ 150, 130 และ 110 รอบต่อนาทีเพื่อให้ได้ขนาด S, M และ L โดยค่าร้อยละผลได้ (Yields) จากการผลิตมีค่าร้อยละประมาณ 70-90 (ตารางที่ 4.3) และคัดขนาดโดยใช้ตะแกรง จึงทำให้ได้ขนาดเฉลี่ย S, M และ L ที่ใกล้เคียงกันในทุกอัตราส่วนผสมของอนุภาคไมโคร ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5

ลักษณะรูปร่างของอนุภาคไมโครเปือก สามารถศึกษาได้จากกล้องจุลทรรศน์ (Nikon, รุ่น Eclipse 80i, Japan) ที่กำลังขยาย 4 เท่า ทำโดยแช่อนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 ที่แสดงลักษณะรูปร่างของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และเชื่อมขวางด้วยความร้อน ตามลำดับ พบว่าลักษณะรูปร่างของอนุภาคทั้งสองการเชื่อมขวาง มีลักษณะทรงกลม กระจายตัว ไม่จับกลุ่มกัน และขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ จากการศึกษาผลของขนาดเฉลี่ยของอนุภาคเปือก โดยพิจารณาอัตราส่วนผสมของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย พบว่าอัตราส่วนผสมที่มีปริมาณเจลลาตินมากกว่า จะทำให้ได้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสมที่มีไฟโบรอินมากที่วิธีการเชื่อมขวางเดียวกัน เนื่องจากเจลลาตินมีลักษณะสมบัติที่ชอบน้ำ เมื่อเจลลาตินอยู่ในน้ำสามารถพองตัวได้ 5 – 10 เท่าของปริมาตรเดิม เจลาตินจึงดูดซับน้ำได้ดี [Cole E.T. และคณะ 2004] สำหรับผลขนาดเฉลี่ยอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และเชื่อมขวางด้วยความร้อน พบว่าหลังการแช่ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวาง

ด้วยความร้อน มีลักษณะบวมน้ำมากกว่า เนื่องจากมีร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนน้อย จะทำให้สามารถดูดซับน้ำได้มาก ขนาดของอนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่ ดังนั้นขนาดเฉลี่ยของอนุภาค เปียกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอิน อัตราการเชื่อมขวาง ความสามารถในการดูดซับ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนไฟโบรอินในอนุภาคไมโคร ทำให้การดูดซับน้ำลดลง เนื่องจากไฟโบรอินความไม่ชอบน้ำสูง และอัตราการเชื่อมขวางสูง ทำให้ร้อยละการดูดซับน้ำมีค่าน้อย อนุภาคที่แช่ในน้ำมีขนาดใหญ่ ขนาดเฉลี่ยหลังการวัดอนุภาคเปียก จึงมีเส้นผ่านศูนย์กลางแคบกว่า อนุภาคไมโครที่มีร้อยละการดูดซับสูง จะทำให้อนุภาคที่แช่อยู่ในน้ำมีขนาดเล็ก



รูปที่ 4.1 (ก) อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยขนาด M (ข) ภาพตัดขวางอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยขนาด M กำลังขยาย 150 เท่า

ตารางที่ 4.3 ร้อยละผลได้ (Yields) ของขนาดเฉลี่ยอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทย ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ จากผลของความเร็รรอบ 3 ขนาด คือ ความเร็รรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด S, ความเร็รรอบ 130 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด M และความเร็รรอบ 110 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด L

ตัวอย่าง G/SF	ร้อยละผลได้ (Yields) ของขนาดเฉลี่ยอนุภาคไมโคร		
	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L
100/0	74.4±3.9 <sup>a,c</sup>	75.1±15.5 <sup>a,c</sup>	75.4±9.0 <sup>a,c</sup>
90/10	79.8±8.2 <sup>a,c</sup>	73.7±5.7 <sup>a,c</sup>	80.0±5.7 <sup>a,c</sup>
70/30	74.4±5.8 <sup>a,c</sup>	74.2±8.9 <sup>a,c</sup>	83.7±2.6 <sup>c</sup>
50/50	77.7±4.0 <sup>a,c</sup>	76.7±1.0 <sup>a,b</sup>	82.6±4.8 <sup>b,c</sup>

(a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.4 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยแห้งและเปียกหลังผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารกลูตารัลดีไฮด์

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครแห้ง (ไมโครเมตร)				ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครเปียก (ไมโครเมตร)			
	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L	ขนาด L	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L	ขนาด L
G/SF								
100/0	333.90±35.05 <sup>a</sup>	520.83±49.39 <sup>b</sup>	720.67±47.95 <sup>c</sup>		450.26±28.6 <sup>d</sup>	731.44±29.5 <sup>e</sup>	1172.44±20.2 <sup>f</sup>	
90/10	334.1±39.48 <sup>a</sup>	563.85±55.39 <sup>b</sup>	750.30±62.53 <sup>c</sup>		440.26±30.3 <sup>d</sup>	720.35±46.3 <sup>e</sup>	1133.72±30.1 <sup>f</sup>	
70/30	334.92±46.03 <sup>a</sup>	564.53±33.18 <sup>b</sup>	753.09±70.79 <sup>c</sup>		429.09±39.2 <sup>d</sup>	703.98±37.0 <sup>e</sup>	1015.84±15.2 <sup>f</sup>	
50/50	347.76±41.11 <sup>a</sup>	587.69±37.92 <sup>b</sup>	753.00±110.65 <sup>c</sup>		404.95±31.1 <sup>d</sup>	684.45±30.7 <sup>e</sup>	998.99±15.9 <sup>f</sup>	

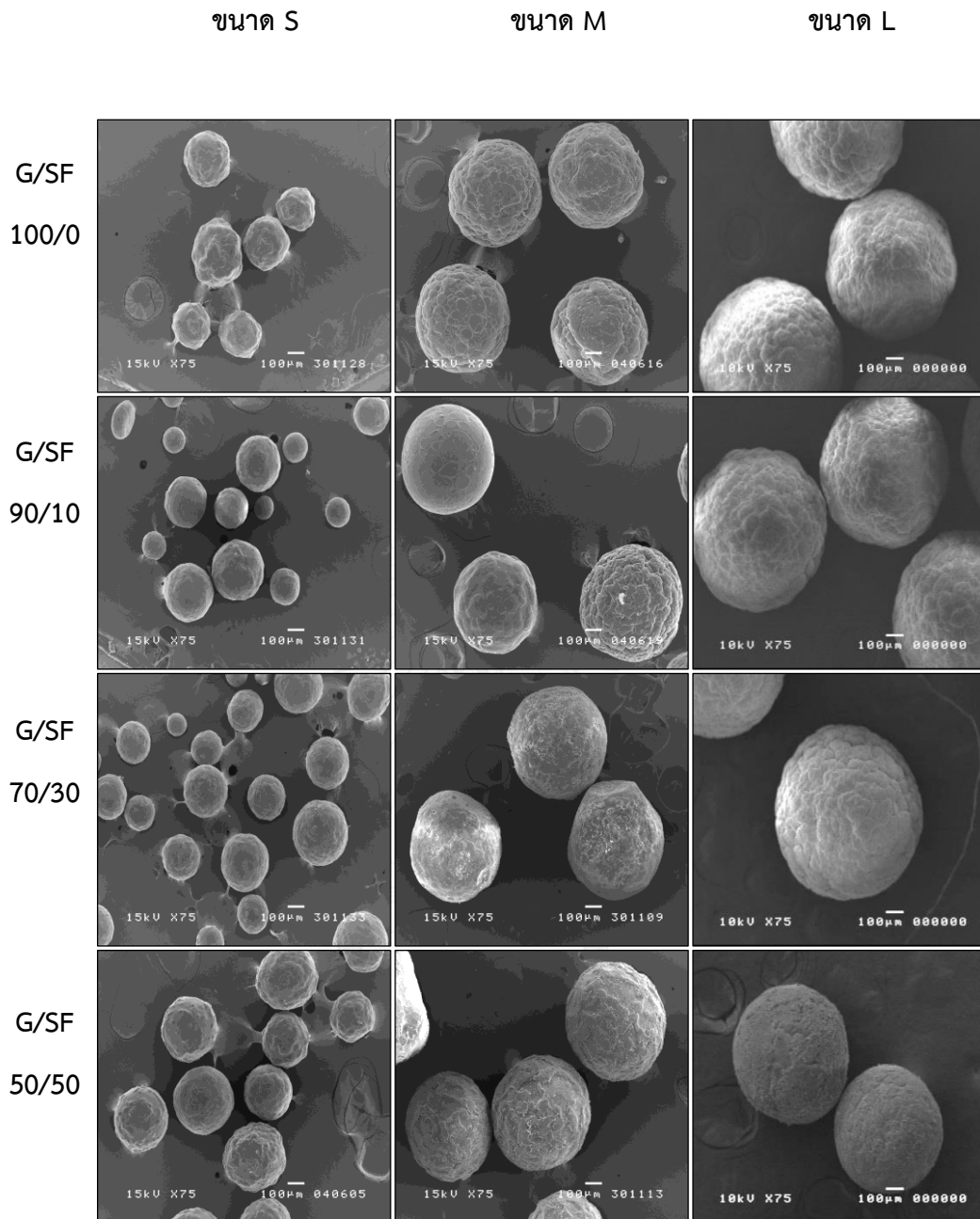
(a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคไมโคร ที่ระดับความเชื่อมั่น p < 0.05)

ตารางที่ 4.5 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยแห้งและเปียกหลังผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อน

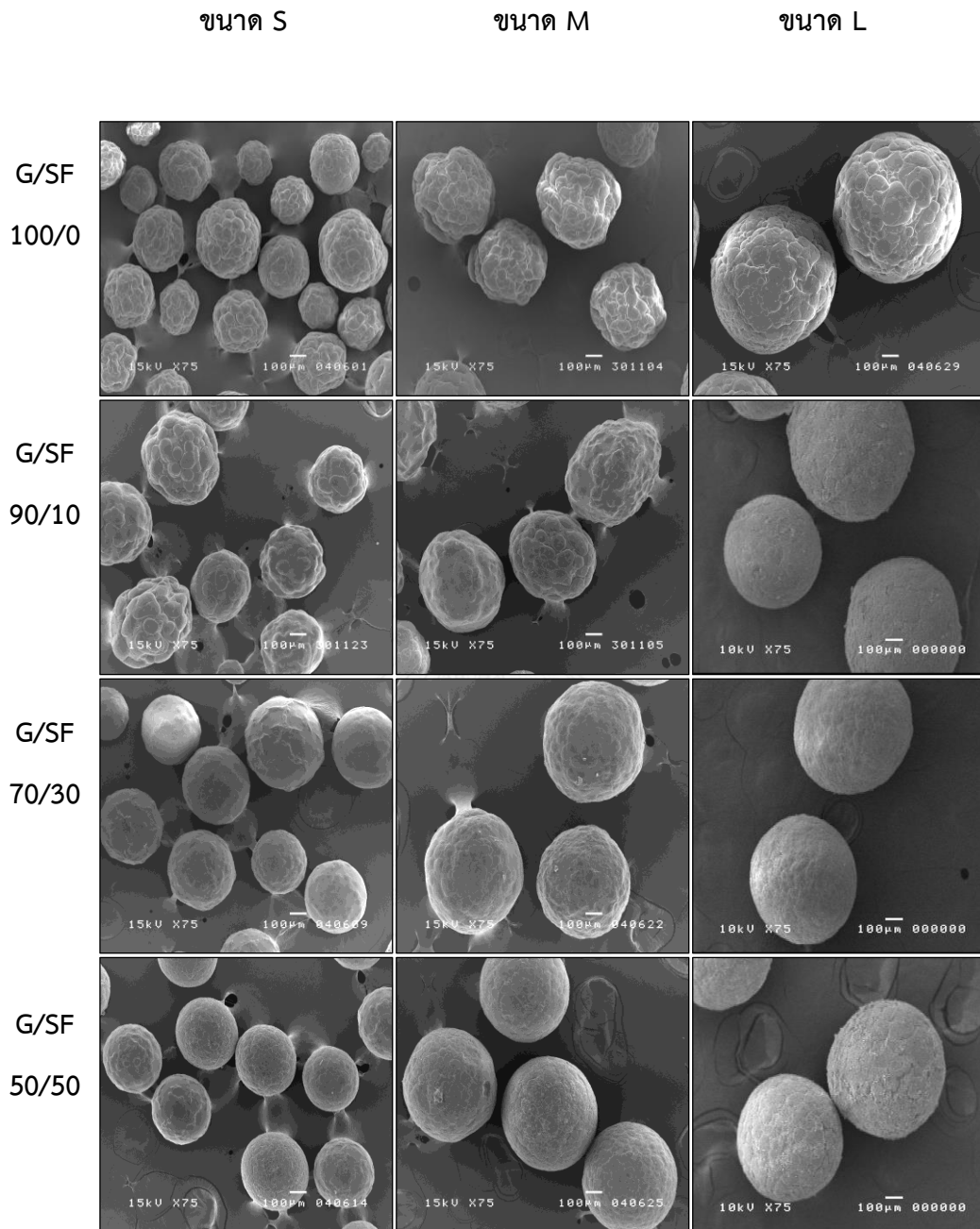
ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครแห้ง (ไมโครเมตร)				ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคไมโครเปียก (ไมโครเมตร)			
	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L	ขนาด L	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L	ขนาด L
G/SF								
100/0	287.59±46.15 <sup>a</sup>	519.37±28.92 <sup>b</sup>	703.91±53.88 <sup>c</sup>		517.38±39.1 <sup>d</sup>	830.25±27.2 <sup>e</sup>	1206.30±24.2 <sup>f</sup>	
90/10	308.41±37.02 <sup>a</sup>	558.58±36.73 <sup>b</sup>	729.69±50.76 <sup>c</sup>		493.51±37.0 <sup>d</sup>	803.65±30.0 <sup>e</sup>	1137.72±27.9 <sup>f</sup>	
70/30	327.04±47.55 <sup>a</sup>	565.17±30.06 <sup>b</sup>	739.50±67.90 <sup>c</sup>		431.45±28.1 <sup>d</sup>	756.23±36.9 <sup>ef</sup>	1064.26±27.0 <sup>h</sup>	
50/50	328.54±25.69 <sup>a</sup>	565.28±17.07 <sup>b</sup>	742.95±61.23 <sup>c</sup>		423.76±27.0 <sup>d</sup>	691.42±46.0 <sup>f</sup>	998.12±23.6 <sup>h</sup>	

(a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคไมโคร ที่ระดับความเชื่อมั่น p < 0.05)

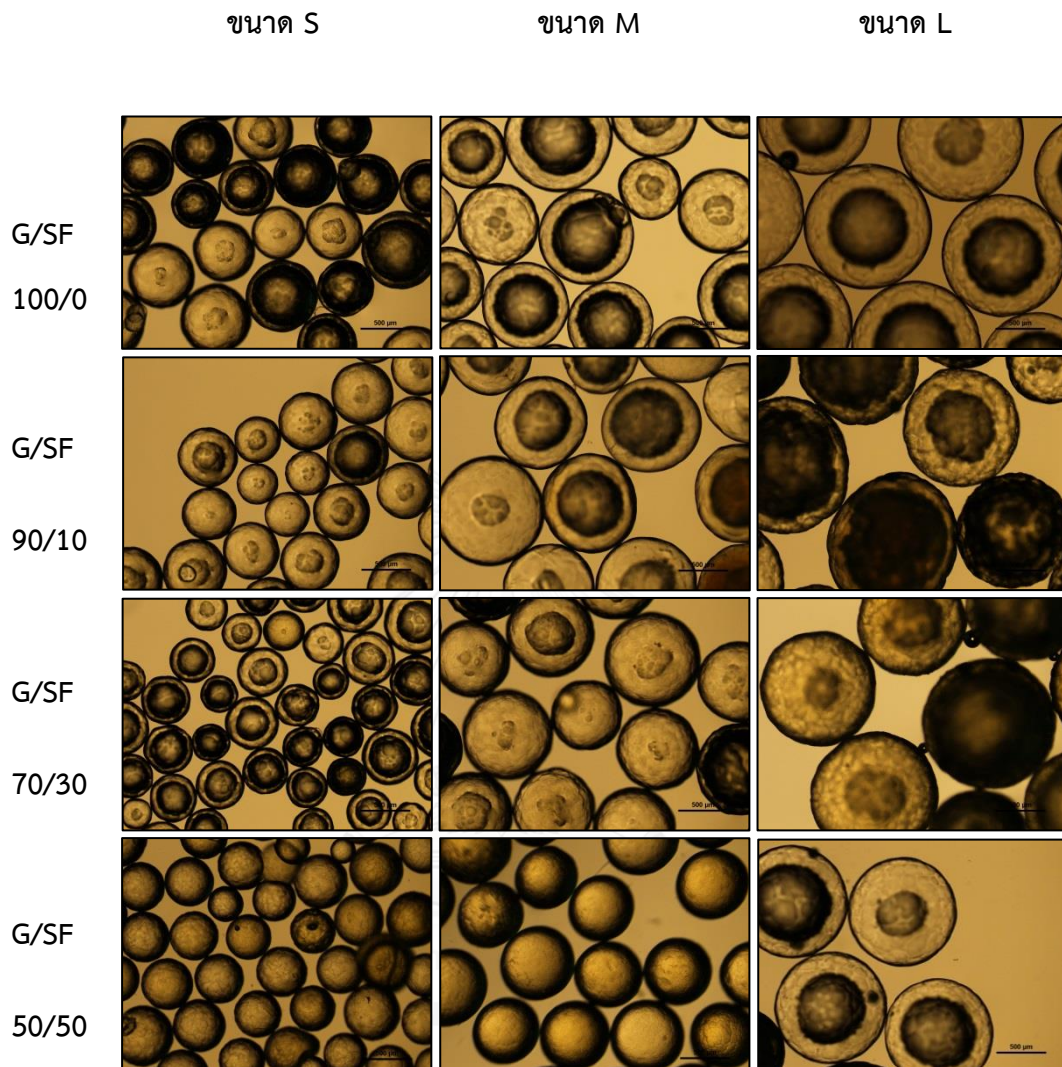




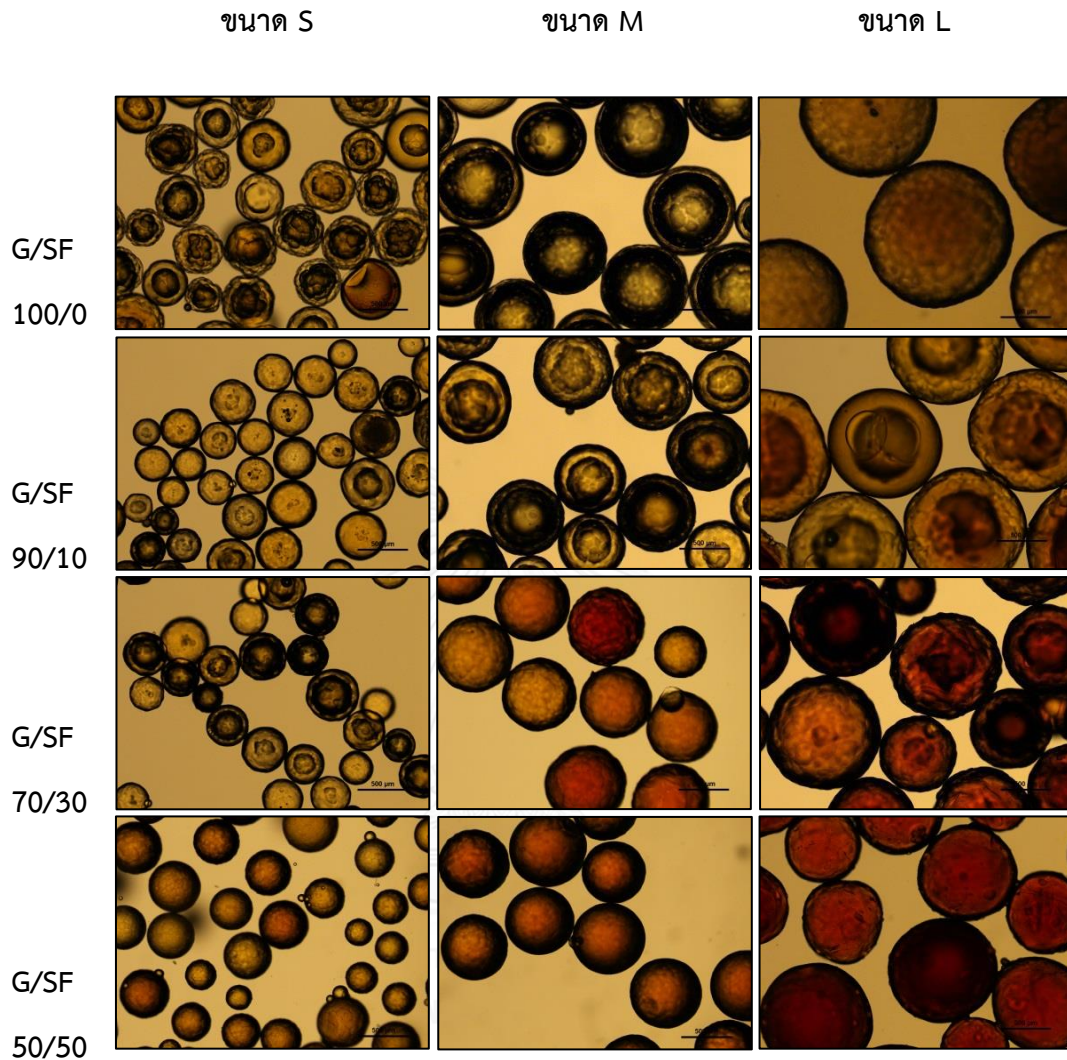
รูปที่ 4.2 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครแห้งจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 75 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4.3 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครแห้งจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 75 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)



**รูปที่ 4.4** ลักษณะรูปร่างของอนุภาคไมโครเปียกจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังจากแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4.5 ลักษณะรูปร่างของอนุภาคไมโครเปียกจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ หลังจากแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร)

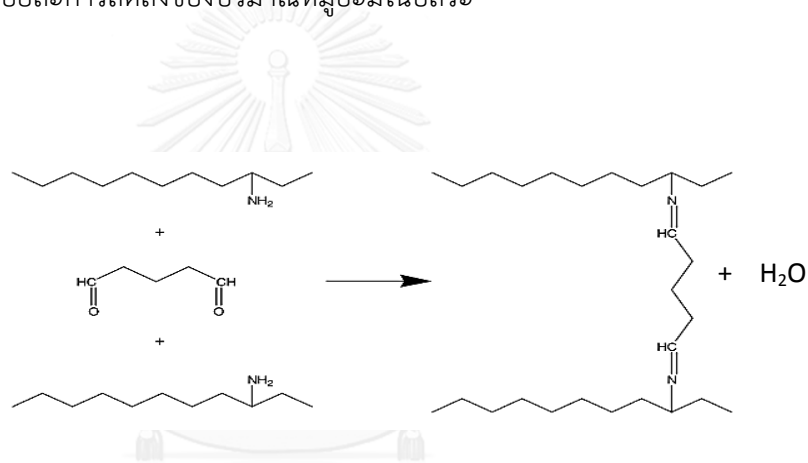
## ข. ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

การประยุกต์ใช้งานของเจลาตินมักมีข้อจำกัดเนื่องจากเจลาตินมีอัตราการย่อยสลายค่อนข้างเร็ว ในงานวิจัยนี้จึงทำการผสมเจลาตินร่วมกับไฟโบรอินไหมไทยเพื่อลดการย่อยสลาย [OKhawilai M. และคณะ (2010), Jetbumpenkul P. และคณะ (2012), Ratanavaraporn J. และคณะ (2013)] ซึ่งกระบวนการเชื่อมขวางเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของวัสดุให้มีความคงตัวมากขึ้น โดยการเชื่อมขวางเป็นกระบวนการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างสายโซ่โมเลกุล ซึ่งจะส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางชีวภาพ เพราะเมื่อวัสดุมีความแข็งแรงมากขึ้น จะส่งผลให้อัตราการย่อยสลายที่ช้าลง ทนต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในร่างกาย ทนทานความร้อนได้สูง แต่ปริมาณการดูดซับน้ำ (การบวมน้ำ) ลดลง

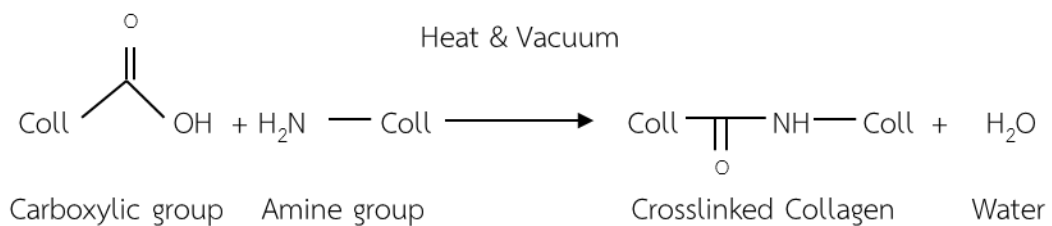
การปรับปรุงสมบัติของวัสดุนี้เพื่อให้วัสดุมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้งาน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกเชื่อมขวางพันธะด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และการเชื่อมขวางด้วยความร้อน โดยกลูตารัลดีไฮด์มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 ตัวต่อแบบสายโซ่ตรง มีปลายทั้งสองข้างเป็นหมู่อัลดีไฮด์ การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์เป็นการสร้างพันธะระหว่างหมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) 1 โมเลกุล กับหมู่ -NH<sub>2</sub> อิสระของโปรตีน 2 หมู่ (รูปที่ 4.6) สำหรับการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนจะทำในสภาวะที่อุณหภูมิสูง 140 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสุญญากาศ การเชื่อมขวางจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่ -NH<sub>2</sub> อิสระของโปรตีน และหมู่ -COOH ของสายโปรตีนที่อยู่ใกล้กัน (รูปที่ 4.7) ดังนั้นร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจึงวิเคราะห์ได้จากปริมาณหมู่ -NH<sub>2</sub> ของโปรตีนก่อนและหลังกระบวนการเชื่อมขวาง ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างหมู่ -NH<sub>2</sub> อิสระของโปรตีน กับหมู่ -OH ของสารละลาย TNBS (2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid) โดย TNBS สามารถบ่งบอกถึงปริมาณหมู่ -NH<sub>2</sub> อิสระในโมเลกุล (เนื่องจากหมู่ -NH<sub>2</sub> เป็นองค์ประกอบที่พบในโปรตีนทั้งเจลาตินและไฟโบรอิน) โดยใช้กราฟมาตรฐานของ beta-alanine ซึ่งประกอบด้วย -NH<sub>2</sub> 1 หมู่ต่อ 1 โมเลกุล ในการตรวจสอบ

โดยในงานวิจัยนี้จะรายงานระดับการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครจากค่าร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ โดยที่ร้อยละการเชื่อมขวางที่วิเคราะห์ด้วยวิธี TNBS อาจไม่สามารถอธิบายการเชื่อมขวางของวัสดุได้โดยตรง ซึ่งวิธีนี้วัดได้เฉพาะปริมาณ -NH<sub>2</sub> อิสระที่หายไป แม้ว่า

สามารถบอกความต่างของปริมาณอะมิโนก่อนและหลังการเชื่อมขวางได้ แต่อย่างไรก็ตามสิ่งสามารถอธิบายร้อยละการเชื่อมขวางได้ว่าการเชื่อมขวางได้มากหรือน้อย คือการละลายน้ำหรือการย่อยสลายของวัสดุ จากรายงานของ Tajima, S. และ Tabata, Y (2012) ได้ทำการศึกษาการเชื่อมขวางอนุภาคไมโครเจลาคตินด้วยความร้อน และวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางจากอัตราการย่อยสลาย โดยอัตราการเชื่อมขวางสูง ทำให้วัสดุการย่อยสลายช้า [Tajima, S. และ Tabata, Y 2012] หรือบางรายงานจะกล่าวถึงอัตราการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครเจลจากการรายงานปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางเพียงเท่านั้น แต่ไม่สามารถคำนวณร้อยละการเชื่อมขวางได้โดยตรง [Leo E. และคณะ 1997, Vandelli M.A. และคณะ 2001] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงร้อยละการเชื่อมขวางในรูปแบบของร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ



รูปที่ 4.6 ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [Lee C.R. 2001]



รูปที่ 4.7 ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมขวางโดยใช้ด้วยความร้อน [Haugh, M.G.และคณะ 2009]

รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระของอนุภาคไมโครก่อนและหลังการเชื่อมขวางทั้งสองวิธี เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนผสมของอนุภาคก่อนการเชื่อมขวาง พบว่า อนุภาคไมโครเจลาติน (100/0) ขนาดอนุภาคไมโคร S, M และ L มีปริมาณ  $-NH_2$  อิสระมากที่สุดเท่ากับ  $158.75 \pm 4.25$ ,  $170.93 \pm 1.26$  และ  $172.11 \pm 6.84$  ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมกรัมของโปรตีน ตามลำดับ และปริมาณ  $-NH_2$  อิสระจะลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอิน แสดงให้เห็นว่าปริมาณ  $-NH_2$  อิสระของโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่อยู่ในสายโซ่โปรตีน โดยปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างสายโซ่โปรตีนของเจลาติน ได้แก่ Glutamine (11.3%), Asparagine (8.3%), Arginine (6.2%) และ Lysine (4.1%) มีองค์ประกอบรวมประมาณ 29.9 % ซึ่งมากกว่าปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระในสายโซ่โปรตีนของไฟโบรอินที่ประกอบด้วย Asparagine (1.63%), Glutamine (1.15%), Arginine (0.3%) และ Lysine (0.2%) โดยองค์ประกอบรวมมีเพียงประมาณ 5% [Vepari, C. และ Kaewprasit, K. 2014]

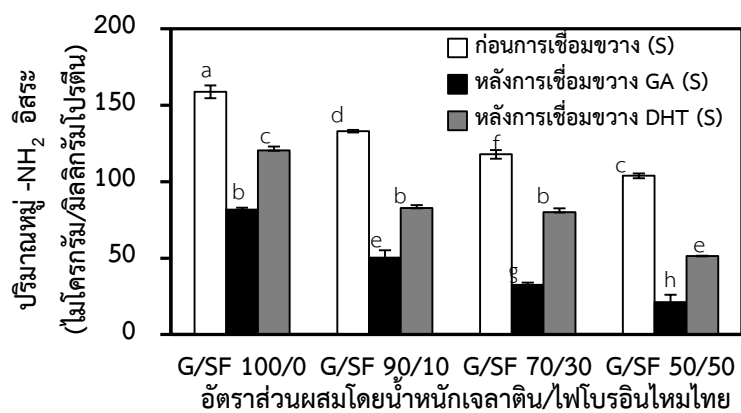
เมื่อศึกษาผลของขนาดอนุภาคต่อปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระของอนุภาคไมโครก่อนและหลังการเชื่อมขวาง พบว่าปริมาณ  $-NH_2$  อิสระของโปรตีนในทุกขนาดอนุภาคไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาผลของการเชื่อมขวางอนุภาคไมโครทั้งสองวิธี พบว่าอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีปริมาณ  $-NH_2$  อิสระมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ เนื่องจากการเชื่อมขวางด้วยความร้อนเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่  $-COOH$  กับหมู่  $-NH_2$  ที่อยู่ใกล้กัน ในกระบวนการมีการสูญเสียปริมาณ  $-NH_2$  อิสระเพียง 1 หมู่เท่านั้น ในขณะที่การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ การเชื่อมขวางเกิดจากหมู่  $-CHO$  ของกลูตารัลดีไฮด์ 1 โมเลกุล ทำปฏิกิริยากับหมู่  $-NH_2$  2 หมู่ จึงทำให้การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์แสดงปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระน้อยกว่า

รูปที่ 4.9 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และการเชื่อมขวางด้วยความร้อน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีค่าลดลงมากกว่าการเชื่อมขวางด้วยความร้อนอย่างมีนัยสำคัญแสดงถึงความสามารถในการเชื่อมขวางที่สูงกว่าสำหรับอนุภาคไมโครที่มีองค์ประกอบของไฟโบรอินสูง ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวางมีปริมาณต่ำกว่าอนุภาคที่มีองค์ประกอบของเจลาตินสูง ทำให้อนุภาคไมโครอัตราส่วนผสม 50/50 ที่

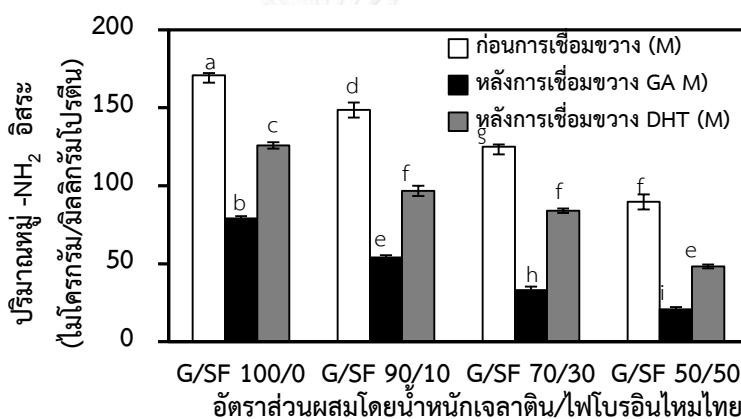
ผ่านการเชื่อมขวางทั้งสองวิธี มีร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระเริ่มต้นของอนุภาคชนิดดังกล่าวมีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระเริ่มต้นของอนุภาคไมโครที่อัตราส่วนผสมอื่นๆ โดยสภาวะการเชื่อมขวางมีการใช้กลูตารัลดีไฮด์หรือความร้อนเท่าๆกันในทุกกลุ่ม ทำให้อัตราการเชื่อมขวางสำเร็จสูงกว่าอนุภาคไมโครเจลาติน (100/0) ที่มีปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระเริ่มต้นสูงที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้ศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าอนุภาคไมโครเจลาติน (100/0) มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุด เนื่องจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่มีในองค์ประกอบของเจลาตินมีมากกว่าหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคผสม โดยปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินในอนุภาคไมโคร สำหรับร้อยละการเชื่อมขวาง พบว่าอนุภาคไมโครของเจลาติน (100/0) และอนุภาคไมโครที่อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน 30/70 มีค่าน้อยที่สุดประมาณ 20-25% ส่วนอนุภาคไมโครที่ปริมาณไฟโบรอินมากจะมีร้อยละการเชื่อมขวางที่สูง ซึ่งอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินต่อไฟโบรอิน 50/50 และ 30/70 มีค่าการเชื่อมขวางประมาณ 44-55% ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าอนุภาคไมโครของสารผสมมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางมากกว่าอนุภาคไมโครที่มีปริมาณเจลาตินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากความหนาแน่นหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคไมโครเจลาตินที่มากเกินไป ส่งผลให้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางต่ำ [Ratanavaraporn J. และคณะ 2013]



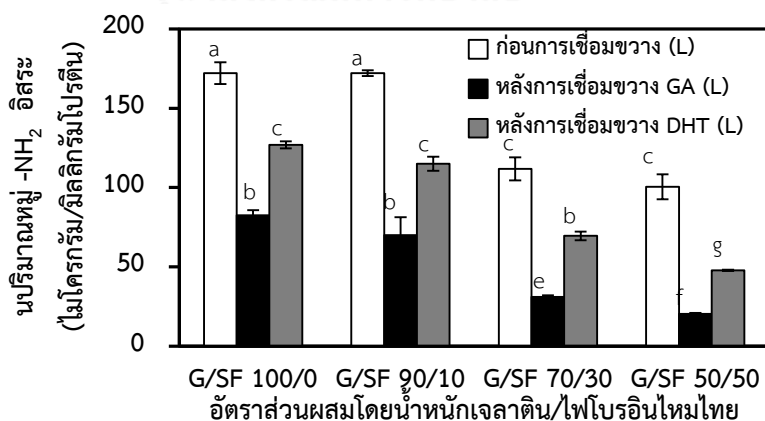
(ก)



(ข)

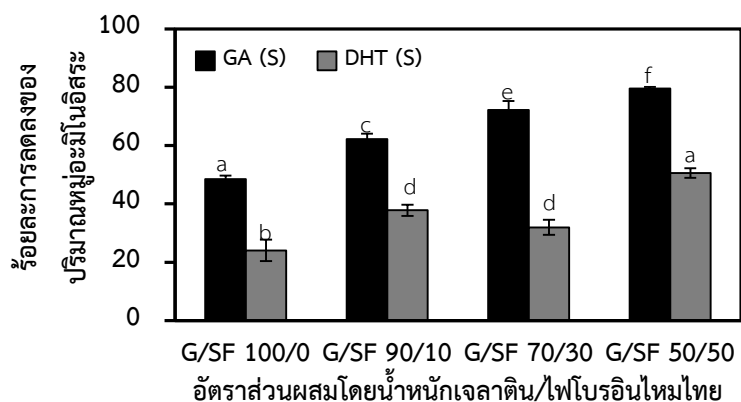


(ค)

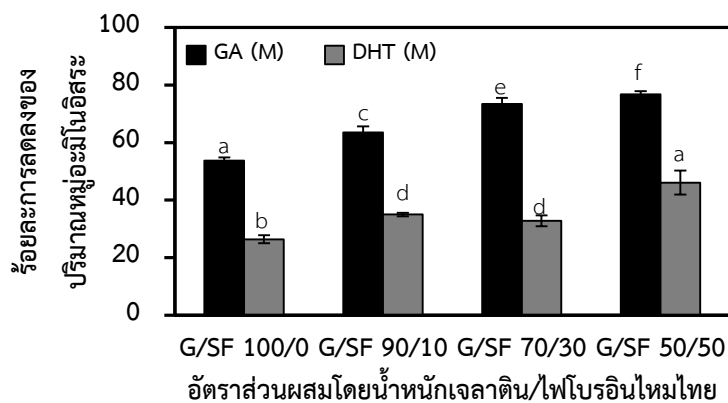


รูปที่ 4.8 ปริมาณอะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA และการเชื่อมขวางด้วย DHT (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a-h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

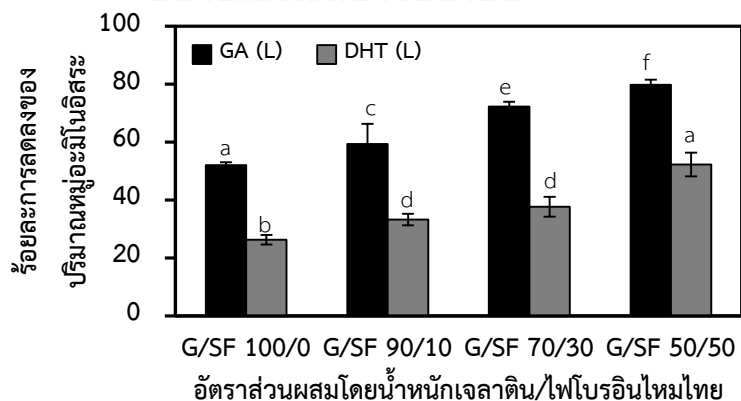
(ก)



(ข)



(ค)



**รูปที่ 4.9** ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (GA) และการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (DHT) (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

### ค. ความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโคร

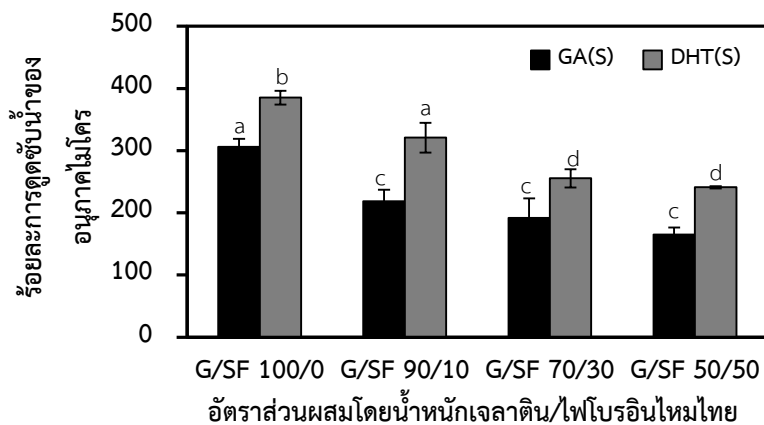
ความสามารถในการดูดซับน้ำเป็นลักษณะสมบัติของอนุภาคไมโครที่บอกถึงร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโคร ซึ่งการทดสอบสมบัติการดูดซับน้ำทำได้โดยวัดน้ำหนักของอนุภาคไมโครเปียกภายหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับน้ำหนักอนุภาคไมโครแห้ง โดยแสดงในรูปร้อยละการดูดซับน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาอัตราส่วนผสมระหว่าง เจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่แตกต่างกัน จะพบว่าความสามารถในการดูดซับน้ำมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอนุภาคไมโครเจลาตินมีร้อยละการดูดซับน้ำสูงที่สุด เนื่องจากธรรมชาติของ เจลาตินสามารถละลายน้ำได้ดี มีความชอบน้ำสูง และการเพิ่มอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินในอนุภาค ทำให้เพิ่มความคงตัวของอนุภาคไมโครในสารละลายบัฟเฟอร์ได้ ดังนั้นร้อยละการดูดซับน้ำจึงมีค่าลดลง สอดคล้องกับผลการศึกษาร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในหัวข้อที่ผ่านมา พบว่าค่าร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระต่ำ ส่งผลให้ร้อยละการดูดซับน้ำมีค่าสูง

เมื่อวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคไมโคร พบว่าการเชื่อมขวางอนุภาคไมโครทุกขนาด และทั้งสองวิธีการเชื่อมขวาง มีค่าร้อยละการดูดซับน้ำที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนผสมของอนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินมีผลต่อความสามารถของการดูดซับน้ำมากกว่าผลจากขนาดและการเชื่อมขวาง

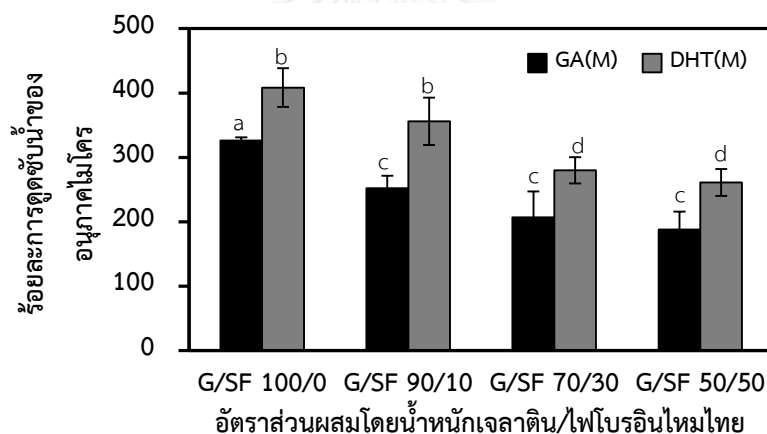
Muvaffak A. และคณะ 2004 มีการรายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางจะทำให้การเชื่อมขวางของพันธะภายในอนุภาคไมโครเจลาตินเพิ่มขึ้น แต่ความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครลดลง และรายงานของ Bigi, A และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาค่าการดูดซับน้ำของฟิล์มเจลาตินชนิดเอที่ทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยศึกษาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ (0.05-2.5 % โดยน้ำหนัก) และหาร้อยละของการเชื่อมขวาง ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีการหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยวิธี TNBS พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ต่ำ (0.05 % โดยน้ำหนัก) จะได้ค่าร้อยละของการเชื่อมขวางประมาณ 60% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์มากกว่า 1 % โดยน้ำหนัก ค่าร้อยละการเชื่อมขวางที่ได้เข้าใกล้ 100% แต่อัตราการดูดซับน้ำจะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่ม

ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ จึงกล่าวได้ว่าร้อยละการดูดซับน้ำมีผลมาจากร้อยละการเชื่อมขวาง หรือร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้

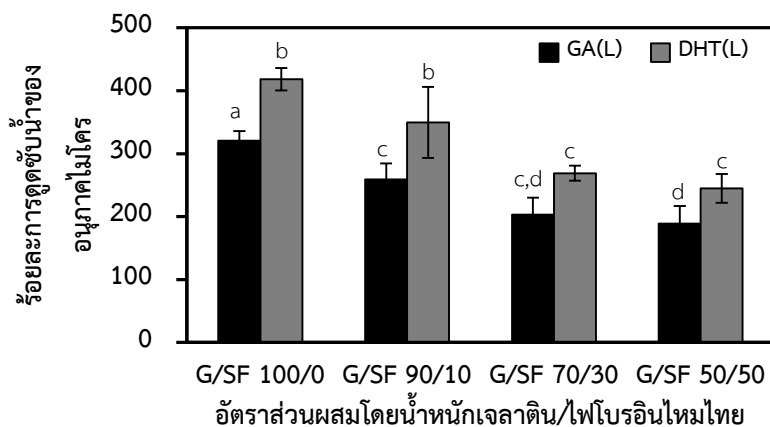
(ก)



(ข)



(ค)



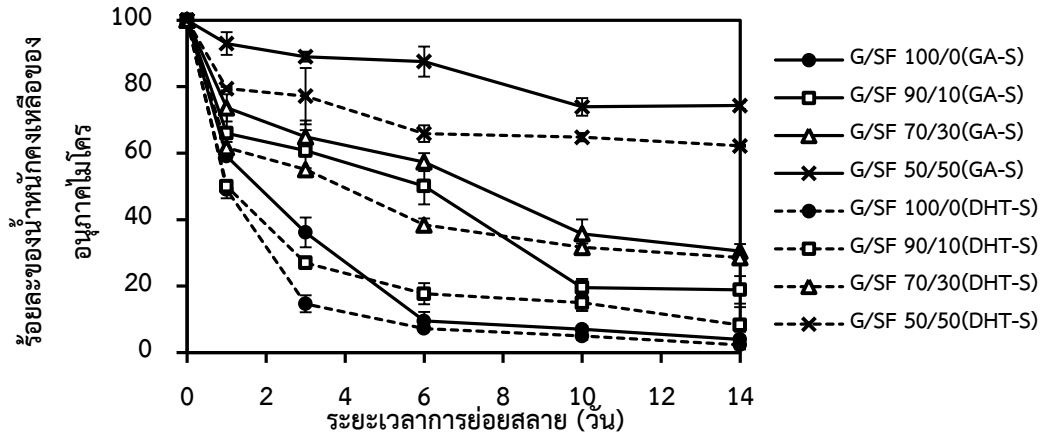
รูปที่ 4.10 ร้อยละการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย (GA) และการเชื่อมขวางด้วย (DHT) (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

### ง. การย่อยสลายทางชีวภาพนอกร่างกาย

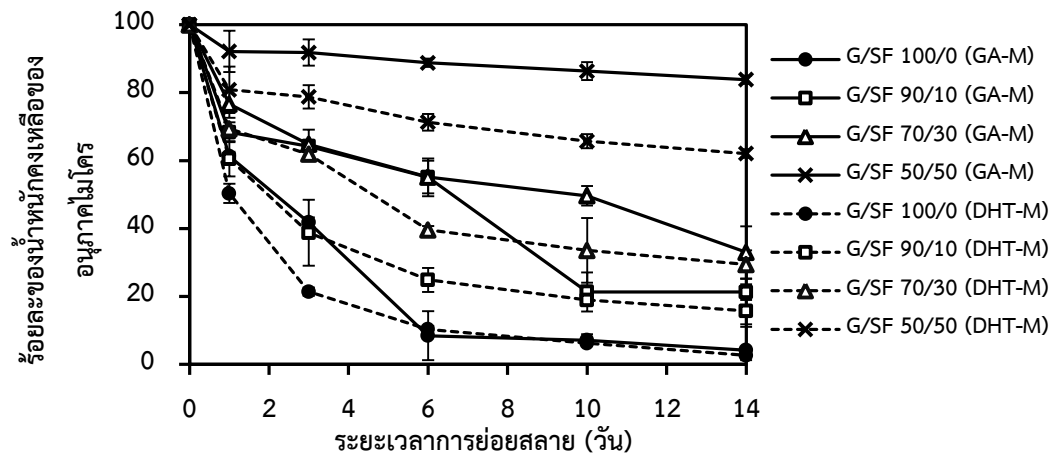
การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพนอกร่างกายของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยโดยไซเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) เพื่อหาร้อยละของน้ำหนักที่หายไปเทียบกับเวลาของการย่อยสลาย โดยการนำอนุภาคไมโครไปแช่ในสารละลายไซเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 163 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.4 และสารละลายโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร [Jetbumpenkul P. และคณะ 2012] อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

รูปที่ 4.11 แสดงร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางทั้งสองวิธีที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ พบว่า เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครที่ประกอบด้วยเจลาตินอย่างเดียว (100/0) มีร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และความร้อนน้อยที่สุดเท่ากับ  $3.93 \pm 0.98$ ,  $2.30 \pm 0.29$  (ขนาด S),  $4.17 \pm 1.20$ ,  $2.64 \pm 1.26$  (ขนาด M) และ  $5.73 \pm 4.54$ ,  $4.56 \pm 0.78$  (ขนาด L) ตามลำดับ นั่นแสดงถึงอัตราการย่อยสลายที่สูง ซึ่งอัตราการย่อยสลายสูงนั้นเป็นผลจากมีองค์ประกอบของเจลาตินในอนุภาคไมโครมาก โดยการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสจะมีจำเพาะต่อการย่อยโปรตีนคอลลาเจนและเจลาติน ส่งผลให้เมื่อเพิ่มปริมาณเจลาตินทำให้มีอัตราการย่อยสลายที่เร็ว สำหรับร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 50/50 มีร้อยละคงเหลือของการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และด้วยความร้อนมากที่สุดเท่ากับ  $74.33 \pm 2.32$ ,  $62.18 \pm 1.38$  (ขนาด S),  $83.81 \pm 6.88$ ,  $62.06 \pm 1.44$  (ขนาด M) และ  $82.59 \pm 4.62$ ,  $63.43 \pm 7.31$  (ขนาด L) ตามลำดับ กล่าวคือ เมื่อปริมาณไฟโบรอินเพิ่มขึ้น อัตราการย่อยสลายช้าลง เนื่องจากเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยมีความแข็งแรงสูง และไฟโบรอินยังมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ ส่งผลให้มีการย่อยสลายที่ช้ากว่าเมื่อเทียบกับอัตราส่วนการผสมอื่นๆ นอกจากนี้การย่อยสลายช้าของอัตราส่วนผสมที่ประกอบด้วยไฟโบรอินมาก มีผลมาจากการเลือกชนิดของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเจลาตินมากกว่าไฟโบรอิน จึงทำให้ไฟโบรอินมีอัตราการย่อยสลายที่ช้า

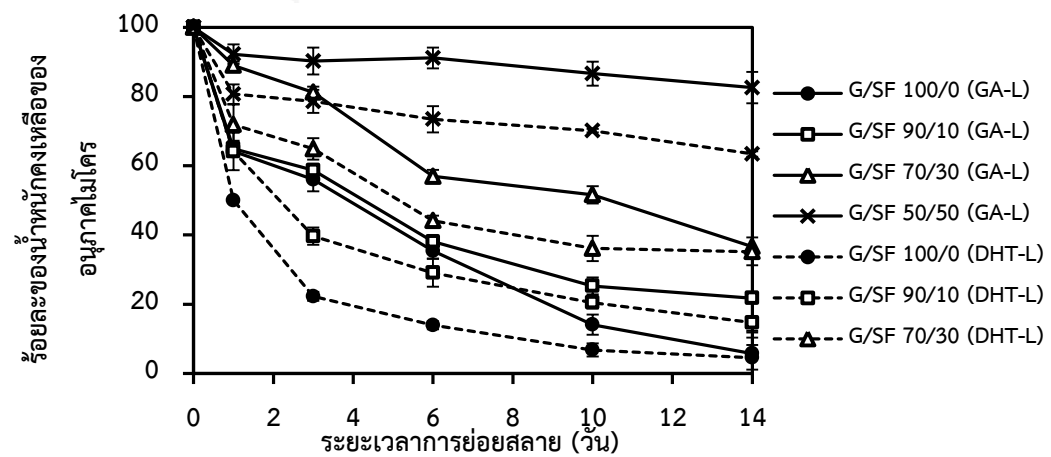
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 4.11 ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยอัตราส่วนผสมต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA และเชื่อมขวางด้วย DHT (ก) อนุภาคขนาด S (ข) อนุภาคขนาด M (ค) อนุภาคขนาด L

รายงานของ Ma L. และคณะ (2003) ได้รายงานผลของการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนและโคไคซานด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ พบว่าเมื่อร้อยละการเชื่อมขวางสูงขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรง ทำให้การย่อยสลายเกิดได้ช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Xiao W. และคณะ (2012) ได้ศึกษาการย่อยสลายของไฮโดรเจลเจลาตินผสมไฟโบรอิน พบว่าไฮโดรเจลที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายเงินฟีนมีอัตราการย่อยสลายต่ำ เนื่องจากมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางสูง และรายงานของ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) พบว่าแผ่นเส้นใยเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ1 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร และมีความหนา 2 มิลลิเมตร ที่ไม่ผ่านและผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC/NHS ซึ่งแผ่นเส้นใย เมื่อทดสอบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิกรัม พบว่าแผ่นเส้นใยที่ผ่านการเชื่อมขวางมีร้อยละน้ำหนักคงเหลือของการย่อยสลายมากกว่าแผ่นเส้นใยที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวาง นอกจากนี้อัตราส่วนผสมต่างๆ ของแผ่นเส้นใยยังมีผลต่อการย่อยสลาย กล่าวคือทั้งแผ่นเส้นใยที่ไม่ผ่านและผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS ที่มีอัตราส่วนผสมของเจลาตินมากกว่า จะมีอัตราการย่อยสลายที่สูง โดยย่อยสลายเร็วหมดภายใน 1 ชั่วโมงแรก และภายหลังการทดสอบที่เวลา 168 ชั่วโมง แผ่นเส้นใยที่มีอัตราส่วนผสมของปริมาณไฟโบรอินมาก จะมีร้อยละของน้ำหนักคงเหลือลดลงเพียง 10 เท่านั้น แสดงถึงการย่อยสลายที่ช้า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้รายงานผลการศึกษากการย่อยสลายนอกร่างกายของอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาตินและไฟโบรอินที่เตรียมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (ขนาดอนุภาค 197-217 ไมโครเมตร) พบว่าการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 163 หน่วยต่อมิลลิกรัมที่พีเอช 7.4 มีอัตราการย่อยสลายต่ำ เมื่อมีร้อยละการเชื่อมขวางที่สูง โดยอนุภาคไมโครที่มีปริมาณไฟโบรอินมาก (30/70) ที่มีร้อยละการเชื่อมขวางสูง นั้นแสดงถึงการย่อยสลายที่ช้าของอนุภาคไมโคร

เมื่อพิจารณาร้อยละของน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยทั้งสองวิธีการเชื่อมขวาง พบว่าอนุภาคไมโครขนาด S, M และ L ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีค่าร้อยละของน้ำหนักคงเหลือน้อยกว่าอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ แสดงถึงอัตราย่อยสลายที่สูง คิดเป็นร้อยละการย่อยสลายประมาณ 95-97 (ตารางที่ 4.6) ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าร้อยละ

การลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของการเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีประสิทธิภาพการเชื่อมขวางที่ต่ำกว่ากลูตารัลดีไฮด์ [Bigi, A (2001), Ratanavaraporn J. และคณะ (2006)]

จากผลการย่อยสลายของอนุภาคไมโครเจลาคินและไฟโบรอินใหม่ไทยสามารถแสดงในรูปของค่าการย่อยสลายครึ่งชีวิต (haft life,  $t_{1/2}$ ) แสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่า อนุภาคไมโครเจลาคินและไฟโบรอินที่อัตราส่วนผสม 50/50 มีค่าครึ่งชีวิตที่สูงสุดที่เวลาประมาณ 4-64 วัน แสดงถึงการย่อยสลายช้าเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครที่อัตราส่วนผสมอื่นๆ และเมื่อพิจารณาที่ขนาดอนุภาคเดียวกันพบว่า อนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีค่าครึ่งชีวิตที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อน แสดงให้เห็นว่าอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีการย่อยสลายที่ช้า

**ตารางที่ 4.6** ร้อยละการย่อยสลายของอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และด้วยความร้อนหลังแช่ในเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 163 หน่วยต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.4 เป็นเวลา 14 วัน

ตัวอย่าง G/SF	ร้อยละการย่อยสลายของอนุภาคไมโคร					
	การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์			การเชื่อมขวางด้วยความร้อน		
	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L
100/0	96.07 <sup>a</sup>	95.83 <sup>a</sup>	94.27 <sup>a</sup>	97.70 <sup>h</sup>	97.36 <sup>h</sup>	95.44 <sup>a</sup>
90/10	81.13 <sup>b</sup>	78.70 <sup>e</sup>	78.23 <sup>e</sup>	91.73 <sup>i</sup>	84.25 <sup>l</sup>	85.35 <sup>l</sup>
70/30	69.49 <sup>c</sup>	67.04 <sup>c</sup>	63.38 <sup>s</sup>	71.42 <sup>j</sup>	70.61 <sup>j</sup>	64.82 <sup>m</sup>
50/50	25.67 <sup>d</sup>	16.19 <sup>f</sup>	17.41 <sup>f</sup>	37.82 <sup>k</sup>	37.94 <sup>k</sup>	36.57 <sup>k</sup>

**ตารางที่ 4.7** ค่าครึ่งชีวิต (haft life,  $t_{1/2}$ ) ของการย่อยสลายของอนุภาคไมโครที่แช่ในเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 163 หน่วยต่อมิลลิลิตรพีเอช 7.4 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน

ตัวอย่าง G/SF	ค่าครึ่งชีวิตของการย่อยสลาย (วัน)					
	การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์			การเชื่อมขวางด้วยความร้อน		
	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L
100/0	1.53 <sup>a</sup>	1.77 <sup>e</sup>	2.12 <sup>h</sup>	0.74 <sup>k</sup>	0.81 <sup>l</sup>	0.80 <sup>l</sup>
90/10	5.11 <sup>b</sup>	5.49 <sup>b</sup>	4.47 <sup>i</sup>	0.84 <sup>l</sup>	1.67 <sup>o</sup>	1.97 <sup>f</sup>
70/30	7.49 <sup>c</sup>	8.70 <sup>f</sup>	10.59 <sup>j</sup>	2.86 <sup>m</sup>	3.92 <sup>p</sup>	4.92 <sup>u</sup>
50/50	25.81 <sup>d</sup>	64.14 <sup>s</sup>	60.84 <sup>s</sup>	4.23 <sup>n</sup>	21.11 <sup>q</sup>	24.64 <sup>d</sup>

(a-u แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )



## 4.2 สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูและเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ

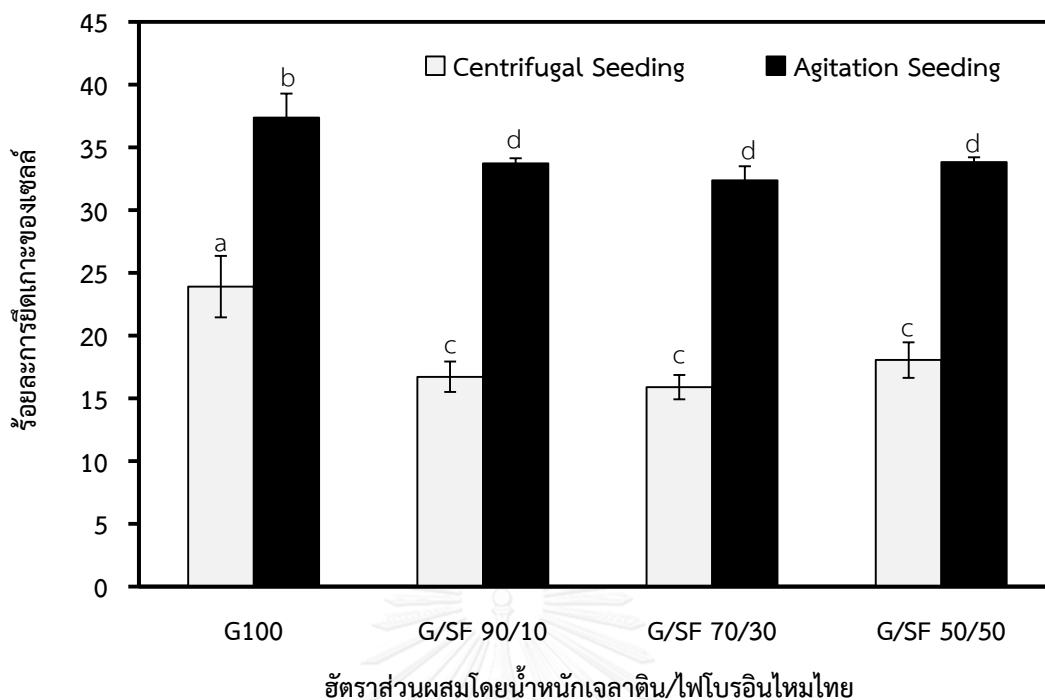
การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Mesenchymal stem cells, MSC) และเซลล์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cell, MCF-7) บนอนุภาคไมโครเจลลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาต้นแบบและระบบการเลี้ยงแบบสามมิตินอกร่างกาย โดยศึกษาผลของความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆของอนุภาค ขนาดของอนุภาค และการเชื่อมขวางที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ เพื่อพัฒนากระบวนการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งนอกร่างกาย ซึ่งการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7 ชั้นเริ่มต้นนี้ได้ทำการเลือกอนุภาคไมโครเจลลาตินขนาด M ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มาทำการทดลองศึกษาวิธีการยึดเกาะของเซลล์ และมีขนาดเฉลี่ย  $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร เพื่อหาอัตราส่วนผสมระหว่างเจลลาตินและไฟโบรอินที่ส่งเสริมการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของขนาดและการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครเจลลาติน ซึ่งจากรายงานของ Zhu, X.H. และคณะ (2006) ได้ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 บนอนุภาคไมโครเจลลาตินที่เตรียมจากพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตที่เรดโคไฮดรอกซีวาลerate (poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) ขนาดประมาณ 300 – 500 ไมโครเมตร ผลการทดสอบพบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคขนาดดังกล่าวได้

### 4.2.1 การยึดเกาะของเซลล์ (attachment) บนอนุภาคไมโครเจลลาติน

การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) บนอนุภาคไมโครเจลลาตินที่อัตราส่วนการผสมระหว่างเจลลาตินและไฟโบรอินอัตราส่วนต่างๆ โดยทำการเปรียบเทียบการยึดเกาะ 2 วิธี คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการเขย่า (Agitation seeding) ซึ่งเป็นวิธีการนำเซลล์เพาะลงบนอนุภาคแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเชื้อที่มี 5 % CO<sub>2</sub> [Takahashi Y. และคณะ 2005] และวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugal Seeding) เป็นวิธีการเพาะเซลล์บนอนุภาคไมโครเจลลาตินแล้วนำไปปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 5 นาที ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำมาเลี้ยงต่อในเป็นเวลา 6 ชั่วโมง [Godbey W.T. และคณะ 2004] โดยใช้ความ

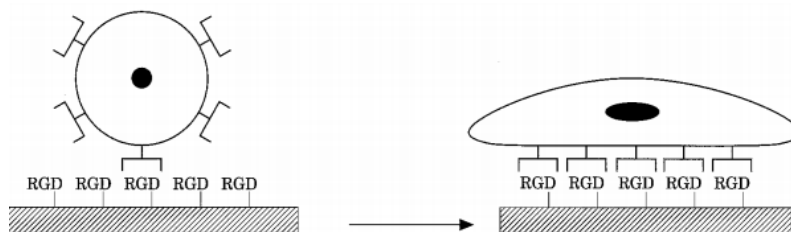
หนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $0.86 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมใน ( $9.26 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) cryo vial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เพื่อหาลักษณะการยึดเกาะของเซลล์

การเปรียบเทียบร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ MCF-7 หลังเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 6 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธี Agitation seeding ที่อัตราส่วนผสมเจลาตินอย่างเดียว (100/0) มีค่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์สูงที่สุดประมาณร้อยละ 37.39 ซึ่งมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอัตราส่วนผสมอื่นๆ และเมื่อเทียบกับวิธี Centrifugal seeding ที่อัตราส่วนของเจลาตินอย่างเดียว ซึ่งมีร้อยละการยึดเกาะประมาณ 23.91 และเมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสองวิธี พบว่าประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Agitation seeding มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ Centrifugal seeding ในทุกอัตราส่วนผสมของอนุภาคไมโคร ทั้งนี้เนื่องจากวิธี Agitation seeding ใช้แรงกลช่วยให้เซลล์มีโอกาสสัมผัสผิวอนุภาคอย่างต่อเนื่องนานกว่าอาจมีแนวโน้มให้เซลล์มีการยึดเกาะมากกว่า นอกจากนี้การใช้วัสดุ คือเจลาตินมาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเจลาตินและคอลลาเจนมีลำดับของหมู่อะมิโน RGD (Arg-Gly-Asp) หมู่อะมิโนดังกล่าวจะจับกับอินทีกรินที่อยู่บนเยื่อหุ้มของเซลล์ และทำให้เซลล์ยึดเกาะกับวัสดุได้ [Walluscheck K.P. และคณะ 1996] (รูปที่ 4.13) จึงทำให้วัสดุที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินอย่างเดียวและเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Agitation seeding มีอัตราการยึดเกาะของเซลล์สูงที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Vachiraroj N. และคณะ (2009) และ Sinlapabodin S. (2010) ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยที่เพาะเลี้ยงเซลล์วิธี Agitation seeding มีประสิทธิภาพสูงมีการกระจายตัวของเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ได้อย่างทั่วถึง และยังส่งเสริมการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าวิธี Centrifugal seeding



**รูปที่ 4.12** ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยขนาด M ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ โดยเปรียบเทียบร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ด้วยวิธี Centrifugal Seeding และวิธี Agitation Seeding เพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น  $0.86 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม (หรือ  $9.26 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo tube (a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

งานวิจัยนี้จึงเลือกวิธี Agitation seeding มาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อ เพื่อศึกษาความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จากรายงานของ Sahoo S.K. และคณะ (2005) รายงานว่าความหนาแน่นของเซลล์มีผลต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นมากเกินไป อาจมีข้อจำกัดของพื้นที่ผิวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทำให้เกิดระยะ log phase สั้นและเซลล์เจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ และความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่น้อยเกินไป ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ช้า เนื่องจากอัตราการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์เกิดช้า (cell-cell interaction) มีระยะ lag phase ที่ยาวขึ้น ดังนั้นความหนาแน่นของเซลล์จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ทั้งนี้การยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ยังขึ้นอยู่กับวัสดุนำมาผลิต พื้นที่ผิวสัมผัสด้วยเช่นกัน [Sahoo, S.K. และคณะ 2005]

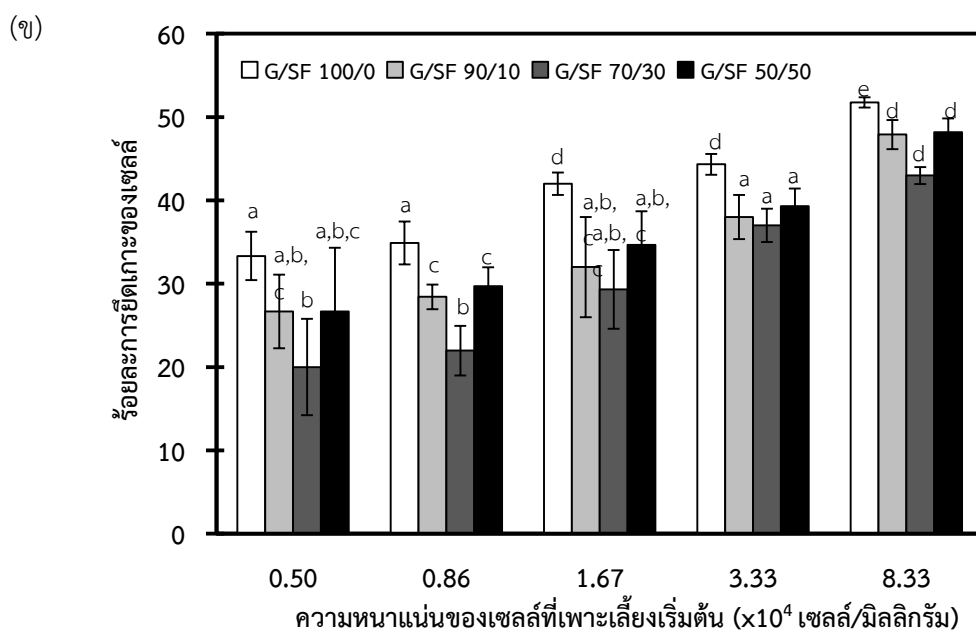
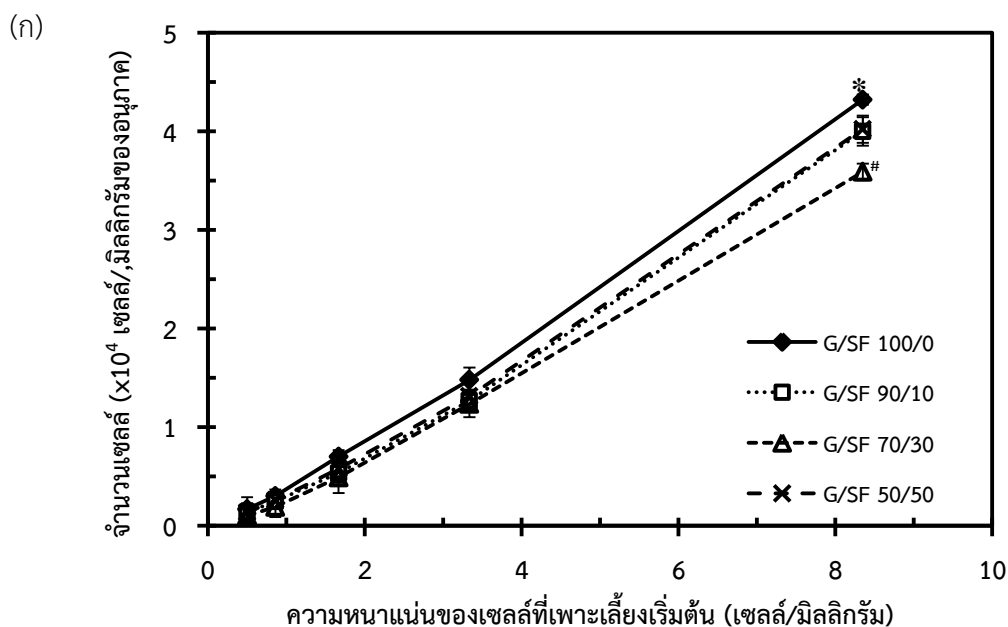


รูปที่ 4.13 อันตรกิริยาของเซลล์ที่กระทำกับหมู่ RGD ของบนพื้นผิวของวัสดุ

[Walluscheck K.P. และคณะ 1996]

การศึกษาผลของความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ทำโดยนำเซลล์มะเร็งเต้านมมาเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครที่อัตราส่วนการผสมต่างๆ ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจาก  $0.5 \times 10^4$ ,  $0.86 \times 10^4$ ,  $1.67 \times 10^4$ ,  $3.34 \times 10^4$  และ  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมของอนุภาคไมโครใน cryo vial ขนาด 1.8 มิลลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมในรูปของปริมาณเซลล์และร้อยละการยึดเกาะสำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอัตราส่วนผสมต่างๆ พบว่า อนุภาคที่อัตราส่วนของเจลาตินอย่างเดียว (100/0) มีปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะมากที่สุดเท่ากับ  $0.17 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $0.5 \times 10^4$ ),  $0.30 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $0.86 \times 10^4$ ),  $0.70 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $1.67 \times 10^4$ ),  $1.47 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $3.34 \times 10^4$ ) และ  $4.32 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $8.33 \times 10^4$ ) เมื่อเทียบกับอนุภาคที่มีอัตราส่วนผสมอื่นๆ และปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้น แสดงดังรูปที่ 4.14 (ก) เมื่อพิจารณาร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ ดังรูปที่ 4.14 (ข) พบว่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่  $1.67 \times 10^4$  จนกระทั่งถึง  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ไม่มีความแตกต่างของร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ในทุกอัตราส่วนผสม ขณะที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ต่ำกว่า  $1.67 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม มีร้อยละการยึดเกาะต่ำกว่า 42 ของทุกอัตราส่วนผสมของอนุภาคไมโคร โดยที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม อนุภาคที่มีอัตราส่วนเจลาตินอย่างเดียว (100/0) มีปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะมากและร้อยละการยึดเกาะที่สูงที่สุดเท่ากับ  $4.32 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม และ  $51.76 \pm 0.61$  ตามลำดับ เนื่องจากเจลาตินมีหมู่อะมิโน RGD เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนผสมของเจลาตินต่อไฟโบรอินและความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นอื่นๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมเนื่องจาก

มีค่าร้อยละการยึดของเซลล์เริ่มต้นที่เวลา 6 ชั่วโมงสูงสุด เพื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคไมโครโนลาคับต่อไป



รูปที่ 4.14 (ก) จำนวนเซลล์ (ข) ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงด้วย Agitation Seeding จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $0.5 \times 10^4$  ,  $0.86 \times 10^4$  ,  $1.67 \times 10^4$  ,  $3.34 \times 10^4$  และ  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ขนาด M) ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร (a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

## 4.2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) บนอนุภาคไมโคร

### 4.2.2.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนอนุภาคไมโคร

การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บนอนุภาคไมโครขนาด  $M$  ที่อัตราส่วนการผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินในอัตราส่วนต่างๆและผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์อนุภาคไมโครที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $0.86 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $9.26 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo vial ด้วยวิธี Agitation seeding เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อในสภาวะสถิตย์ และสามารถพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี DNA assay หลังจากเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ

จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ MSC บนอนุภาคไมโคร ดังแสดงรูปที่ 4.15 พบว่า เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มีผลมาจากการยึดเกาะเริ่มต้นของเซลล์ พิจารณาที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ Agitation seeding เซลล์มีโอกาสมัผัสผิวอนุภาคอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยแรงกลจากการเขย่าต่อเนื่องกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์มีการยึดเกาะมาก และจากวิธีนี้ทำให้ไม่พบช่วง Lag time ของการเจริญเติบโตของเซลล์ในการกระบวนเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ พบว่าเซลล์มีอัตราการยึดเกาะแบบ 2 มิติบนสภาพเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีนที่มีการยึดเกาะเซลล์มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติบนอนุภาคไมโครประมาณ 2-3 เท่า ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงสองวิธีไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง เนื่องจากการการเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น (ตารางที่ 4.10) และพื้นผิวของวัสดุที่ให้เซลล์ยึดเกาะที่ต่างกัน จึงทำให้ได้อัตราการยึดเกาะที่สูงหรือต่ำแตกต่างกันมาก เมื่อพิจารณาอัตราส่วนผสมต่างๆของอนุภาคไมโครสามมิติ (ตารางที่ 4.8) พบว่า อนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย 100/0 และ 50/50 มีร้อยละการยึดเกาะที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีร้อยละการยึดเกาะเท่ากับ  $54.0 \pm 12.7$  และ  $48.2 \pm 4.2$  ตามลำดับ

แม้ว่างานวิจัยนี้มีการใช้วัสดุเจลาตินเป็นหลักที่มีหมู่ RGD ช่วยในการเหนี่ยวนำการยึดเกาะของเซลล์ แต่กลับพบว่าร้อยละการยึดเกาะบนอนุภาคที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินแลไฟโบรอิน

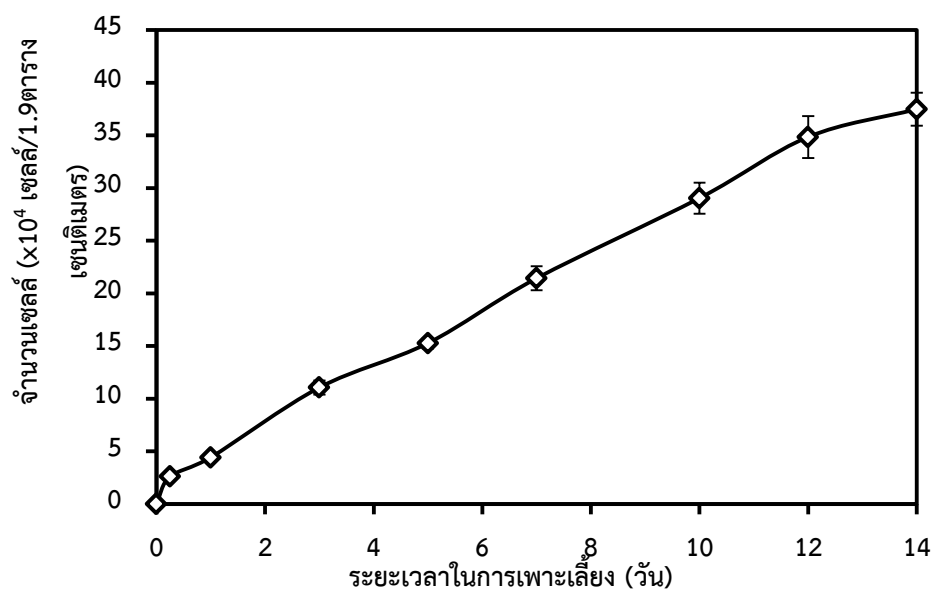
50/50 ที่ใกล้เคียงกับอนุภาคไมโครเจลลาติน (100/0) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสมดุลทางประจุของวัสดุ จึงส่งเสริมให้เซลล์มีร้อยละการยึดเกาะและเจริญเติบโตดี [Jetpumpenkul, P. และคณะ 2012] เมื่อพิจารณาช่วงการเจริญเติบโตในช่วง log phase ที่เวลา 1 ถึง 5 วัน ของการเพาะเลี้ยงพบว่าอนุภาคไมโครเจลลาตินที่อัตราส่วนผสม 100/0 มีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุด มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ  $8.3 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครเจลลาตินที่อัตราส่วนการผสมอื่นๆ และเวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของอนุภาคไมโครเจลลาติน (100/0) มีอัตราการแบ่งตัวเร็วใกล้เคียงกับอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอิน 50/50 มีค่าเท่ากับ  $90.9 \pm 4.6$  และ  $96.1 \pm 2.5$  ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีระยะเวลาในการแบ่งตัวเร็วอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคไมโครเจลลาตินที่มีอัตราส่วนผสมเจลลาตินและไฟโบรอิน 90/10 และ 70/30 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ต่ำกว่า ทำให้มีเวลาในการแบ่งตัวช้า แต่การที่อัตราการเจริญเติบโตต่ำนั้นการมีปริมาณเจลลาตินสูงขึ้นก็ไม่มีผลทำให้เซลล์เจริญเติบโตเร็ว เพราะการเจริญเติบโตของเซลล์มีผลมาจากร้อยละการยึดเกาะที่สูง ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาของการแบ่งตัวทวีคูณของการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ บนอนุภาคไมโครเจลลาติน ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์แบบ 2 มิติ เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้มากเฉพาะที่พื้นผิวของวัสดุแบบระนาบเดียวที่มีความแข็งสูง (Stiffness) ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการปรับสภาพพื้นผิวด้วยระบบออกซิเจนพลาสมา (Polystyrene plasma treated plate) ทำให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี [Nicolas, A. และคณะ 2004] เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติ เซลล์มีการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับพื้นผิวหรือเซลล์กับเซลล์ (cell-cell interactions) ที่ซับซ้อนกว่าและมีความแข็งต่ำกว่า อาจทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ใช้เวลานานและทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์บนงานเพาะเลี้ยงปกติหรือแบบสองมิติ แม้ว่าการเพาะเลี้ยงแบบสามมิติจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ แต่สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งานสามารถตอบสนองเป้าหมายในการติดตามผลการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ใกล้เคียงสภาวะจริงของเนื้อเยื่อร่างกายได้

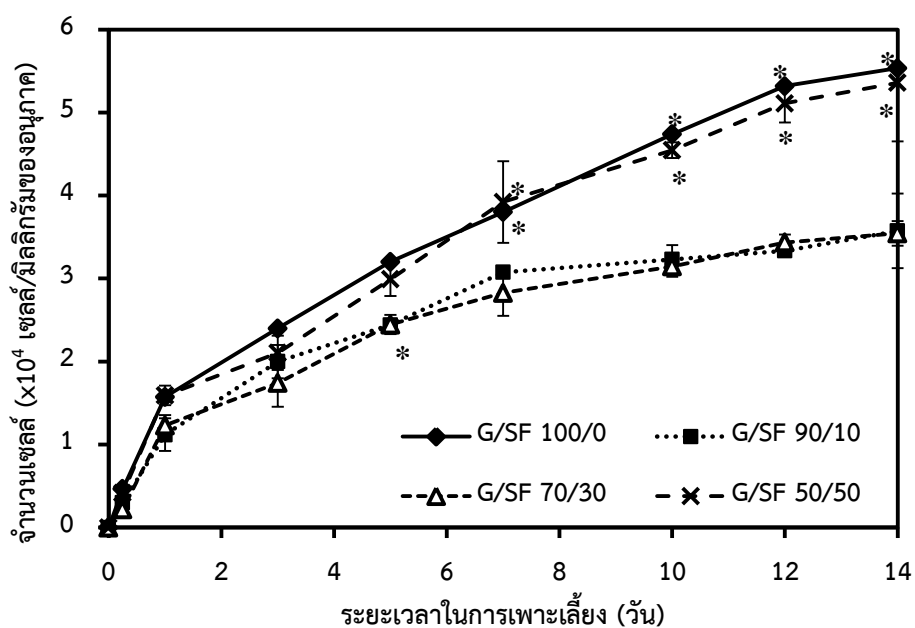
งานวิจัยของ Hayashi, K. และ Tabata, Y (2011) ได้ศึกษาระบบการเพาะเลี้ยง เซลล์แบบสามมิติโดยใช้อนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาตินชนิดเอและผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อน เพื่อศึกษาผลของการรวมกลุ่มของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) พบว่าจำนวนของอนุภาค ไมโคร ( $1 \times 10^4$  อนุภาค) ขนาดเฉลี่ยของอนุภาค  $106.8 \pm 17.8$  ไมโครเมตร มีอัตราการเจริญเติบโตสูง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนอนุภาคและขนาดอนุภาคอื่นๆ เนื่องจากมีขนาด และจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมนอกจากนี้เซลล์ยังได้รับสารอาหารและออกซิเจนเพียงพอส่งผลให้เซลล์ เจริญเติบโตได้ดี โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $20.27 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัว ทีวีคูณเท่ากับ 34.02 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ โดยเปรียบเทียบเฉพาะอนุภาคไมโคร เจลาตินอย่างเดียว ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทีวีคูณน้อยกว่าถึง 3 เท่า อาจเนื่องจากปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดใหญ่กว่า (ขนาดเฉลี่ย  $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) วิธีการเชื่อมขวาง ชนิดของเซลล์ที่ใช้ อาจทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์มีอัตราที่เร็วและช้าต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลในงานวิจัยนี้สามารถแสดงแนวโน้มการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาวได้



(ก)



(ข)



รูปที่ 4.15 (ก) จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ความหนาแน่นเซลล์  $1.05 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (ข) จำนวนเซลล์ MSC ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) หลังจากการทดสอบการยึดเกาะ โดยใช้วิธี Agitation Seeding จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $0.86 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม (หรือ  $9.26 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร

**ตารางที่ 4.8** ร้อยละการยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาของการแบ่งตัวเป็นทวีคูณ (PDT) หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูเป็นเวลา 14 วัน (คำนวณจากรูปที่ 4.16)

จลนศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์	เพาะบนภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ*	อนุภาคไมโครเจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทย			
		100/0	90/10	70/30	50/50
ร้อยละการยึดเกาะ	130.6±16.4	54.0±8.5 <sup>a</sup>	34.6±7.7 <sup>b</sup>	25.4±6.8 <sup>b</sup>	48.2±4.2 <sup>a</sup>
ความหนาแน่นสูงสุดของเซลล์ (เซลล์/มิลลิกรัม)	18.9×10 <sup>4**</sup>	5.5 ×10 <sup>4c</sup>	3.5 ×10 <sup>4d</sup>	3.5 ×10 <sup>4d</sup>	5.3 ×10 <sup>4c</sup>
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ*** (ต่อชั่วโมง)	25.8×10 <sup>-3</sup>	8.3×10 <sup>-3e</sup>	6.7×10 <sup>-3h</sup>	7.0×10 <sup>-3g</sup>	7.4×10 <sup>-3f</sup>
เวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ*** (ชั่วโมง)	26.9±13.0	90.9±4.6 <sup>i</sup>	103.9±4.8 <sup>j</sup>	99.2±1.9 <sup>j</sup>	96.1±2.5 <sup>i</sup>

\* การเพาะเลี้ยงบนภาชนะเลี้ยงพอลิสไตรีนแบบ 24 หลุม โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $1.05 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร คำนวณจากรูปที่ 4.16ก.

\*\* ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดของการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติมีหน่วยเป็นเซลล์ต่อตารางเซนติเมตร

\*\*\*อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ คำนวณจากช่วงการเจริญเติบโตช่วง log phase วันที่ 1 ถึง 5 ของการเพาะเลี้ยง

(a-j แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

#### 4.2.2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโคร

##### ก. ผลของอัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยต่อการ

##### เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม

การศึกษาผลของอัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีต่อเซลล์มะเร็งเต้านม โดยเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $89.86 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo vial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Agitation seeding เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อในสภาวะสัทธิย์ที่เวลาต่างๆ และศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay

จลนศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 บนอนุภาคไมโคร ดังตารางที่ 4.9 พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการวิธี Agitation seeding ที่เวลา 6 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครทุกอัตราส่วนผสม มีร้อยละการยึดเกาะอยู่ระหว่าง 41-51 โดยมีร้อยละการยึดเกาะของเซลล์สูงสุด โดยที่อนุภาคไมโครที่มีเจลาตินอย่างเดียว (100/0) มีค่าเท่ากับ  $51.8 \pm 1.6$  มีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอัตราส่วนการผสมอื่นๆ และรองลงมาคืออนุภาคที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอิน 50/50, 90/10 และ 70/30 มีร้อยละการยึดเกาะเท่ากับ  $47.7 \pm 1.1$ ,  $47.1 \pm 0.3$  และ  $41.4 \pm 0.7$  ตามลำดับ จากความแตกต่างของร้อยละการยึดเกาะของเซลล์แสดงให้เห็นว่าเจลาตินซึ่งประกอบด้วยลำดับอะมิโน RGD ที่ส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ มีผลสอดคล้องกับอัตราส่วนของอนุภาคไมโครที่มีเจลาตินเจลาตินเป็นองค์ประกอบ โดยอนุภาคไมโครที่มีปริมาณเจลาตินมาก ส่งผลให้เซลล์เกิดการยึดเกาะได้ดี นอกจากนี้ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ยังอธิบายได้ด้วยสมบัติทางเคมีพื้นผิวของวัสดุ โดยวัสดุที่มีความชอบน้ำมากเซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี [Yang และคณะ 2004] จากรายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2003) ได้รายงานผลของค่ามุมสัมผัสน้ำบนฟิล์มเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินมีค่าเท่ากับ  $59 \pm 2.1$  องศา และค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินผสมกับไฟโบรอินมีค่ามุมสัมผัสน้ำอยู่ระหว่าง 63.6-67.7 องศา แสดงให้เห็นว่าเจลาตินมีสมบัติความชอบน้ำ (Hydrophilic) มากกว่าจึงทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี

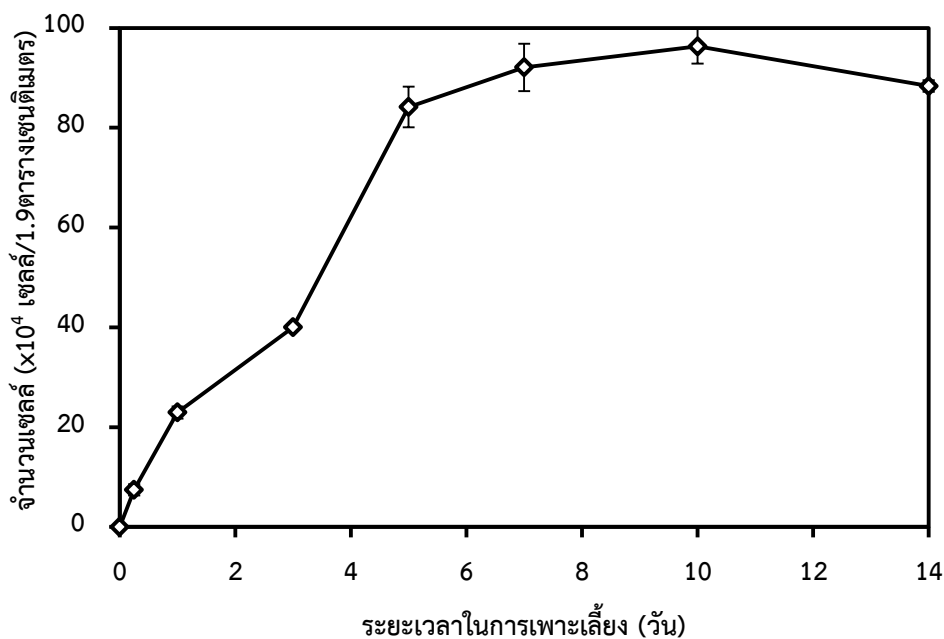
เมื่อพิจารณาช่วงการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วง log phase ที่เวลา 3 - 7 วัน (รูปที่ 4.16) พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครที่มีเจลาตินเพียงอย่างเดียว (100/0) เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $4.2 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง มีค่าสูงกว่าอนุภาคไมโครที่อัตราส่วนผสมอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ และอนุภาคไมโครอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอิน ไหมไทย 90/10 และ 50/50 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่เท่ากันคือ  $4.1 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง แต่พบว่าเวลาของการแบ่งตัวทวีคูณของอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอิน 100/0, 90/10 และ 50/0 มีอัตราของแบ่งตัวเร็วที่ใกล้เคียงกันเท่ากับ  $165.8 \pm 10.2$ ,  $170.9 \pm 1.2$  และ  $168.6 \pm 22.2$  ชั่วโมง โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราส่วนผสม 70/30 มีอัตราของแบ่งตัวช้าที่สุดเท่ากับ  $217.3 \pm 16.4$  ชั่วโมง เมื่อพิจารณาหลังการเพาะเลี้ยง 10 วัน เซลล์เข้าสู่กระบวนการตาย โดยอนุภาคไมโครอัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 แนวโน้มการลดลงของเซลล์เป็นแบบคู่ขนานเรื่อยๆ จากผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์สามารถอธิบายได้จากการยึดเกาะของเซลล์ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยที่อัตราการยึดเกาะของเซลล์สูง ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดี

รายงานของ Zhu, X.H. และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 บนอนุภาคไมโครที่เตรียมจากพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) มีขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 153 - 361 ไมโครเมตร เซลล์ MCF-7 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $8.87 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 78.09 ชั่วโมง ซึ่งการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาดเล็ก (ขนาด 153 ไมโครเมตร) ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดี และรายงานของ Sahoo และคณะ 2008 ซึ่งได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cells) บนโครงเลี้ยงเซลล์อนุภาคไมโครที่ผลิตจากพอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid, PLA) ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วย PVA ผสมกับโคโตะซาน ขนาดของอนุภาคไมโครอยู่ระหว่าง 150 - 170 ไมโครเมตร พบว่า เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ PLA ได้ดี โดยอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ  $6.32 \times 10^{-2}$  ต่อชั่วโมง และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 100.6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาติน

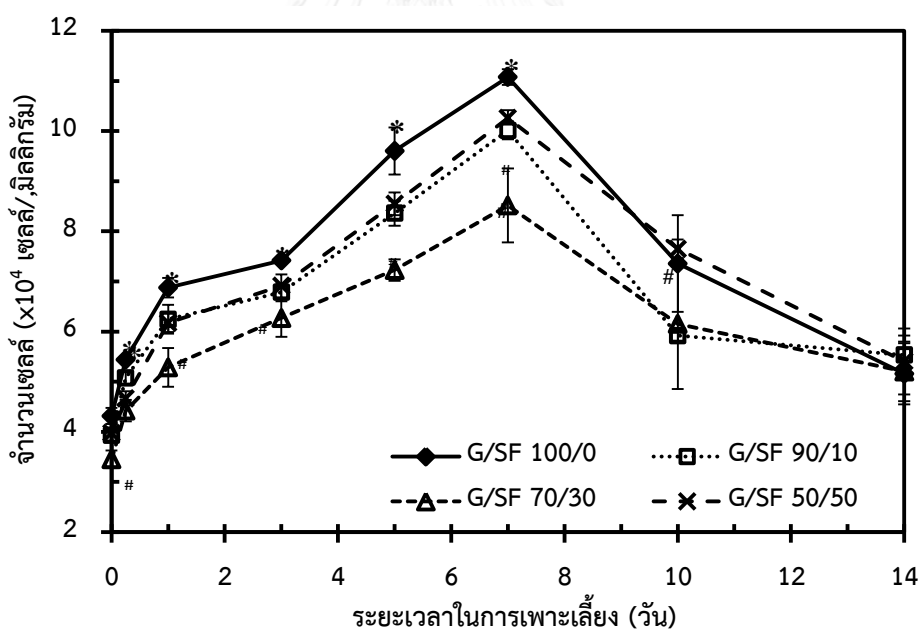
และไฟโบรอินในงานวิจัยนี้ตามตารางที่ 4.9 พบว่าอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาตินและไฟโบรอินมี อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวที่ค่อนน้อยกว่า อาจเนื่องมาจากขนาดของอนุภาคที่ใหญ่กว่า และลักษณะพื้นผิวของอนุภาคไมโครมีลักษณะพื้นผิวเรียบ ดังนั้นเซลล์จึงมีอัตราการยึดเกาะ และเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครที่มีลักษณะพื้นผิวที่ขรุขระ นอกจากนี้อาจมี ปัจจัยในการเพาะเลี้ยงอื่นๆ เช่น ชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง จำนวน passage ของเซลล์ ซึ่งถือเป็นปัจจัยที่ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงหรือต่ำแตกต่างกัน

การพิจารณาเลือกอัตราส่วนผสมของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินที่เหมาะสม เพื่อ ศึกษาตัวแปรของขนาดและวิธีการเชื่อมขวาง จากการศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ในหัวข้อ 4.1 พบว่า อัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 ซึ่งมีผลของอัตราการย่อยสลายที่สูงและต่ำแตกต่างกันมาก แต่ เมื่อทำการทดสอบสมบัติความเข้ากันได้กับเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่าอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสม ทั้งสอง มีค่าร้อยละการยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวเร็วใกล้เคียงกัน ทั้งนี้จึงทำการเลือกอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอิน 100/0 และ 50/50 ไป ทำการศึกษาในลำดับต่อไป

(ก)



(ข)



**รูปที่ 4.16** (ก) จำนวนเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ความหนาแน่นเซลล์  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (ข) จำนวนเซลล์ MCF-7 ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาด M (520 - 585 ไมโครเมตร) หลังจากการทดสอบการยึดเกาะโดยใช้วิธี Agitation Seeding จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม (หรือ  $89.86 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร

**ตารางที่ 4.9** ร้อยละการยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และเวลาของการแบ่งตัวเป็นทวีคูณ (PDT) หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7 เป็นเวลา 14 วัน (คำนวณจากรูปที่ 4.17)

จลนศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์	เพาะบนภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ*	อนุภาคไมโครเจลลาติน/ไฟโบรอินไหมไทย			
		100/0	90/10	70/30	50/50
ร้อยละการยึดเกาะ	97.8±14.5	51.8±1.6 <sup>a</sup>	47.1±0.3 <sup>b</sup>	41.4±0.7 <sup>c</sup>	47.7±1.1 <sup>b</sup>
ความหนาแน่นสูงสุดของเซลล์ ( $\times 10^4$ เซลล์/มิลลิกรัม)	50.7 <sup>**</sup>	11.1 <sup>d</sup>	10.0 <sup>e</sup>	8.5 <sup>f</sup>	10.3 <sup>e</sup>
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ*** ( $\times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง)	15.4	4.2 <sup>g</sup>	4.1 <sup>h</sup>	3.2 <sup>i</sup>	4.1 <sup>h</sup>
เวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ*** (ชั่วโมง)	44.7±3.3	165.8±10.2 <sup>j</sup>	170.9±1.2 <sup>j</sup>	217.3±16.4 <sup>k</sup>	168.6±22.2 <sup>j</sup>

\* การเพาะเลี้ยงบนภาชนะเลี้ยงพอลิสไตรีนแบบ 24 หลุม โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร

\*\* ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดของการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติมีหน่วยเป็นเซลล์ต่อตารางเซนติเมตร

\*\*\* อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ คำนวณจากช่วงการเจริญเติบโตช่วง log phase วันที่ 3 ถึง 7 ของการเพาะเลี้ยง

(a-m แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

## ข. ผลของขนาดอนุภาคและการเชื่อมขวางอนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินไหม ไทยต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม

การศึกษาผลของขนาดอนุภาค 3 ขนาด ได้แก่ ขนาด S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) และขนาด L ( $736.64 \pm 17.51$  ไมโครเมตร) และศึกษาผลของการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (GA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (DHT) อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม หรือ  $87.10 \times 10^4$  (ขนาด S),  $89.86 \times 10^4$  (ขนาด M) และ  $94.22 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (ขนาด L) ใน cryo vial ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Agitation seeding เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อในสภาวะสแตติก และศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay หลังการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ

เมื่อพิจารณาผลของขนาดอนุภาคไมโครต่อการยึดเกาะของเซลล์ MCF-7 (รูปที่ 4.17) หลังการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง พบว่าการเปลี่ยนแปลงของขนาด และอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอินไม่มีผลทำให้ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาผลของการเปลี่ยนแปลงของขนาดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาดต่างๆ พบการเจริญเติบโตของเซลล์ระยะ lag time อยู่ในช่วง 0-3 วัน ของการเพาะเลี้ยง โดยเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตและมีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่เวลา 7 วัน อนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA มีค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงอย่างมีนัยสำคัญประมาณ  $16.8 \times 10^4 - 23.3 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม เมื่อเทียบกับอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย DHT มีค่าความหนาแน่นเซลล์สูงสุดประมาณ  $8.9 \times 10^4 - 12.1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน เซลล์มีปริมาณลดลงตาม เนื่องจากการความหนาแน่นที่มากเกินไปจากข้อจำกัดของพื้นที่ผิวสัมผัส และเมื่อวิเคราะห์ห้ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ขนาดอนุภาคต่างๆ พบว่า อนุภาคไมโครที่อัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 เพาะเลี้ยงบนขนาดอนุภาค S มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าอนุภาคไมโครที่อัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 ขนาด M และ L อย่างมีนัยสำคัญ



เมื่อเปรียบเทียบขนาดของอนุภาค S ที่อัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 พบว่า อัตราส่วนผสม 100/0 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวทวีคูณสูงกว่าอัตราส่วนผสม 50/50 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $6.4 \times 10^{-3}$  และ  $6.1 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง สำหรับค่า PDT เท่ากับ  $108.3 \pm 0.4$  และ  $112.9 \pm 0.9$  ชั่วโมง จากผลของอนุภาคต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 แสดงให้เห็นว่า ขนาดอนุภาค S ซึ่งเป็นอนุภาคขนาดเล็กที่สุด มีร้อยละการยึดเกาะและมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับขนาด M และ L เนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กพื้นที่ผิวมาก ทำให้การปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์เกิดขึ้นเร็ว เซลล์มีเวลาการแบ่งตัวเร็ว ส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังสังเกตได้อีกว่าอนุภาคขนาด S เพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่น้อยที่สุด ( $87.10 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคขนาด M และ L ที่เพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์  $89.86 \times 10^4$  และ  $94.22 \times 10^4$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ แต่กลับทำให้เซลล์มีแนวโน้มการเจริญเติบโตสูงที่สุด ดูได้จากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (ตารางที่ 4.12) พบว่า ค่าทั้งสองมีค่าสูงที่สุด ทั้งนี้สามารถอธิบายได้จากผลการยึดเกาะของเซลล์และขนาดของเซลล์ ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ลักษณะตัวเซลล์มีขนาดเล็ก มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20-24 ไมโครเมตร [Horning, J.L. และคณะ 2008] ดังนั้นแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นต่ำแต่เมื่อเทียบกับสัดส่วนของพื้นที่ผิวที่มาก ทำให้เซลล์ยึดเกาะได้มาก และส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตดี อีกทั้งเซลล์มะเร็งมีคุณสมบัติจำเพาะคือเซลล์จะทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อมีการรวมกลุ่มกันหรือมีปริมาณเซลล์ที่มากพอ [Sutherland, 1970] ดังนั้นถ้าอนุภาคที่มีพื้นที่ผิวน้อย เซลล์จะมีช่วงระยะเวลาการปรับตัว (Lag phase) ก่อนการแบ่งตัวที่นาน ทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นของเซลล์สูง เมื่อมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ทำให้เกิดข้อจำกัดด้านพื้นที่หรือการส่งผ่านอากาศและอาหาร เซลล์อาจเกิดการทับถมกันอนุภาคมาก ทำให้เซลล์ที่อยู่ภายใน ไม่ได้รับอากาศและอาหารที่เพียงพอ เซลล์จึงมีโอกาสตายสูง

รายงานของ Zhu, X.H. และคณะ (2006) ได้ศึกษาอนุภาคไมโครที่เตรียม จากพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) เพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อตับ โดยเปรียบเทียบขนาดของอนุภาคไมโคร 3 ขนาดคือ  $361.8 \pm 40.1$  (M3),  $242.25 \pm 38.2$  (M2) และ  $153.2 \pm 31.6$  (M1) ไมโครเมตร จากการ

ทดสอบอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (Liver cell, HepG2) โดยจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิกรัมของอนุภาคไมโคร หลังจากเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการยึดเกาะของเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue พบว่า ขนาดของอนุภาคไมโครมีผลต่อการยึดเกาะเซลล์ ซึ่งอนุภาคไมโครที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ 153.2 ไมโครเมตร (M1) มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะสูงที่สุดประมาณร้อยละ 28 และร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มีอัตราลดลงเท่ากับ 24 เมื่อเพิ่มขนาดของอนุภาคเป็น  $361.8 \pm 40.1$  ไมโครเมตร เนื่องจากเซลล์มะเร็งตับมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 – 20 ไมโครเมตร ซึ่งเซลล์มีขนาดเล็กทำให้การปฏิสัมพันธ์กันระหว่างเซลล์กับเซลล์ช้า หลังเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน พบว่า ขนาดอนุภาคไมโครที่เล็กที่สุดมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเช่นกัน โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับ  $8.87 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 78.09 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของขนาด M2 และ M3 ที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $7.00 \times 10^{-3}$  และ  $6.26 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง เวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเท่ากับ 99 และ 110.7 ชั่วโมง จึงแสดงให้เห็นว่าขนาดของอนุภาคมีผลต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ [Zhu, X.H. และคณะ 2006] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

เมื่อพิจารณาผลของการเชื่อมขวางระหว่าง GA และ DHT (รูปที่ 4.17) พบว่าการเชื่อมขวางด้วย GA มีแนวโน้มของร้อยละการยึดเกาะมากกว่าการเชื่อมขวางด้วย DHT ในทุกอัตราส่วนผสม เมื่อพิจารณาผลของการเชื่อมขวางที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าขนาดอนุภาค S และผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวทวีคูณสูงกว่าการเชื่อมขวางด้วย DHT ทั้งสองอัตราส่วนผสมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งค่า  $\mu$  และ PDT ของอัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA มีค่าเท่ากับ  $6.4 \times 10^{-3}$ ,  $6.14 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง 108.28 และ 112.87 ชั่วโมง ตามลำดับ และการเชื่อมขวางด้วย DHT มีค่าเท่ากับ  $4.6 \times 10^{-3}$  และ  $4.2 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง 151.8 $\pm$ 5.1 และ 166.9 $\pm$ 7.6 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเชื่อมขวางด้วย GA ส่งเสริมการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ได้มากกว่าการเชื่อมขวางด้วย DHT เนื่องจากผลของการเชื่อมขวางที่สูง ส่งผลให้วัสดุที่มีความคงตัวหรือความแข็งสูง (Stiffness surface) ดังนั้นวัสดุมีพื้นผิวที่แข็งสามารถส่งผลให้เซลล์มีอัตราการยึดเกาะและเจริญเติบโตที่สูงกว่าวัสดุที่มีความคงตัวน้อยหรือวัสดุที่อ่อนนิ่ม (Soft surface) โดยส่วนใหญ่การศึกษาความคงตัวหรือ

ความแข็งของพื้นผิวสามารถอธิบายได้จากค่าความต้านทานแรงกด (Compressive Modulus) ซึ่งวัดได้ยากในอนุภาคไมโคร แต่อย่างไรก็ตามผลการเชื่อมขวางที่สูง จะทำให้เกิดความแข็งของวัสดุได้ เพราะเมื่อวัสดุการเชื่อมขวางสูง แสดงถึงการเกิดโครงข่าย (Network) ของโครงสร้างพอลิเมอร์ จึงทำให้ค่าความแข็ง (มอดูลัสของการกด) มีค่าสูงขึ้น [Harley, B.A. และคณะ 2007] สามารถทำให้เซลล์ยึดเกาะและแผ่ขยายได้ แต่ทั้งนี้ผลการยึดเกาะของเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ด้วยเช่นกัน [Chique, M. และคณะ 2009]

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าความแตกต่างของวัสดุพื้นผิวแข็งที่เหมาะสมต่อเซลล์ชนิดต่างๆ โดยค่ามอดูลัสของการกด (Modulus in compression) สูงที่สุด แสดงถึงความแข็งของวัสดุที่สามารถสนับสนุนการยึดเกาะและการแผ่ขยายตัวของเซลล์ชนิดต่างๆ และสติฟเนส (Stiffness) คือความต้านทานของวัสดุต่อการเสียรูปภายใต้แรงกระทำในช่วงยืดหยุ่น (elastic state) โดยสามารถวัดได้จากค่ามอดูลัส (modulus) ในช่วงการเสียรูปแบบยืดหยุ่น (elasticity) โดยเซลล์แต่ละชนิดมีค่ามอดูลัสที่ทำให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตที่เหมาะสมแตกต่างกัน

**ตารางที่ 4.10** รายงานความแตกต่างของวัสดุพื้นผิวแข็ง (Substrate stiffness) ที่มีความเหมาะสมต่อเซลล์ชนิดต่างๆ

เซลล์	พื้นผิววัสดุ	Modulus* [kPa]	Suitable** stiffness [kPa]	อ้างอิง
L929 fibroblasts	Hyaluronic acid /PEGdi-acrylate	2.5–28	28	Ouasti, S. และคณะ 2011
L929 fibroblasts	Silk fibroin film	62-500	500	Amornsudthi wat P. และคณะ 2014
hMSC	Polyacrylamide-collagen film	1–15	15:smooth muscle	Park, J. S. และคณะ 2011
MSC	Polyacrylamide film	1–34	11:myogenic 34:osteogenic	Engler, A. J. และคณะ 2006
MCF-7	Polystyrene Bead	500-1000	1000	Li, A. 2011
MCF-10A	Polystyrene Bead	300-500	500	Li, A. 2011

\*มอดูลัสการกด (modulus in compression)

\*\*ค่าสติฟเนสของวัสดุวัดได้จากค่ามอดูลัส ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนของแรงเค้นต่อความเครียด หรือ

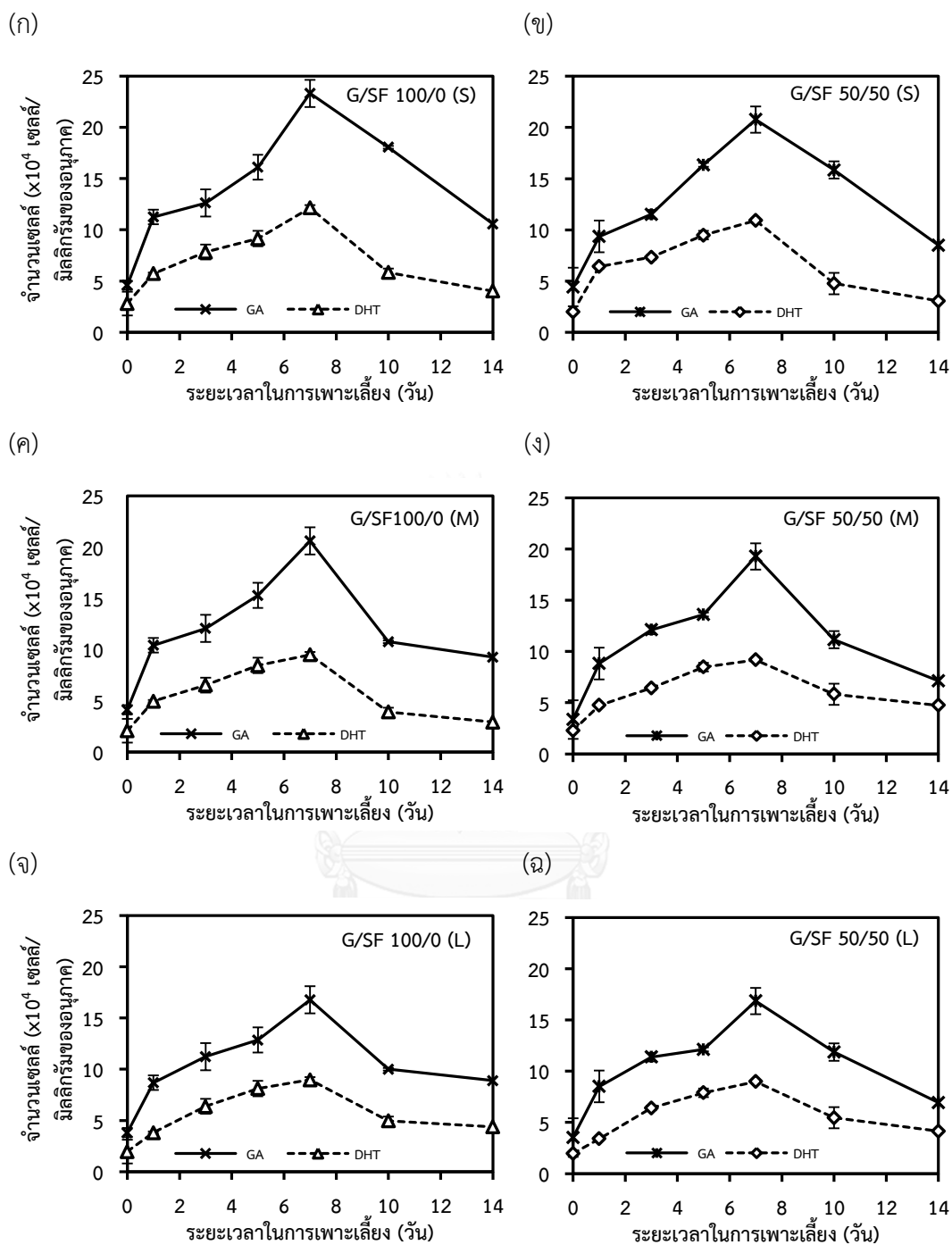
เรียกว่า โมดูลัสของความยืดหยุ่น (Modulus of elasticity, E) ดังสมการ  $E = \frac{\sigma}{\epsilon}$

โดยที่  $\sigma$  = แรงเค้นที่เกิดขึ้นในวัสดุทดสอบ (lb/in.<sup>2</sup> หรือ MPa)

$\epsilon$  = ความเครียด

รายงานของ Haugh M.G. และคณะ 2011 ได้ศึกษาผลของการเชื่อมขวางด้วย กลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลลาร์และการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากคอลลาเจนและไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan) และทดสอบสมบัติทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์กระดูกชนิด MC3T3-E1 และประเมินจำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA assay หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA มีปริมาณเซลล์ที่มากกว่า ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย DHT เนื่องจากการเชื่อมขวางด้วย GA มีการเชื่อมขวางที่สูงกว่า DHT เมื่อศึกษาสมบัติเชิงกลของความต้านทานแรงกด (Compression) พบว่าการเชื่อมขวางด้วย GA ค่าความต้านทานแรงกดที่มากกว่าเท่ากับ 1.4 กิโลปาลคาล เมื่อเทียบค่าความต้านทานแรงกดของการเชื่อมขวางด้วย DHT ซึ่งเท่ากับ 0.5 กิโลปาลคาล ซึ่งค่าความต้านทานแรงกดสามารถใช้เป็นตัวอธิบายความแข็งของวัสดุ (Stiffness) ได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อวัสดุมีพื้นผิวที่แข็งหรือมีความคงตัว ส่งเสริมการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีพื้นผิวที่อ่อนหรือนุ่ม จากผลของรายงานดังกล่าวแสดงผลของการเชื่อมขวางต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่กล่าวว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มากกว่าการเชื่อมขวางด้วยความร้อน

อย่างไรก็ตามเป้าหมายของงานวิจัยนี้คือต้องการศึกษาผลของการยึดเกาะและการเจริญเติบโตสูงที่สุดเพื่อการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งเต้านม ดังนั้นจากผลการศึกษานาดและการเชื่อมขวางของอนุภาคทำให้ทราบถึงร้อยละการยึดเกาะที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าอนุภาคที่มีอัตราส่วนผสม 100/0 ขนาด S และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวสูงสุด จึงทำการเลือกอนุภาคดังกล่าว ซึ่งเป็นเป้าหมายของการศึกษาการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งในหัวข้อถัดไป

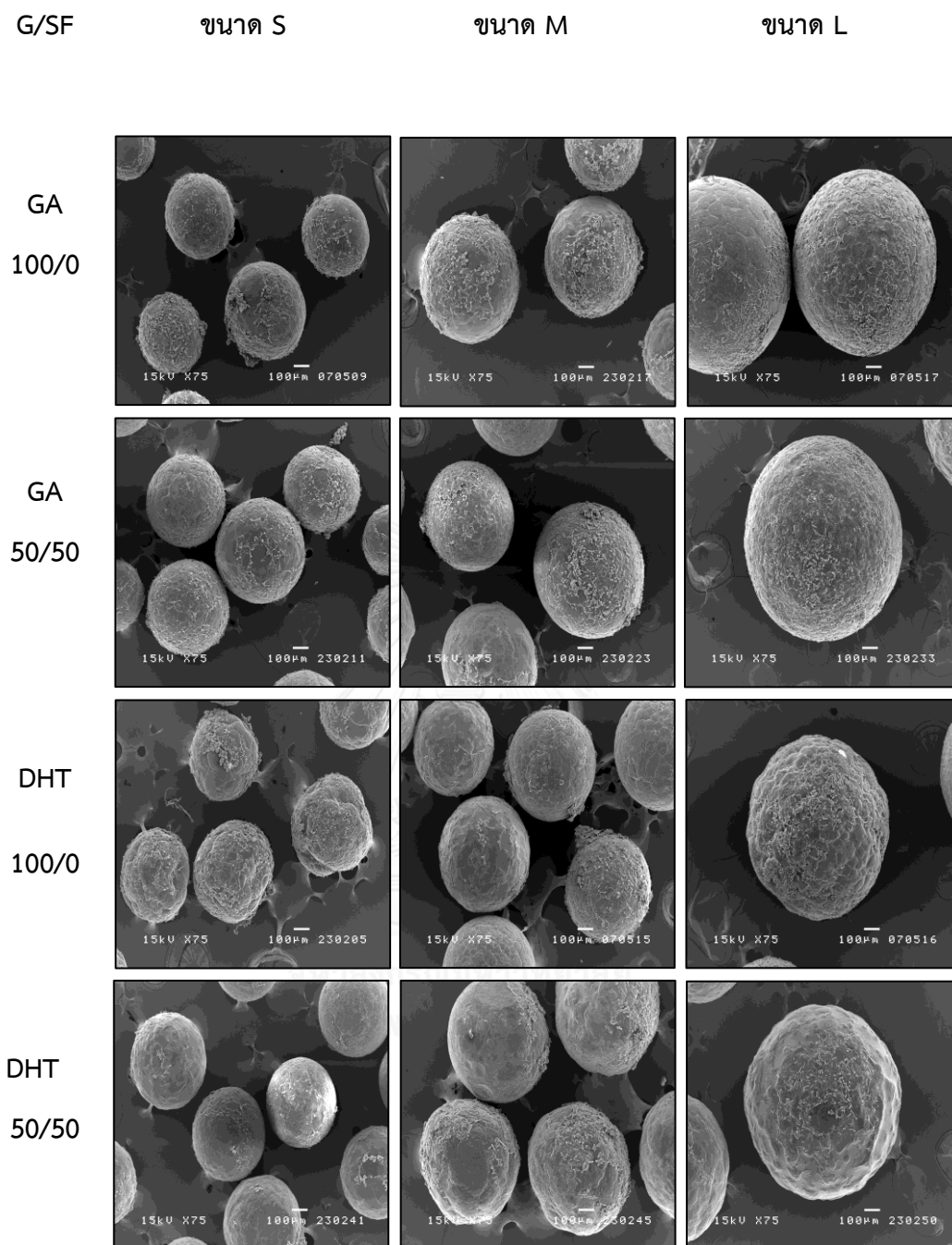


**รูปที่ 4.17** จำนวนเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังจากการทดสอบการยึดเกาะและเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโคร (ก) G/SF 100/0 ขนาด S (ข) G/SF 50/50 ขนาด S (ค) G/SF 100/0 ขนาด M (ง) G/SF 50/50 ขนาด M (จ) G/SF 100/0 ขนาด L (ฉ) G/SF 50/50 ขนาด L โดยใช้วิธี Agitation Seeding ความหนาแน่นเซลล์  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.11 ความหนาแน่นของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูและเซลล์มะเร็งเต้านมต่อพื้นที่ผิวของการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติและสามมิติบนอนุภาคไมโครของงานวิจัยนี้

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์	ความหนาแน่นของเซลล์ต่อพื้นที่ผิว (เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร)		
	ขนาด S	ขนาด M	ขนาด L
เพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติของเซลล์ MSC*	1.05x10 <sup>4</sup>		
เพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติของเซลล์ MSC	-	9.26x10 <sup>4</sup>	-
เพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติของเซลล์ MCF-7*	4x10 <sup>4</sup>		
เพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติของเซลล์ MCF-7	87.10x10 <sup>4</sup>	89.86x10 <sup>4</sup>	94.22x10 <sup>4</sup>

\* การเพาะเลี้ยงบนภาชนะเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีนแบบ 24 หลุม



**รูปที่ 4.18** แสดงการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินและไฟโบรอิน 100/0 และ 50/50 ที่ขนาดและการเชื่อมขวางต่างๆ หลังจากการทดสอบที่เวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 75 เท่า (สเกลบาร์ เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

**ตารางที่ 4.12** ผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีต่อร้อยละการยึดเกาะ การเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน (คำนวณจากรูปที่ 4.19)

อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอิน	การเชื่อมขวางด้วยสารกุกูตารัลดีไฮด์*						การเชื่อมขวางด้วยความร้อน*					
	ขนาด S		ขนาด M		ขนาด L		ขนาด S		ขนาด M		ขนาด L	
	100/0	50/50	100/0	50/50	100/0	50/50	100/0	50/50	100/0	50/50	100/0	50/50
ร้อยละการยึดเกาะ	54.9±5.0 <sup>g</sup>	53.1±2.6 <sup>g</sup>	49.4±2.9 <sup>g</sup>	40.20±9.7 <sup>g</sup> <sup>ab</sup>	45.7±4.8 <sup>g</sup> <sup>ab</sup>	42.3±7.8 <sup>g</sup> <sup>ab</sup>	33.6±13.8 <sup>g</sup> <sup>ab</sup>	24.2±1.9 <sup>b</sup>	27.28±3.39 <sup>b</sup>	24.82±17.40 <sup>b</sup>	23.58±6.40 <sup>b</sup>	23.58±4.70 <sup>b</sup>
ความหนาแน่นสูงสุดของเซลล์ (x10 <sup>4</sup> เซลล์/มิลลิกรัม)	23.3±1.3 <sup>c</sup>	20.7±1.2 <sup>c</sup>	20.6±2.5 <sup>c</sup>	19.2±1.7 <sup>c</sup>	16.7±0.7 <sup>d</sup>	16.8±0.4 <sup>d</sup>	12.1±0.3 <sup>e</sup>	10.9±0.2 <sup>f</sup>	9.5±0.3 <sup>f</sup>	9.2±0.0 <sup>f</sup>	8.9±0.3 <sup>f</sup>	8.9±0.13 <sup>f</sup>
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ <sup>1</sup> (x10 <sup>-3</sup> ต่อชั่วโมง)	6.4±0.0 <sup>g</sup>	6.1±0.0 <sup>h</sup>	5.6±0.0 <sup>i</sup>	4.9±0.0 <sup>j</sup>	4.2±0.0 <sup>k</sup>	4.1±0.0 <sup>l</sup>	4.6±0.0 <sup>m</sup>	4.2±0.0 <sup>k</sup>	3.9±0.0 <sup>n</sup>	3.7±0.4 <sup>o</sup>	3.6±0.0 <sup>o</sup>	3.5±0.0 <sup>o</sup>
เวลาของการแบ่งตัวทวีคูณ <sup>1</sup> (ชั่วโมง)	108.3±0.4 <sup>p</sup>	112.9±0.9 <sup>q</sup>	124.1±4.1 <sup>r</sup>	142.8±3.9 <sup>s</sup>	165.9±2.6 <sup>t</sup>	169.5±3.9 <sup>t</sup>	151.8±5.1 <sup>s</sup>	166.9±7.6 <sup>t</sup>	178.1±1.2 <sup>t</sup>	186.7±1.9 <sup>u</sup>	194.6±1.0 <sup>v</sup>	196.2±1.2 <sup>v</sup>

\* คำนวณจากช่วงการเจริญเติบโตช่วง log phase วันที่ 3 ถึง 7 (a-v แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )



### 4.3 การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ

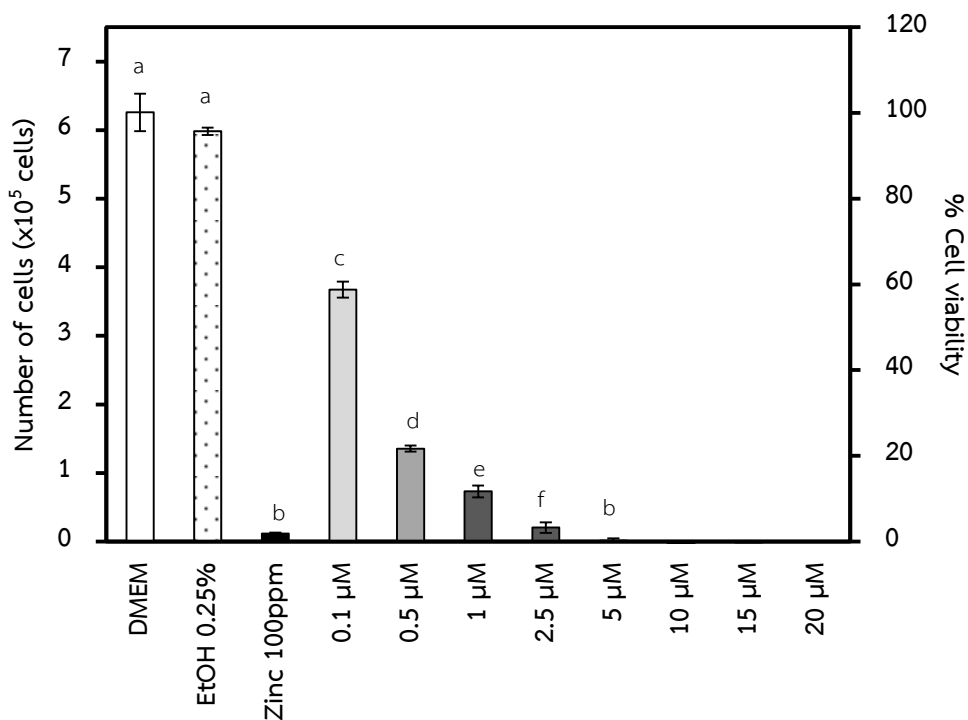
การศึกษาและทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบขนาดความเข้มข้นของยาที่จำเพาะต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมในระบบการทดสอบแบบสองมิติและสามมิติในระดับห้องปฏิบัติการ โดยชนิดของยาที่เลือกใช้ในการทดสอบความไวของยาคือ ยาทาม็อกซิเฟน (Tamoxifen) ซึ่งยาชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Selective estrogen modulator (SERM) เป็นยาต้านฮอร์โมนที่ทำงานโดยขัดขวางการจับกันระหว่างเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจนที่พบในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 นอกจากนี้ยังมีหลายรายงานที่กล่าวถึงการใช้ทาม็อกซิเฟนเป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาความไวต่อการรักษาด้วยยาระดับห้องปฏิบัติการและทางคลินิก [Tehrani F.K และคณะ (2003), Kijima I. และคณะ (2005), Decensi A. และคณะ (2003)] โดยการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งในงานวิจัยนี้แบ่งเป็นการทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ (แบบระนาบเดียวหรือ Monolayer) ในระดับห้องปฏิบัติการทั่วไป และการทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่พัฒนาขึ้น

#### 4.3.1 การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ

การทดสอบความไวของยาที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ในระบบการทดสอบแบบสองมิติ ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ใน 96 well plate ( $1.25 \times 10^5$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และอาหารที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร ซึ่งถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) และอาหารที่ผสมซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm [Shah M.R. 2009] ถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาม็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นวัดหาปริมาณการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983]

รูปที่ 4.19 แสดงผลการทดสอบของกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM โดยมีคิดเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เท่ากับ  $95.76 \pm 4.83$  แสดงได้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วยเอทานอลร้อยละ 25 โดยปริมาตร ไม่มีทำให้เซลล์ตาย แต่เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซึ่งค็อกซีเตดความเข้มข้น 100 ppm ซึ่งใช้สำหรับทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 โดยที่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารชนิด DMEM เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสมยาทาม็อกซิเฟนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาทาม็อกซิเฟนในทุกความเข้มข้น มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ลดลงเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM อย่างมีนัยสำคัญ และจำนวนเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเรื่อยๆ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์ตายทั้งหมด จึงแสดงให้เห็นว่ายาทาม็อกซิเฟนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้อย่างสมบูรณ์ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

ความสัมพันธ์ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์กับความเข้มข้นของยาทาม็อกซิเฟน จากรูปที่ 4.21 เห็นได้ว่าร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้น โดยแสดงเป็นกราฟสมการเชิงคณิตศาสตร์ของฟังก์ชันลอการิทึม (logarithmic equation)  $y = -15.05 \ln(x) + 17.728$  ซึ่งทำให้สามารถประเมินค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายลดลงเท่ากับร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ได้เท่ากับ 0.12 ไมโครโมลาร์ (ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ญ รูปที่ ญ.1)



**รูปที่ 4.19** จำนวนเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และร้อยละการมีชีวิตหลังจากการทดสอบความไวต่อ ยามะเร็งที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ใน 96 well plate ( $1.25 \times 10^5$  เซลล์ ต่อตารางเซนติเมตร) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาโมอกซิเฟนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครเมตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM), อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร, กลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm) (a-f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

Tehrani, F.K. และคณะ (2003) ได้ศึกษาความเข้มข้นของยาทานีออกซิเฟนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $5 \times 10^5$  เซลล์ ( $2.63 \times 10^5$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) บนจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่ประกอบด้วย 5 เปอร์เซ็นต์  $\text{CO}_2$  โดยเซลล์จะถูกผสมด้วยยาทานีออกซิเฟนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์การจำนวนเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue (ย้อมติดสีเซลล์ตาย) พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของยา 0.1 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลการต่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิด RPMI 1640 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ทำให้ร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงขึ้นด้วย โดยคิดเป็นร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เท่ากับ 50 เมื่อเทียบกับกลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ พบว่าหลังเวลาการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยกลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทานีออกซิเฟนที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 1 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้สูงกว่า มีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ  $88.32 \pm 1.30$

Horning J.L. และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของยาทานีออกซิเฟนต่อการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $1.5 \times 10^6$  เซลล์/หลุม ( $1.05 \times 10^5$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร) บนจานเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุม โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของยา 0.005, 0.094, 0.13, 0.27 และ 0.54 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นประเมินจำนวนเซลล์โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer พบว่าที่ความเข้มข้นยาทานีออกซิเฟนเท่ากับ 0.16 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ของการยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาเพิ่มขึ้นเป็น 0.54 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากกว่าร้อยละ 70 จากรายงานดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของยา 0.12 ไมโครโมลาร์ จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทำให้เซลล์ตายเป็นครั้งหนึ่ง

(IC<sub>50</sub>) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันรายงานวิจัยที่มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.16 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ความเข้มข้นของยา 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยาได้ใกล้เคียงกันที่ร้อยละ 78.29±1.57

รูปร่างลักษณะของเซลล์ปกติที่ยึดเกาะบนจานเพาะเลี้ยง เซลล์จะมีลักษณะการแผ่ขยายตัว และมีการจัดเรียงตัวของไซโทสเกเลตอน (Cytoskeleton) ซึ่งเป็นโครงค้ำจุนเซลล์ ทำให้เกิดการเคลื่อนไหวภายในไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) และการเคลื่อนที่ของเซลล์บางชนิด แต่สำหรับเซลล์ที่มีลักษณะผิดปกติหรือเซลล์ตาย เซลล์จะมีลักษณะรูปร่างหดลงเป็นรูปทรงกลม ไม่แผ่ขยาย [Yang M. และคณะ 2004] โดยรูปร่างของเซลล์ที่มีลักษณะการยึดเกาะ และแผ่ขยายดีนั้นสามารถอธิบายได้ด้วยปัจจัยแวดล้อม เช่น สมบัติทางเคมีพื้นผิวของวัสดุหรือการดูดซับน้ำของวัสดุ นอกจากนี้ความแข็ง (Stiffness) และความขรุขระ (Roughness) ของวัสดุถือเป็นข้อมูลที่แสดงถึงการยึดเกาะและการแผ่ขยายของเซลล์ได้ดี เนื่องจากวัสดุที่แข็งเซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่าวัสดุอ่อนนุ่ม (Soft surface) [Amornsudthiwat P. และคณะ 2014] เมื่อพิจารณาถึงรูปร่างของเซลล์มะเร็งเต้านม (รูปที่ 4.22) หลังการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการทดสอบแบบสองมิติด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM พบว่าเซลล์มีความหนาแน่น มีการยึดเกาะแผ่กระจายครอบคลุมทั่วทั้งถาดเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับถาดเพาะเลี้ยงอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิด DMEM ซึ่งแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm เซลล์มีรูปร่างกลมและหลุดลอยเหนือพื้นผิวถาดเพาะเลี้ยง แสดงถึงการตายของเซลล์ สำหรับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาทาโมอกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาเพิ่มขึ้น เซลล์มีจำนวนลดลงตามลำดับ แสดงถึงประสิทธิภาพของยาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่เห็นในรูปที่ 4.20 มีผลสอดคล้องกับข้อมูลจำนวนเซลล์ที่แสดงในรูปที่ 4.19

**ตารางที่ 4.13** ร้อยละการมีชีวิตอยู่และร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาโมกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ (คำนวณจากรูปที่ 4.21)

ตัวอย่าง	ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์*	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต**
DMEM	100.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>h</sup>
EtOH 0.25%v/v	95.76±4.83 <sup>a</sup>	4.24±4.83 <sup>h</sup>
Zn 100 ppm	1.83±0.23 <sup>b</sup>	98.16±0.22 <sup>i</sup>
Tamoxifen 0.1 µM	58.79±3.43 <sup>c</sup>	41.20±3.40 <sup>j</sup>
Tamoxifen 0.5 µM	21.70±1.57 <sup>d</sup>	78.29±1.57 <sup>k</sup>
Tamoxifen 1 µM	11.67±1.31 <sup>e</sup>	88.32±1.30 <sup>l</sup>
Tamoxifen 2.5 µM	3.29±1.35 <sup>f</sup>	96.70±1.34 <sup>i</sup>
Tamoxifen 5 µM	0.24±0.45 <sup>b</sup>	99.75±0.4 <sup>i</sup>
Tamoxifen 10 µM	0.36±0.45 <sup>g</sup>	~100.00 <sup>i</sup>
Tamoxifen 15 µM	-0.20±0.40 <sup>g</sup>	~100.00 <sup>i</sup>
Tamoxifen 20 µM	-0.10±0.09 <sup>g</sup>	~100.00 <sup>i</sup>

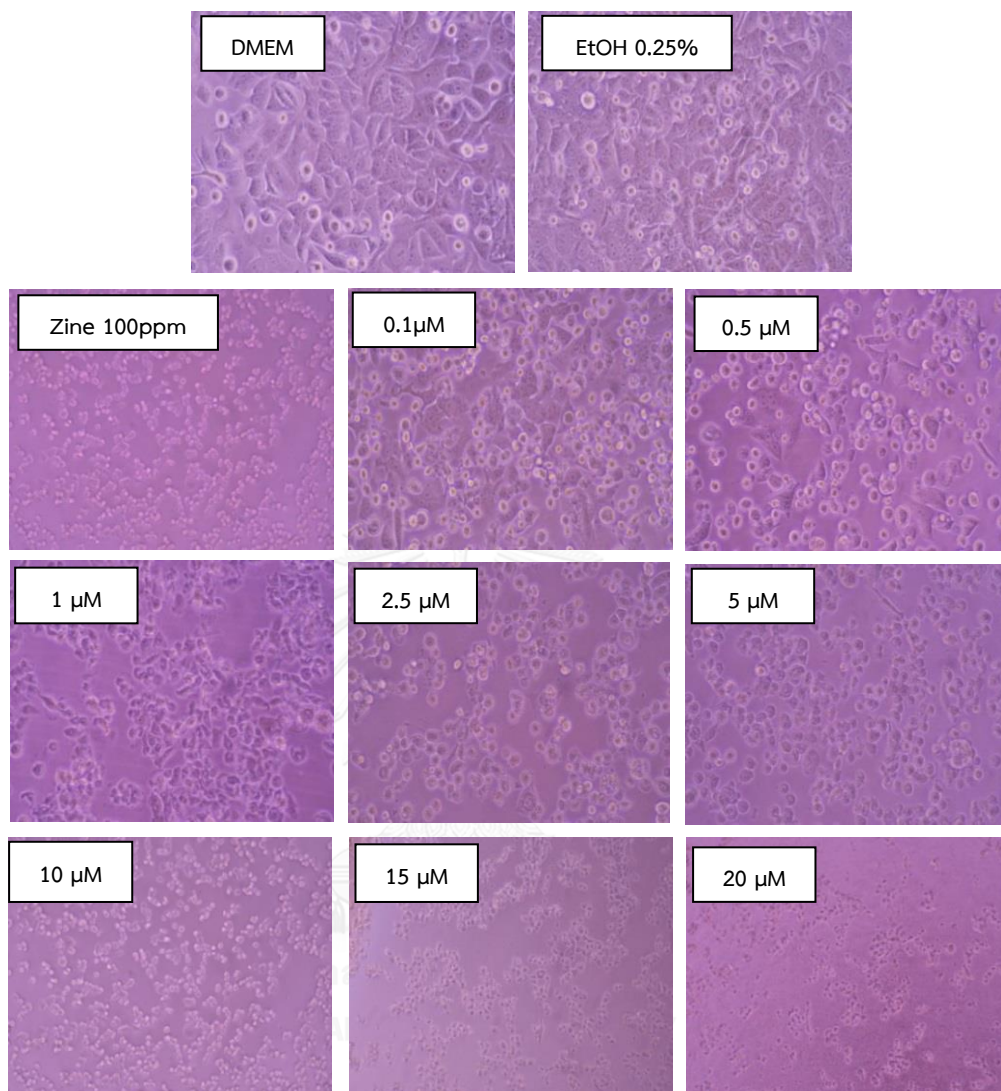
(a-f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

\* คำนวณจาก ;  $\frac{x_t}{x_c} \times 100$

\*\* คำนวณจาก ;  $\left(\frac{x_c - x_t}{x_c}\right) \times 100$

โดยที่  $x_c$  = จำนวนเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ (DMEM)

$x_t$  = จำนวนเซลล์ของกลุ่มอาหารชนิดต่างๆ



**รูปที่ 4.20** รูปร่างของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 หลังการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM), อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร, อาหารเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm) และกลุ่มของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาน็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของการทดสอบแบบสองมิติในห้องปฏิบัติการ

#### 4.3.2 การทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโคร

##### โคร

การทดสอบความไวของยาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ ทำโดยเพาะเซลล์ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $0.87 \times 10^6$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรของอนุภาคไมโคร) เป็นเวลา 7 วัน หรือ  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $2.40 \times 10^6$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรของอนุภาคไมโคร) เป็นเวลา 3 วัน บนอนุภาคไมโครขนาด S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตครอบคลุมทั่วทั้งอนุภาค จากนั้นเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วยเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร (กลุ่มควบคุมเชิงลบ), อาหารที่ผสมซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วยยาทาม็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นวัดปริมาณการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. (1983)]

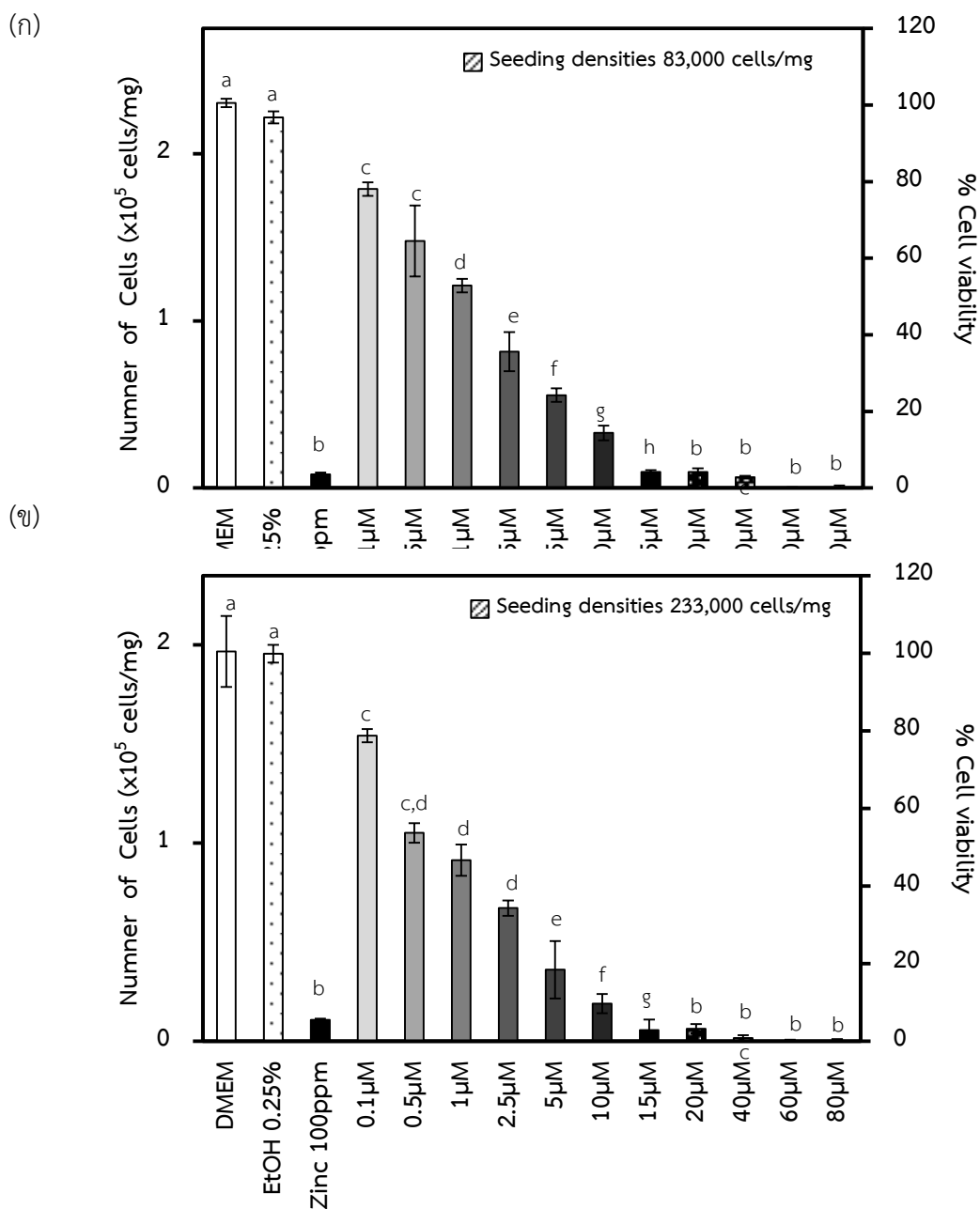
รูปที่ 4.21 แสดงจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีชีวิตอยู่หลังการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุมต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ความหนาแน่นเริ่มต้น (Seeding densities) คือ  $8.33 \times 10^4$  และ  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม พบว่าความหนาแน่นเริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าทุกกลุ่มของการเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากความหนาแน่นนี้เป็นความหนาแน่นเริ่มต้นที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดสอบการยึดเกาะเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครสามมิติในหัวข้อ 4.2.1 แต่ความหนาแน่นเริ่มต้น  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม เป็นความหนาแน่นสูงสุด (Maximum cell densities) ในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งบนอนุภาคไมโครสามมิติ ซึ่งได้จากการทดลองการเจริญเติบโตของเซลล์ในหัวข้อ 4.2.2.2 (ข.) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เซลล์มีความหนาแน่นมากเกินไป เซลล์จึงเกิดการหลุดลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยความหนาแน่นสูงสุดที่วัดได้หลังเพาะเลี้ยง 3 วัน มีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $19.6 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม โดยที่การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 7 วัน ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่สูงกว่าความหนาแน่นเริ่มต้นที่  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม สามารถอธิบายจากผลการยึดเกาะของเซลล์ได้ว่า การเพาะด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์น้อย ทำให้เซลล์เจริญเติบโตขึ้นเนื่องจากการสื่อสารกันระหว่างเซลล์



กับเซลล์ใช้เวลามาก ทำให้มีช่วงของ lag phase ยาว ขณะที่การเพาะเซลล์ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นมาก เซลล์มีช่วงของ lag phase สั้น มีอัตราการเจริญเติบโตดีแต่ช่วงของ log phase ก็มีระยะสั้นเช่นเดียวกัน เนื่องจากเซลล์มีกระบวนการเมตาบอลิซึม มีกระบวนการใช้ไปของกลูโคสและการผลิตกรดแลคติกขึ้นในช่วงของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้เซลล์ได้รับอาหารและอากาศที่ไม่เพียงพอ จึงทำให้เซลล์ตาย [Sahoo S.K. และคณะ 2005]

เมื่อพิจารณากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น  $8.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม พบว่าจำนวนเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิด DMEM แต่กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิด DMEM และอาหารที่ผสมเอทานอล มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงกว่ากลุ่มอาหารที่ผสมซิงค์อะซีเตดอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่ผสมซิงค์อะซีเตด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ [Shah M.R. 2009] และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมด้วยยาทานม็อกซิเฟนความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครโมลาร์ พบว่าจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มีอัตราการเจริญเติบโตลดต่ำลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 60 ไมโครโมลาร์ แสดงผลของจำนวนเซลล์มีค่าเป็นลบ บ่งบอกถึงอัตราการตายของเซลล์และค่าที่ได้เป็นลบ เนื่องจากความคาดเคลื่อนของช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดจากตัวอย่างมีค่าต่ำกว่าค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (DMSO) ทั้งนี้สามารถสรุปได้ว่ากลุ่มของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาทานม็อกซิเฟนที่ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ทำการเลี้ยงบนอนุภาคไมโครสามมิติได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์กับความเข้มข้นของยาทานม็อกซิเฟน (รูปที่ 4.21) แสดงให้เห็นว่าร้อยละการมีชีวิตอยู่ลดลงแบบฟังก์ชันของลอการิทึม (logarithmic function) ตามความเข้มข้นยาที่เพิ่มขึ้น โดยที่ความหนาแน่น  $8.33 \times 10^4$  และ  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม เป็นไปตามสมการ  $y = -14.18 \ln(x) + 47.795$  และ  $y = -13.97 \ln(x) + 45.041$  และสามารถนำมาประเมินค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.92 และ 0.70 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก. รูปที่ ก.2 และ ก.3) โดยจะเห็นได้ว่าค่า  $IC_{50}$  ของทั้งสองความหนาแน่น มีค่าแตกต่างกัน เนื่องจากเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ทำให้เซลล์เติบโตด้วยอัตราที่ต่างกันเท่ากับ  $23.0 \times 10^4$  และ  $19.6 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 4.23)



รูปที่ 4.21 จำนวนเซลล์และร้อยละการมีชีวิตของเซลล์หลังการทดสอบความไวต่อยาที่ความหนาแน่นของเซลล์ (ก)  $8.33 \times 10^4$  และ (ข)  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมบนอนุภาคไมโครขนาด S ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาหมอกซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเอทานอลร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร และอาหารที่ผสมด้วยซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm (a-h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

Dhiman H.K. และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของยาทาน็อกซิเฟนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากโคโตซานขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $1.5 \times 10^6$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 5 วัน โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.759 \times 10^{-2}$  ต่อชั่วโมง และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 91.3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วยยาทาน็อกซิเฟนความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 ไมโครโมลาร์ แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยการย้อมสีด้วย crystal violet และนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer พบว่าหลังการทดสอบเป็นเวลา 5 วัน เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยา โดยที่ความเข้มข้นของยา 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 50 ( $IC_{50} = 10$  ไมโครโมลาร์) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640) และที่ความเข้มข้นของยาที่ใช้สูงสุดคือ 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ร้อยละ 90 ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ ตั้งแต่วันที่ 1 หลังการใช้อาหารที่ประกอบด้วยยาทาน็อกซิเฟนที่ความเข้มข้นนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ พบว่าค่า  $IC_{50}$  จากรายงานมีค่ามากกว่า 10 เท่า เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานมีรูพรุนสูง ทำให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี มีจำนวนเซลล์มาก ดังนั้นจึงต้องใช้ความเข้มข้นของยาสูงจึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้

Horning J.L. และคณะ 2008 ได้ทำการศึกษาผลของยาทาน็อกซิเฟนในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโคร PLA-PVA-Chitosan ขนาดอนุภาค 160 – 182 ไมโครเมตร ด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $1.5 \times 10^6$  เซลล์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นของยา 0.27, 1.07, 2.1, 4.0 และ 8.0 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นยา 3.7 ไมโครโมลาร์ บนอนุภาคไมโคร สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 50 ( $IC_{50} = 3.7$ ) เมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้ พบว่า ค่า  $IC_{50}$  จากรายงานมีค่ามากกว่าประมาณ 3 เท่า เนื่องจากอนุภาคไมโคร PLA-PVA-Chitosan มีพื้นผิวขรุขระและมีรูพรุนมาก ทำให้เซลล์ยึดเกาะมาก ดังนั้น ต้องใช้ความเข้มข้นยามากกว่าจึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50

ข้อมูลการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งในงานวิจัยนี้ เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทดสอบยาในระดับห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้มีความเป็นไปได้ที่นำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ได้

**ตารางที่ 4.14** การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายลดลงเท่ากับร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ของยาทาม็อกซิเฟนที่ได้จากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของอื่นๆ

ระบบที่ใช้ทดสอบ	ค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายลดลงเท่ากับ ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ไมโครโมลาร์		อ้างอิง				
	การเลี้ยงแบบสองมิติ	การเลี้ยงแบบสามมิติบนอนุภาคไมโคร					
อนุภาคไมโครเจลลาติน (287-347 $\mu\text{m}$ )	$1.25 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร $IC_{50} = 0.12$	<table border="1"> <tr> <td><math>8.71 \times 10^5</math> เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร</td> <td><math>24.0 \times 10^5</math> เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร</td> </tr> <tr> <td>0.92</td> <td>0.70</td> </tr> </table>	$8.71 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร	$24.0 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร	0.92	0.70	งานวิจัยนี้
$8.71 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร	$24.0 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร						
0.92	0.70						
โครงเลี้ยงเซลล์โคโคซานที่ได้จากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง	$1.56 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร $IC_{50} = 1$	$156.6 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร มีค่า $IC_{50} = 10$	Dhiman H.K. และคณะ 2005				
อนุภาคไมโคร PLA-PVA-chitosan (160-182 $\mu\text{m}$ )	$1.05 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร $IC_{50} = 0.16$	$18.6 \times 10^5$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร $IC_{50} = 3.71$	Horning J.L. และคณะ 2008				

**ตารางที่ 4.15** ร้อยละการมีชีวิตอยู่และร้อยละยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 บนอนุภาคไมโครหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยยาทาโมซิเฟนที่ความเข้มข้นต่างๆ (คำนวณจากรูปที่ 4.23)

ตัวอย่าง	ความหนาแน่น $8.33 \times 10^4$ *		ความหนาแน่น $23.0 \times 10^4$ *	
	ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์**	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต***	ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์**	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต***
DMEM	100.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>l</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>l</sup>
EtOH 0.25%v/v	96.25±2.33 <sup>a</sup>	3.75±2.33 <sup>m</sup>	99.85±6.87 <sup>a</sup>	0.15±6.87 <sup>m</sup>
Zn 100 ppm	3.57±0.47 <sup>b</sup>	96.43±0.47 <sup>n</sup>	5.44±0.40 <sup>b</sup>	94.56±0.40 <sup>n</sup>
Tamoxifen 0.1 µM	77.63±2.01 <sup>c</sup>	22.37±2.01 <sup>o</sup>	78.87±7.78 <sup>c</sup>	21.13±7.78 <sup>p</sup>
Tamoxifen 0.5 µM	64.14±9.31 <sup>d</sup>	35.86±9.31 <sup>p</sup>	53.78±5.95 <sup>d</sup>	46.22±5.95 <sup>q</sup>
Tamoxifen 1 µM	52.55±1.45 <sup>e</sup>	47.45±1.45 <sup>q</sup>	46.93±8.07 <sup>e</sup>	53.07±8.07 <sup>q</sup>
Tamoxifen 2.5 µM	35.43±5.43 <sup>f</sup>	64.57±5.43 <sup>r</sup>	34.20±1.61 <sup>f</sup>	65.80±1.61 <sup>r</sup>
Tamoxifen 5 µM	24.10±1.53 <sup>s</sup>	75.90±1.53 <sup>s</sup>	18.02±6.35 <sup>s</sup>	83.98±6.35 <sup>t</sup>
Tamoxifen 10 µM	14.26±1.76 <sup>h</sup>	85.74±1.76 <sup>t</sup>	9.53±1.91 <sup>h</sup>	90.47±1.91 <sup>t</sup>
Tamoxifen 15 µM	4.15±0.47 <sup>i</sup>	95.85±0.47 <sup>u</sup>	2.90±2.95 <sup>i</sup>	97.10±2.95 <sup>u</sup>
Tamoxifen 20 µM	4.14±0.88 <sup>i</sup>	95.86±0.88 <sup>u</sup>	3.25±0.92 <sup>i</sup>	96.75±0.92 <sup>u</sup>
Tamoxifen 40 µM	3.60±0.35 <sup>j</sup>	96.40±0.35 <sup>u</sup>	1.02±1.48 <sup>ij</sup>	98.98±1.48 <sup>uv</sup>
Tamoxifen 60 µM	-0.25±0.22 <sup>k</sup>	100.00 <sup>v</sup>	-0.58±0.50 <sup>j</sup>	100.00 <sup>v</sup>
Tamoxifen 80 µM	-0.49±0.77 <sup>k</sup>	100.00 <sup>v</sup>	-0.16±0.89 <sup>j</sup>	100.00 <sup>v</sup>

(a-v แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

\* ความหนาแน่นของเซลล์มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิกรัม

\*\* คำนวณจาก ;  $\frac{x_t}{x_c} \times 100$

\*\*\* คำนวณจาก ;  $\left(\frac{x_c - x_t}{x_c}\right) \times 100$

โดยที่  $x_c$  = จำนวนเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ (DMEM)

$x_t$  = จำนวนเซลล์ของกลุ่มอาหารชนิดต่างๆ

ตารางที่ 4.16 การวิเคราะห์ข้อดีข้อเสียระบบทดสอบในงานวิจัยนี้กับระบบที่ใช้ทางการค้า

ระบบที่ใช้ทดสอบ	ข้อดี	ข้อเสีย
งานวิจัยนี้	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สามารถควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นที่ผิววัสดุได้</li> <li>- สามารถทดสอบฤทธิ์ของยาต่อการตายของเซลล์มะเร็งที่ได้อย่างแม่นยำ</li> <li>- ราคาถูก</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ขั้นตอนการเตรียมอนุภาคไมโครคอนข้างยุ่งยาก</li> </ul>
Alvetex@Scaffold96 วัสดุทำจากพอลิสไตรีน (Polystyrene) ความหนา 200 ไมโครเมตร	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สามารถควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ได้ที่ยึดเกาะได้</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ขั้นตอนการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ค่อนข้างยุ่งยาก</li> <li>- โครงเลี้ยงเซลล์มีความพรุนสูง อาจมีเซลล์ตายตกค้างภายในจึงไม่สามารถวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้อย่างแม่นยำ ทำให้การทดสอบฤทธิ์ของยาจึงมีความคาดเคลื่อน</li> <li>- ราคาแพง</li> </ul>

ตารางที่ 4.16 การวิเคราะห์ข้อดีข้อเสียระบบทดสอบในงานวิจัยนี้กับระบบที่ใช้ทางการค้า (ต่อ)

ระบบที่ใช้ทดสอบ	ข้อดี	ข้อเสีย
CytoSelect™ 96-Well <i>In Vitro</i> Tumor Sensitivity Assay วัสดุทำจากAgar Matrix Solution หรือ เจลคอลลาเจน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เป็นที่ยอมรับในการนำมาทดสอบฤทธิ์ของยาต่อการต้านมะเร็ง</li> <li>- เซลล์มีการรวมกลุ่มกันคล้ายเซลล์มะเร็งที่อยู่ในร่างกาย โดยมีลักษณะรูปร่างคล้ายสเฟียรอยด์</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ขั้นตอนเตรียมเจลค่อนข้างยุ่งยาก</li> <li>- มีความคลาดเคลื่อนของการทดสอบฤทธิ์ของยาต่อการตายของเซลล์ เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่ตายอาจมาจากฤทธิ์ของยาและการตายของเซลล์ที่อยู่ในก้อนเซลล์มะเร็ง</li> </ul>



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตอนุภาคไมโคร เพื่อพัฒนาเป็นต้นแบบระบบการทดสอบความไวต่อ ยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity) ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีการศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ได้แก่ 100/0, 90/10, 70/30 และ 50/50 โดยค่าศักย์ゼต้าของเจลาตินชนิดเอ (ค่าไอโซอิเล็กทริก ~ 9) แสดงประจุบวก และค่าศักย์ゼต้าของไฟโบรอิน (ค่าไอโซอิเล็กทริก ประมาณ 3.8 - 4.2) แสดงประจุลบ ที่ค่าพีเอช 5.5 และ 7.4 เมื่อผสมไฟโบรอินในอัตราส่วนผสมเพิ่มขึ้น ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายผสมมีประจุบวกบนพื้นผิวลดลง และที่อัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอิน 50/50 ค่าศักย์ゼต้าที่วัดได้มีค่าเข้าใกล้ 0 ซึ่งแสดงถึงความสมดุลระหว่างประจุของสารละลายโปรตีนทั้งสอง ความหนืดของสารละลายเจลาตินมีค่าน้อยกว่าความหนืดของสารละลายไฟโบรอินอย่างมีนัยสำคัญ ความหนืดของสารละลายผสมมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนผสมของไฟโบรอิน

อนุภาคไมโครถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์หรือการเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่สภาวะสุญญากาศ อนุภาคไมโครที่ได้จากการปั่นกวนที่ต่างกัน 3 ขนาดคือ S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที, M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) ใช้ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที และ L ( $736.64 \pm 17.51$  ไมโครเมตร) ใช้ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที โครงสร้างสัณฐานภายนอกของอนุภาคไมโคร ตรวจสอบโดยใช้เครื่องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าพื้นผิวภายนอกมีลักษณะเรียบ รูปทรงเป็นลักษณะทรงกลม เมื่อตัดขวางเพื่อศึกษาลักษณะภายใน พบว่าโครงสร้างภายในไม่มีรูพรุน มีลักษณะพื้นผิวเรียบและตัน ขนาดของอนุภาคไมโครที่ผลิตด้วยสภาวะเดียวกันและผ่านการเชื่อมขวางทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากมีการคัดขนาดโดยใช้ตะแกรงให้เอนมีขนาดอนุภาคเท่าๆกัน

ระดับการเชื่อมขวาง (crosslink) ของอนุภาคประเมินได้จากปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระในโปรตีนก่อนและหลังการเชื่อมขวาง อัตราการดูดซับน้ำ และการย่อยสลายในระดับห้องปฏิบัติการ



โดยปริมาณหมู่  $-NH_2$  อิสระของโปรตีนวิเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาของสาร 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) พบว่าอนุภาคที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีปริมาณหมู่อะมิโนลดลงมากกว่าอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อนอย่างมีนัยสำคัญ อนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์สามารถดูดซับน้ำได้มากและย่อยสลายช้ากว่าอนุภาคไมโครที่ถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อน และเมื่อเพิ่มปริมาณไฟโบรอินในอนุภาคไมโครเพิ่มขึ้น ทำให้ลดความสามารถในการดูดซับน้ำ และมีอัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ช้ากว่าอนุภาคไมโครที่มีเจลาตินอย่างเดียวน้อยประมาณ 8-9 เท่า อย่างไรก็ตามขนาดของอนุภาคไมโครไม่มีผลต่อระดับการเชื่อมขวาง

ผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครที่ผลิตขึ้นของ 2 ชนิดคือ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow-derived stem cells, MSC) และเซลล์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer cell, MCF-7) ด้วยวิธีการเพาะเซลล์ 2 วิธีคือวิธี Agitation seeding และวิธี Centrifugal Seeding พบว่า เซลล์ทั้งสองชนิดสามารถยึดเกาะบนอนุภาคไมโครเจลาตินได้ดีที่สุด โดยเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Agitation seeding อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มีผลมาจากการยึดเกาะเริ่มต้น เมื่อเซลล์สามารถยึดเกาะกับอนุภาคไมโครได้มาก เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) สูงและเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time, PDT) ต่ำ โดยปัจจัยที่มีกระทบต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ ได้แก่ อัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินขนาดอนุภาคไมโครและวิธีการเชื่อมขวางอนุภาคไมโคร อนุภาคไมโครเจลาตินขนาด M ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ มี  $\mu$  และจำนวนเซลล์สูงสุดที่เวลา 7 วันหลังการเพาะเลี้ยง เท่ากับ  $4.2 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง และ  $11.1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และค่า  $\mu$  ของเซลล์จะมีค่าลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมแบบสองมิติ (งานเพาะเลี้ยง) มีค่า  $\mu = 15.4 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง และ PDT เท่ากับ  $44.7 \pm 3.3$  ชั่วโมง สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบสามมิติประมาณ 3 เท่า อนุภาคไมโครเจลาตินขนาด S และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ  $6.4 \times 10^{-3}$  และ ต่อชั่วโมง และ  $108.3 \pm 0.4$  ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าทั้งสองสูงกว่าอนุภาคไมโครเจลาตินขนาด S ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่า  $\mu$  เท่ากับ  $4.6 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง และ PDT  $151.8 \pm 5.1$  ชั่วโมง

ผลการทดสอบความไวของยาทาน็อกซิเฟนต่อเซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม (Breast Cancer cell, MCF-7) พบว่าการเลี้ยงแบบสองมิติ มีค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายลดลงเท่ากับร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ 0.12 ไมโครโมลาร์ และการเพาะเลี้ยงแบบสามมิติบนอนุภาคไมโครที่ความหนาแน่นเซลล์  $23.0 \times 10^4$  และ  $19.6 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.92 และ 0.70 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้กับรายงานอื่น พบว่า ค่า  $IC_{50}$  ของงานนี้ มีค่าน้อยกว่ารายงานการวิจัยของ Horning J.K. และคณะ (2004) ที่ศึกษาความไวต่อยาทาน็อกซิเฟนต่อการรักษาเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครผสมระหว่างพอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLA), พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl Alcohol, PVA) และไคโตซาน หลังเวลาการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.7 แต่อย่างไรก็ตามระบบการทดสอบความไวต่อยาในงานวิจัยนี้ มีข้อดีคือสามารถควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นที่ผิววัสดุได้ สามารถทดสอบฤทธิ์ของยาต่อการตายของเซลล์มะเร็งที่ได้อย่างแม่นยำ และมีราคาถูก แต่มีข้อเสียคือ ขั้นตอนการเตรียมวัสดุค่อนข้างยุ่งยาก เมื่อเทียบกับระบบที่ใช้ทางการค้าที่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากโพลิสไตรีน (Polystyrene, PS) ความหนา 200 ไมโครเมตร ลักษณะเป็นรูพรุน มีข้อดีคือ สามารถควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ได้ที่ยึดเกาะได้ แต่ข้อเสียคือ ขั้นตอนการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ค่อนข้างยุ่งยาก โครงเลี้ยงเซลล์มีความพรุนสูงอาจมีเซลล์ตายตกค้างภายในจึงไม่สามารถวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้อย่างแม่นยำ ทำให้การทดสอบฤทธิ์ของยามีความคาดเคลื่อน และราคาแพง

#### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผลิตขึ้นขนาด S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ที่อัตราผสมเจลาตินอย่างเดียว (100/0) ที่ถูกเชื่อมขวางทางเคมีด้วยกลูตาร์ลดีไฮด์ มีลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและเซลล์มะเร็งเต้านม ทำให้สามารถนำมาทดสอบความไวต่อยารักษาของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานด้านต่างๆได้ เช่น เป็นโครงเนื้อเยื่อ (Scaffold) เป็นระบบนำส่งยา หรือนำส่งสารออกฤทธิ์ หรือเป็นวัสดุสำหรับทดสอบความไวต่อยา (Chemosensitivity) ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆได้

## 5.2 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบลักษณะสมบัติของอนุภาคไมโครที่ผลิตจากเจลาตินและไฟโพรอินไหมไทยที่อัตราส่วนและสภาวะการผลิตต่างๆ เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์
2. ทราบข้อมูลการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนูและเซลล์มะเร็งเต้านมที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ทราบวิธีการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็ง (Chemosensitivity) ของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ยาทาม็อกซิเฟนเป็นต้นแบบในยาในการทดสอบ เพื่อหาขนาดของยาที่จำเพาะต่อเซลล์ในระบบการเพาะเลี้ยง
4. ได้ต้นแบบอนุภาคไมโคร เพื่อปรับปรุงและพัฒนาให้เหมาะสมที่จะใช้ทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งต่อไป

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงอนุภาคไมโครให้มีรูพรุน เพื่อเพิ่มอัตราการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ โดยวิธีกระบวนการนำอนุภาคไมโครไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งก่อนกระบวนการเชื่อมขวาง [Peng Z.Y. และคณะ 2012]
2. การขึ้นรูปอนุภาคไมโครควรขึ้นรูปให้มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 100 ไมโครเมตร โดยการเพิ่มอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมัน เพิ่มความเร็วรอบ และลดความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในกระบวนการขึ้นรูป เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ให้เซลล์สามารถเกิดการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ได้เร็วยิ่งขึ้น
3. วิธีการวัดร้อยละการเชื่อมขวางด้วยวิธี TNBS ของอนุภาคไมโคร อาจไม่สามารถวัดด้วยวิธีนี้ได้โดยตรงเนื่องจากการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และด้วยความร้อน มีการทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางที่แตกต่างกัน จึงอาจต้องหาวิธีการวัดด้วยวิธีอื่น เช่น การวัดร้อยละดูดซับน้ำหรือการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ

## รายการอ้างอิง

- Alagusundaram, M., C. Madhu Sudana Chetty, K. Umashankari, B. Attuluri Venkata, C. Lavanya and S. Ramkanth. "Microspheres as a Novel Drug Delivery Sysytem - a Review." *International Journal of ChemTech Research* Vol.1, No.3, (2009): 526-534.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond and D. L. Kaplan. "Silk-Based Biomaterials." *Biomaterials* 24, no. 3 (2003): 401-16.
- Amornsudthiwat, Phakdee and Siriporn Damrongsakkul. "Oxygen Plasma Etching of Silk Fibroin Alters Surface Stiffness: A Cell-Substrate Interaction Study." *Plasma Processes and Polymers* 11, no. 8 (2014): 763-776.
- Arnesen, J. A. and A. Gildberg. "Extraction and Characterisation of Gelatine from Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Skin." *Bioresour Technol* 98, no. 1 (2007): 53-7.
- Berridge, M. V., P. M. Herst and A. S. Tan. "Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction." *Biotechnol Annu Rev* 11, (2005): 127-52.
- Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini and N. Roveri. "Mechanical and Thermal Properties of Gelatin Films at Different Degrees of Glutaraldehyde Crosslinking." *Biomaterials* 22, no. 8 (2001): 763-8.
- Bubnis, W. A. and C. M. Ofner, 3rd. "The Determination of Epsilon-Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid." *Anal Biochem* 207, no. 1 (1992): 129-33.
- Chamchongkaset, J., S. Kanokpanont, D. L. Kaplan and S. Damrongsakkul. "Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering." *Advanced Materials Research* 55-57, (2008): 685-688.

- Chemtob, C. M., R. S. Hamada, G. Bauer, B. Kinney and R. Y. Torigoe. "Patients' Suicides: Frequency and Impact on Psychiatrists." *Am J Psychiatry* 145, no. 2 (1988): 224-8.
- Chen, P. R., M. H. Chen, F. H. Lin and W. Y. Su. "Release Characteristics and Bioactivity of Gelatin-Tricalcium Phosphate Membranes Covalently Immobilized with Nerve Growth Factors." *Biomaterials* 26, no. 33 (2005): 6579-87.
- Cole, E. T., R. A. Scott, D. Cade, A. L. Connor and I. R. Wilding. "In Vitro and in Vivo Pharmacoscintigraphic Evaluation of Ibuprofen Hypromellose and Gelatin Capsules." *Pharm Res* 21, no. 5 (2004): 793-8.
- Cortazar, P. and B. E. Johnson. "Review of the Efficacy of Individualized Chemotherapy Selected by in Vitro Drug Sensitivity Testing for Patients with Cancer." *J Clin Oncol* 17, no. 5 (1999): 1625-31.
- Cuzick, J., T. Powles, U. Veronesi, J. Forbes, R. Edwards, S. Ashley and P. Boyle. "Overview of the Main Outcomes in Breast-Cancer Prevention Trials." *Lancet* 361, no. 9354 (2003): 296-300.
- de Verdiere, A. C., C. Dubernet, F. Nemati, E. Soma, M. Appel, J. Ferte, S. Bernard, F. Puisieux and P. Couvreur. "Reversion of Multidrug Resistance with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles: Towards a Mechanism of Action." *Br J Cancer* 76, no. 2 (1997): 198-205.
- Decensi, A., C. Robertson, G. Viale, F. Pigatto, H. Johansson, E. R. Kisanga, P. Veronesi, R. Torrisi, M. Cazzaniga, S. Mora, M. T. Sandri, G. Pelosi, A. Luini, A. Goldhirsch, E. A. Lien and U. Veronesi. "A Randomized Trial of Low-Dose Tamoxifen on Breast Cancer Proliferation and Blood Estrogenic Biomarkers." *J Natl Cancer Inst* 95, no. 11 (2003): 779-90.
- Dhiman, H. K., A. R. Ray and A. K. Panda. "Three-Dimensional Chitosan Scaffold-Based Mcf-7 Cell Culture for the Determination of the Cytotoxicity of Tamoxifen." *Biomaterials* 26, no. 9 (2005): 979-86.

- Doi, N., J. I. Jo and Y. Tabata. "Preparation of Biodegradable Gelatin Nanospheres with a Narrow Size Distribution for Carrier of Cellular Internalization of Plasmid DNA." *J Biomater Sci Polym Ed*, (2011).
- Emfietzoglou, D., K. Kostarelos, A. Papakostas, W. H. Yang, A. Ballangrud, H. Song and G. Sgouros. "Liposome-Mediated Radiotherapeutics within Avascular Tumor Spheroids: Comparative Dosimetry Study for Various Radionuclides, Liposome Systems, and a Targeting Antibody." *J Nucl Med* 46, no. 1 (2005): 89-97.
- Fisher, B., J. P. Costantino, D. L. Wickerham, C. K. Redmond, M. Kavanah, W. M. Cronin, V. Vogel, A. Robidoux, N. Dimitrov, J. Atkins, M. Daly, S. Wieand, E. Tan-Chiu, L. Ford and N. Wolmark. "Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study." *J Natl Cancer Inst* 90, no. 18 (1998): 1371-88.
- Friess, W. "Collagen--Biomaterial for Drug Delivery." *Eur J Pharm Biopharm* 45, no. 2 (1998): 113-36.
- Gao, S. and J. Singh. "In Vitro Percutaneous Absorption Enhancement of a Lipophilic Drug Tamoxifen by Terpenes." *J Control Release* 51, no. 2-3 (1998): 193-9.
- Godbey, W. T., S. B. Hindy, M. E. Sherman and A. Atala. "A Novel Use of Centrifugal Force for Cell Seeding into Porous Scaffolds." *Biomaterials* 25, no. 14 (2004): 2799-805.
- Gstraunthaler, G. "Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-Free Cell Culture." *ALTEX* 20, no. 4 (2003): 275-81.
- Gulrajani, M. L. . "Degumming of Silk; in Silk Dyeing Printing and Finishing. M. L. Gulrajani (Ed),." *Department of Textile Technology Indian Institute of Technology, New Delhi*, (1988).
- Gurski, L. A., A. K. Jha, C. Zhang, X. Jia and M. C. Farach-Carson. "Hyaluronic Acid-Based Hydrogels as 3d Matrices for in Vitro Evaluation of Chemotherapeutic

- Drugs Using Poorly Adherent Prostate Cancer Cells." *Biomaterials* 30, no. 30 (2009): 6076-85.
- Haugh, M. G., M. J. Jaasma and F. J. O'Brien. "The Effect of Dehydrothermal Treatment on the Mechanical and Structural Properties of Collagen-Gag Scaffolds." *J Biomed Mater Res A* 89, no. 2 (2009): 363-9.
- Haugh, M. G., C. M. Murphy, R. C. McKiernan, C. Altenbuchner and F. J. O'Brien. "Crosslinking and Mechanical Properties Significantly Influence Cell Attachment, Proliferation, and Migration within Collagen Glycosaminoglycan Scaffolds." *Tissue Eng Part A* 17, no. 9-10 (2011): 1201-8.
- Hayashi, K. and Y. Tabata. "Preparation of Stem Cell Aggregates with Gelatin Microspheres to Enhance Biological Functions." *Acta Biomater* 7, no. 7 (2011): 2797-803.
- Horning, J. L., S. K. Sahoo, S. Vijayaraghavalu, S. Dimitrijevic, J. K. Vasir, T. K. Jain, A. K. Panda and V. Labhasetwar. "3-D Tumor Model for in Vitro Evaluation of Anticancer Drugs." *Mol Pharm* 5, no. 5 (2008): 849-62.
- Hunter, R., F. Strickland and F. Kezdy. "The Adjuvant Activity of Nonionic Block Polymer Surfactants. I. The Role of Hydrophile-Lipophile Balance." *J Immunol* 127, no. 3 (1981): 1244-50.
- Hutmacher, D. W. "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage." *Biomaterials* 21, no. 24 (2000): 2529-43.
- Ikada, Y. and Y. Tabata. "Protein Release from Gelatin Matrices." *Adv Drug Deliv Rev* 31, no. 3 (1998): 287-301.
- Inch, W. R., J. A. McCredie and R. M. Sutherland. "Growth of Nodular Carcinomas in Rodents Compared with Multi-Cell Spheroids in Tissue Culture." *Growth* 34, no. 3 (1970): 271-82.
- Inoue, S., K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo and S. Mizuno. "Silk Fibroin of Bombyx Mori Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit

- Consisting of H-Chain, L-Chain, and P25, with a 6:6:1 Molar Ratio." *J Biol Chem* 275, no. 51 (2000): 40517-28.
- Kalman, D. S., I. Wolinsky and J. A. Driskell. "Gelatin." *Nutritional ergogenic aids* 103, no. CRC Press (2004): 105-113.
- Kang, S. W. and Y. H. Bae. "Cryopreservable and Tumorigenic Three-Dimensional Tumor Culture in Porous Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microsphere." *Biomaterials* 30, no. 25 (2009): 4227-32.
- Kijima, I., T. Itoh and S. Chen. "Growth Inhibition of Estrogen Receptor-Positive and Aromatase-Positive Human Breast Cancer Cells in Monolayer and Spheroid Cultures by Letrozole, Anastrozole, and Tamoxifen." *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, no. 4 (2005): 360-8.
- Kim, J. B., H. N. Koo, H. J. Joeng, Y. S. Lyu, S. G. Park, J. H. Won, Y. K. Kim, S. H. Hong and H. M. Kim. "Induction of Apoptosis by Korean Medicine Gagam-Whanglyun-Haedoktang through Activation of Caspase-3 in Human Leukemia cell Line, HL-60 Cells." *J Pharmacol Sci* 97, no. 1 (2005): 138-45.
- Kim, U. J., J. Park, H. J. Kim, M. Wada and D. L. Kaplan. "Three-Dimensional Aqueous-Derived Biomaterial Scaffolds from Silk Fibroin." *Biomaterials* 26, no. 15 (2005): 2775-85.
- Koide, J. "[Nk-Like Cytotoxicity of Allospecific Gamma Delta Tcr+ T Cell Clones]." *Hum Cell* 3, no. 3 (1990): 220-5.
- Komatsu, K. "[Postmortem Serum Protein in Human Autopsy Cases (Author's Transl)]." *Fukuoka Igaku Zasshi* 66, no. 4 (1975): 221-40.
- Kumar Dasappa, J. and H. G. Nagendra. "Preferential Selectivity of Inhibitors with Human Tau Protein Kinase Gsk3beta Elucidates Their Potential Roles for Off-Target Alzheimer's Therapy." *Int J Alzheimers Dis* 2013, (2013): 809386.
- Lee, C. R., A. J. Grodzinsky and M. Spector. "The Effects of Cross-Linking of Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds on Compressive Stiffness, Chondrocyte-



- Mediated Contraction, Proliferation and Biosynthesis." *Biomaterials* 22, no. 23 (2001): 3145-54.
- Lee, G. Y., P. A. Kenny, E. H. Lee and M. J. Bissell. "Three-Dimensional Culture Models of Normal and Malignant Breast Epithelial Cells." *Nat Methods* 4, no. 4 (2007): 359-65.
- Lee, Sang Bong, Hyun Wook Jeon, Young Woo Lee, Young Moo Lee, Kang Won Song, Moon Hyang Park, Young Soo Nam and Hee Chang Ahn. "Bio-Artificial Skin Composed of Gelatin and (1→3), (1→6)-**B**-Glucan." *Biomaterials* 24, no. 14 (2003): 2503-2511.
- Li, M., M. Ogiso and N. Minoura. "Enzymatic Degradation Behavior of Porous Silk Fibroin Sheets." *Biomaterials* 24, no. 2 (2003): 357-65.
- Lin, R. Z. and H. Y. Chang. "Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture for Biomedical Research." *Biotechnol J* 3, no. 9-10 (2008): 1172-84.
- Liu, B. H., H. Y. Yeh, Y. C. Lin, M. H. Wang, D. C. Chen, B. H. Lee and S. H. Hsu. "Spheroid Formation and Enhanced Cardiomyogenic Potential of Adipose-Derived Stem Cells Grown on Chitosan." *Biores Open Access* 2, no. 1 (2013): 28-39.
- Liu, J., L. Ma, J. Xu, C. Liu, J. Zhang, J. Liu, R. Chen and Y. Zhou. "Spheroid Body-Forming Cells in the Human Gastric Cancer Cell Line Mkn-45 Possess Cancer Stem Cell Properties." *Int J Oncol* 42, no. 2 (2013): 453-9.
- Lou, X. and T. V. Chirila. "Swelling Behavior and Mechanical Properties of Chemically Cross-Linked Gelatin Gels for Biomedical Use." *J Biomater Appl* 14, no. 2 (1999): 184-91.
- Lu, Q., X. Hu, X. Wang, J. A. Kluge, S. Lu, P. Cebe and D. L. Kaplan. "Water-Insoluble Silk Films with Silk I Structure." *Acta Biomater* 6, no. 4 (2010): 1380-7.

- Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees and G. M. Hutchins. "Henrietta Lacks, Hela Cells, and Cell Culture Contamination." *Arch Pathol Lab Med* 133, no. 9 (2009): 1463-7.
- Ma, L., C. Gao, Z. Mao, J. Shen, X. Hu and C. Han. "Thermal Dehydration Treatment and Glutaraldehyde Cross-Linking to Increase the Biostability of Collagen-Chitosan Porous Scaffolds Used as Dermal Equivalent." *J Biomater Sci Polym Ed* 14, no. 8 (2003): 861-74.
- Malay, O., O. Bayraktar and A. Batigun. "Complex Coacervation of Silk Fibroin and Hyaluronic Acid." *Int J Biol Macromol* 40, no. 4 (2007): 387-93.
- Mandal, B. B., A. S. Priya and S. C. Kundu. "Novel Silk Sericin/Gelatin 3-D Scaffolds and 2-D Films: Fabrication and Characterization for Potential Tissue Engineering Applications." *Acta Biomater* 5, no. 8 (2009): 3007-20.
- Mann, I. . "Animal by-Products : Processing and Utilization." *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, (1962): 246.
- Mao, J. S., L. G. Zhao, Y. J. Yin and K. D. Yao. "Structure and Properties of Bilayer Chitosan-Gelatin Scaffolds." *Biomaterials* 24, no. 6 (2003): 1067-74.
- Martin, I., R. F. Padera, G. V. Novakovic and L. E. Freed. "In Vitro Differentiation of Chick Embryo Bone Marrow Stromal Cells into Cartilaginous and Bone-Like Tissues." *Journal of Orthopedic Research* 16, (1998).
- Matsumoto, A., J. Chen, A. L. Collette, U. J. Kim, G. H. Altman, P. Cebe and D. L. Kaplan. "Mechanisms of Silk Fibroin Sol-Gel Transitions." *J Phys Chem B* 110, no. 43 (2006): 21630-8.
- Metzger, J., C. Chatzikyrikou, V. Broecker, E. Schiffer, L. Jaensch, A. Iphoefer, M. Mengel, W. Mullen, H. Mischak, H. Haller and W. Gwinner. "Diagnosis of Subclinical and Clinical Acute T-Cell-Mediated Rejection in Renal Transplant Patients by Urinary Proteome Analysis." *Proteomics Clin Appl* 5, no. 5-6 (2011): 322-33.

- Mondal, M., K. Trivedy and S. Nirmal Kumar. "The Silk Proteins, Sericin and Fibroin in Silkworm, *Bombyx Mori* Linn., - a Review." *J. Env. Sci.* 5 No.2, (2007).
- Monteagudo, E., R. Fernandez-Delgado, A. Sastre, T. Toll, A. Llorca, J. Molina, I. Astigarraga, M. A. Dasi, A. Cervera and P. T. I. de la Sociedad Espanola de Hematologia y Oncologia Pediatricas Grupo de Trabajo de la. "[Protocol for the Study and Treatment of Immune Thrombocytopenic Purpura (Itp). Itp-2010]." *An Pediatr (Barc)* 74, no. 6 (2011): 414 e1-8.
- Mosmann, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *J Immunol Methods* 65, no. 1-2 (1983): 55-63.
- Muvaffak, A., I. Gurhan and N. Hasirci. "Cytotoxicity of 5-Fluorouracil Entrapped in Gelatin Microspheres." *J Microencapsul* 21, no. 3 (2004): 293-306.
- Neuman, R. E. "The Amino Acid Composition of Gelatins, Collagens and Elastins from Different Sources." *Arch Biochem* 24, no. 2 (1949): 289-98.
- Nguyen, T. H., Y. H. Kim, H. Y. Song and B. T. Lee. "Nano Ag Loaded Pva Nano-Fibrous Mats for Skin Applications." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 96, no. 2 (2011): 225-33.
- Nguyen, Thi-Hiep and Byong-Taek Lee. "Fabrication and Characterization of Cross-Linked Gelatin Electro-Spun Nano-Fibers." *Journal of Biomedical Science and Engineering* 03, no. 12 (2010): 1117-1124.
- Ockerman, Herbert W. and C. L. Hansen. *Animal by-Product Processing* Ellis Horwood Series in Food Science and Technology. Chichester: VCH, 1988.
- Okhawilai, M., R. Rangkupan, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. "Preparation of Thai Silk Fibroin/Gelatin Electrospun Fiber Mats for Controlled Release Applications." *Int J Biol Macromol* 46, no. 5 (2010): 544-50.

- Peng, Z. Y., Y. Q. Shen and Z. P. Li. "Control of Size and Morphology of Gelatin Microspheres." *Journal of Macromolecular Science, Part B* 51, no. 1 (2012): 12-21.
- Pienta, K. J., T. Replogle and J. E. Lehr. "Inhibition of Prostate Cancer Growth by Vinblastine and Tamoxifen." *Prostate* 26, no. 5 (1995): 270-4.
- Pieper, J. S., T. Hafmans, J. H. Veerkamp and T. H. van Kuppevelt. "Development of Tailor-Made Collagen-Glycosaminoglycan Matrices: Edc/Nhs Crosslinking, and Ultrastructural Aspects." *Biomaterials* 21, no. 6 (2000): 581-93.
- Poppe, J. "Gelatin." In *Thickening and Gelling Agent for Food*, (1997).
- Qian, Y., Y. Shen, Z. Lu, Z. Fan, T. Liu, J. Zhang and F. Zhang. "[Biocompatibility of Silk Fibroin Nanofibers Scaffold with Olfactory Ensheathing Cells]." *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 23, no. 11 (2009): 1365-70.
- Quasar Collaborative, Group, R. Gray, J. Barnwell, C. McConkey, R. K. Hills, N. S. Williams and D. J. Kerr. "Adjuvant Chemotherapy Versus Observation in Patients with Colorectal Cancer: A Randomised Study." *Lancet* 370, no. 9604 (2007): 2020-9.
- Radisic, M., H. Park, H. Shing, T. Consi, F. J. Schoen, R. Langer, L. E. Freed and G. Vunjak-Novakovic. "Functional Assembly of Engineered Myocardium by Electrical Stimulation of Cardiac Myocytes Cultured on Scaffolds." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, no. 52 (2004): 18129-34.
- Ratanavaraporn, J., S. Damrongsakkul, N. Sanchavanakit, T. Banaprasert and S. Kanokpanont. "Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture." 16 No.1, (2006).
- Ratanavaraporn, J., S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. "The Development of Injectable Gelatin/Silk Fibroin Microspheres for the Dual Delivery of Curcumin and Piperine." *J Mater Sci Mater Med* 25, no. 2 (2013): 401-10.

- Ratanavaraporn, J., S. Kanokpanont, Y. Tabata and S. Damrongsakkul. "Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Stem Cells on Chitosan and Chitooligosaccharide Films." *Carbohydrate Polymer* 78, (2009): 873-878.
- Rodday, B., F. Hirschhaeuser, S. Walenta and W. Mueller-Klieser. "Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids." *J Biomol Screen* 16, no. 9 (2011): 1119-24.
- Sahoo, S. K., A. K. Panda and V. Labhasetwar. "Characterization of Porous PLGA/PLA Microparticles as a Scaffold for Three Dimensional Growth of Breast Cancer Cells." *Biomacromolecules* 6, no. 2 (2005): 1132-9.
- Sarabia, A. I., M. C. Gomez-Guillén and P. Montero. "The Effect of Added Salts on the Viscoelastic Properties of Fish Skin Gelatin." *Food Chemistry* 70, (2000).
- Sashina, E. S., A. M. Bochek, N. P. Novoselov and D. A. Kirichenko. "Structure and Solubility of Natural Silk Fibroin." *Russian Journal of Applied Chemistry* 79, no. 6 (2006): 869-876.
- Schrieber, Reinhard and Herbert Gareis. *Gelatine Handbook : Theory and Industrial Practice*. Weinheim Chichester: Wiley-VCH ; John Wiley distributor, 2007.
- Shah, M. R., C. L. Kriedt, N. H. Lents, M. K. Hoyer, N. Jamaluddin, C. Klein and J. Baldassare. "Direct Intra-Tumoral Injection of Zinc-Acetate Halts Tumor Growth in a Xenograft Model of Prostate Cancer." *J Exp Clin Cancer Res* 28, (2009): 84.
- Sionkowska, A. "Effects of Solar Radiation on Collagen and Chitosan Films." *J Photochem Photobiol B* 82, no. 1 (2006): 9-15.
- Sisson, K., C. Zhang, M. C. Farach Carson, B. Chase and J. F. Rabolt. "Evaluation of Cross-Linking Methods for Electrospun Gelatin on Cell Growth and Viability." *Biomacromolecules* 7 No.10, (2009).

- Srisuwan, Yaowalak, Nualchai Kotseang, Komsan Namtaku, Wilaiwan Simchuer, Chirapha Butiman and Prasong Srihanam. "Preparation of Eri Silk Fibroin and Gelatin Blend Film Loaded Chlorhexidine Using as Model for Hydrophilic Drug Release." *Natural Science* 04, no. 07 (2012): 454-460.
- Tabata, Y., S. Hijikata, M. Muniruzzaman and Y. Ikada. "Neovascularization Effect of Biodegradable Gelatin Microspheres Incorporating Basic Fibroblast Growth Factor." *J Biomater Sci Polym Ed* 10, no. 1 (1999): 79-94.
- Tajima, S. and Y. Tabata. "Preparation and Functional Evaluation of Cell Aggregates Incorporating Gelatin Microspheres with Different Degradabilities." *J Tissue Eng Regen Med* 7, no. 10 (2013): 801-11.
- Takahashi, Y., M. Yamamoto and Y. Tabata. "Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Biodegradable Sponges Composed of Gelatin and Beta-Tricalcium Phosphate." *Biomaterials* 26, no. 17 (2005): 3587-96.
- Takano, K. and N. Arai. "Studies on the Food Value on the Basis of Feeding and Cocoon Productivity in the Silkworm *Bombyx Mori* L., Treatment of Food Intake and Cocoon Productivity." *J. Seri. Sci. J* (1978).
- Tanaka, K., S. Inoue and S. Mizuno. "Hydrophobic Interaction of P25, Containing Asn-Linked Oligosaccharide Chains, with the H-L Complex of Silk Fibroin Produced by *Bombyx Mori*." *Insect Biochem Mol Biol* 29, no. 3 (1999): 269-76.
- Taylor, S. W. and J. H. Waite. "Protein-Based Materials." Birkhäuser, Boston Chap 7, (1997).
- Tehrani, F. K. and S. Salami. "Cell Kinetic Study of Tamoxifen Treated MCF-7 and MDA-MB 468 Breast Cancer Cell Lines." *Iranian Biomedical Journal* 7(2), (2003): 51-56
- Tessanan, W. and P. Srihanam. "Morphology, Secondary Structure and Thermal Properties of Silk Fibroin/Gelatin Blend Films: Case Study of Cross-Linked Agent (Pegde)." *Int. J. Appl. Chem.* 7, (2011): 25-34.

- Thomas, C. A. "Drug Treatment of Hypertensive Crisis in Children." *Paediatr Drugs* 13, no. 5 (2011): 281-90.
- Tonin, C., M. Zoccola, A. Aluigi, A. Varesano, A. Montarsolo, C. Vineis and F. Zimbardi. "Study on the Conversion of Wool Keratin by Steam Explosion." *Biomacromolecules* 7, no. 12 (2006): 3499-504.
- Vachiraroj, N., J. Ratanavaraporn, S. Damrongsakkul, R. Pichyangkura, T. Banaprasert and S. Kanokpanont. "A Comparison of Thai Silk Fibroin-Based and Chitosan-Based Materials on in Vitro Biocompatibility for Bone Substitutes." *Int J Biol Macromol* 45, no. 5 (2009): 470-7.
- Vepari, C. and D. L. Kaplan. "Silk as a Biomaterial." *Prog Polym Sci* 32, no. 8-9 (2007): 991-1007.
- Verma, Shalini and Neeraj Kumar. "Effect of Biomimetic 3d Environment of an Injectable Polymeric Scaffold on Mg-63 Osteoblastic-Cell Response." *Materials Science and Engineering: C* 30, no. 8 (2010): 1118-1128.
- Wadbua, P., B. Promdonkoy, S. Maensiri and S. Siri. "Different Properties of Electrospun Fibrous Scaffolds of Separated Heavy-Chain and Light-Chain Fibroins of Bombyx Mori." *Int J Biol Macromol* 46, no. 5 (2010): 493-501.
- Walluscheck, K. P., G. Steinhoff, S. Kelm and A. Haverich. "Improved Endothelial Cell Attachment on Eptfe Vascular Grafts Pretreated with Synthetic Rgd-Containing Peptides." *Eur J VascEndovascSurg* 12, (1996): 321-330.
- Wang, S., Y. Zhang, H. Wang, G. Yin and Z. Dong. "Fabrication and Properties of the Electrospun Polylactide/Silk Fibroin-Gelatin Composite Tubular Scaffold." *Biomacromolecules* 10, no. 8 (2009): 2240-4.
- Wang, Y., H. J. Kim, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan. "Stem Cell-Based Tissue Engineering with Silk Biomaterials." *Biomaterials* 27, no. 36 (2006): 6064-82.

- Ward, A. G. and A. Courts. *The Science and Technology of Gelatin* Food Science and Technology. London ; New York: Academic Press, 1977.
- Wenk, E., H. P. Merkle and L. Meinel. "Silk Fibroin as a Vehicle for Drug Delivery Applications." *J Control Release* 150, no. 2 (2011): 128-41.
- Whu, S. W., K. C. Hung, K. H. Hsieh, C. H. Chen, C. L. Tsai and S. H. Hsu. "In Vitro and in Vivo Evaluation of Chitosan-Gelatin Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33, no. 5 (2013): 2855-63.
- Wongputtaraksa, T., J. Ratanavaraporn, R. Pichyangkura and S. Damrongsakkul. "Surface Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds with Gelatin and Chitooligosaccharide for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100, no. 8 (2012): 2307-15.
- Xiao, W., W. Liu, J. Sun, X. Dan, D. Wei and H. Fan. "Ultrasonication and Genipin Cross-Linking to Prepare Novel Silk Fibroin-Gelatin Composite Hydrogel." *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 27, no. 4 (2012): 327-341.
- Xu, F. and K. J. Burg. "Three-Dimensional Polymeric Systems for Cancer Cell Studies." *Cytotechnology* 54, no. 3 (2007): 135-43.
- Xu, X., B. Liu, P. Zou, Y. Zhang, J. You and F. Pei. "Silencing of LASS2/Tmsg1 Enhances Invasion and Metastasis Capacity of Prostate Cancer Cell." *J Cell Biochem* 115, no. 4 (2014): 731-43.
- Yeo, J. H., K.G. Lee, Y.W. Lee and S.Y. Kim. "Simple Preparation and Characteristics of Silk Fibroin Microsphere." *Eur. Polym. J* 35, (2003): 1195-1199.
- Zhang, Yu, Lei Sun, Jian Jiang, Xiaolin Zhang, Wenjun Ding and Zhihua Gan. "Biodegradation-Induced Surface Change of Polymer Microspheres and Its Influence on Cell Growth." *Polymer Degradation and Stability* 95, no. 8 (2010): 1356-1364.



- Zhou, C. Z., F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin, M. Duguet, R. Perasso and Z. G. Li. "Fine Organization of Bombyx Mori Fibroin Heavy Chain Gene." *Nucleic Acids Res* 28, no. 12 (2000): 2413-9.
- Zhu, X. H., C. H. Wang and Y. W. Tong. "Growing Tissue-Like Constructs with Hep3b/Hepg2 Liver Cells on Phbv Microspheres of Different Sizes." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82, no. 1 (2007): 7-16.





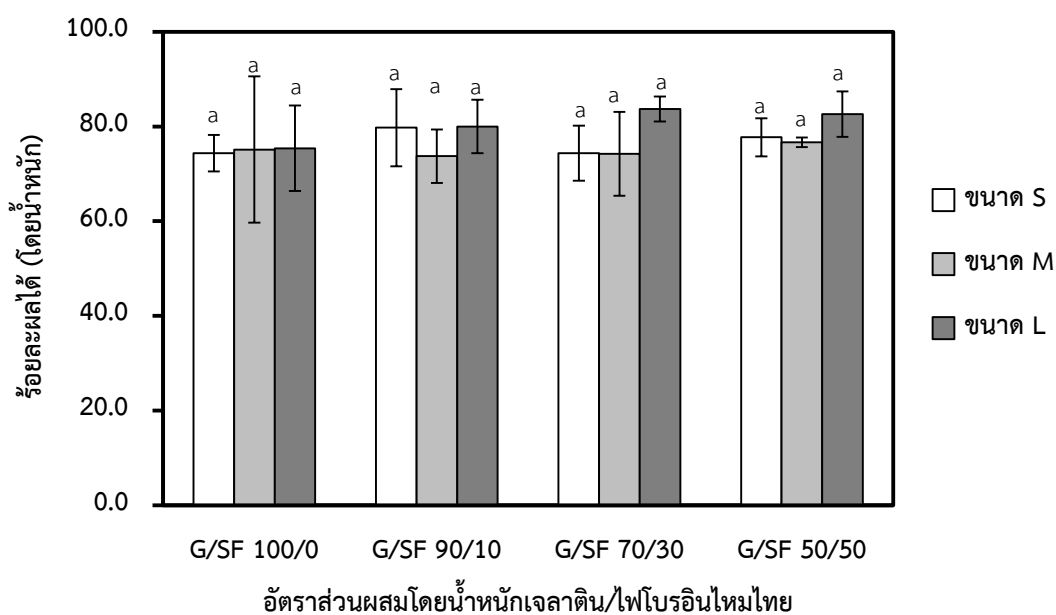
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ก

ร้อยละผลได้ (Yields) และการกระจายตัว (Size distribution) ของของอนุภาคไมโครเจลลาติน และไฟโบรอินไหมไทย

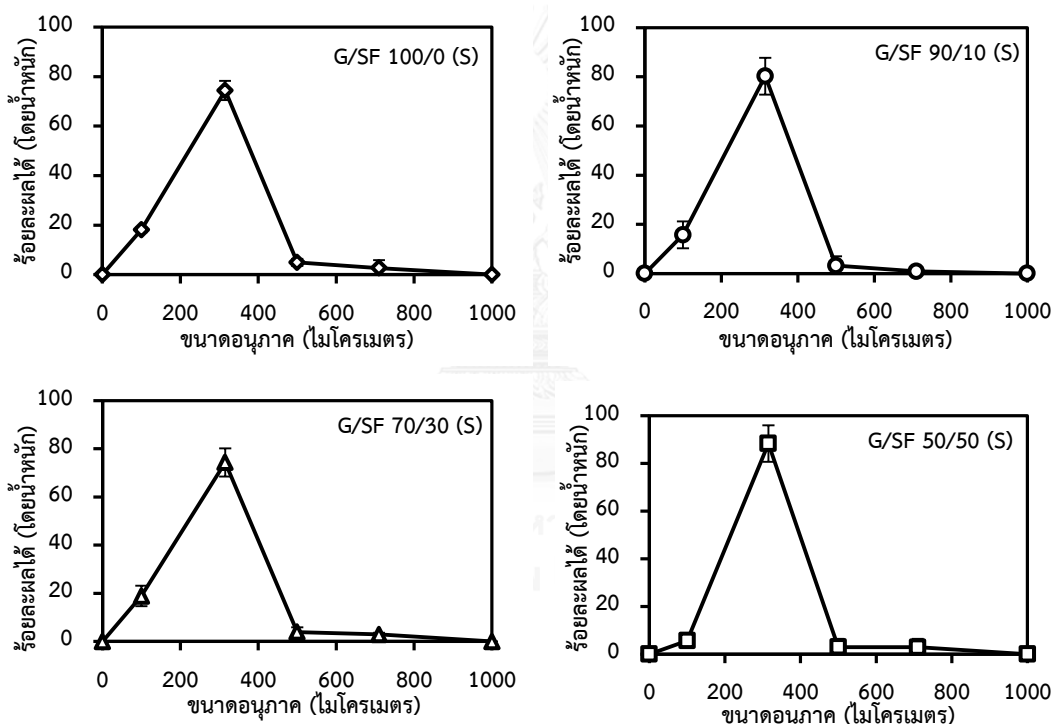
ร้อยละของผลได้ (Yields) ของขนาดเฉลี่ยจากการเตรียมอนุภาคไมโครเจล โดยศึกษาการขึ้นรูปอนุภาคด้วยความเร็วรอบของการปั่นกววน 3 ความเร็วรอบ เพื่อให้ได้ร้อยละผลได้ของขนาดเฉลี่ยประมาณ 70 – 90 ต้องใช้ความเร็วรอบในการปั่นกววนต่างกันได้แก่ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตรไมโครเมตร) และความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด L ( $736.64 \pm 17.51$  ไมโครเมตร) (รูปที่ ก.1)



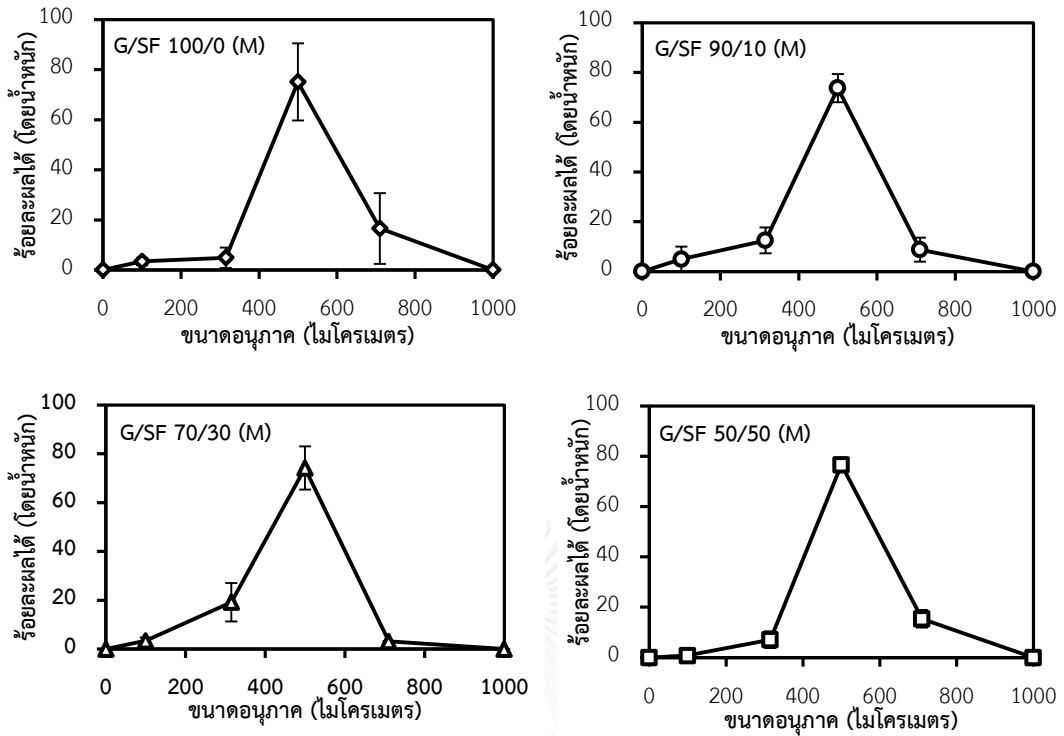
รูปที่ ก.1 ร้อยละผลได้ (Yields) ของขนาดเฉลี่ยอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ จากผลของความเร็วยรอบ 3 ขนาด คือ ความเร็วยรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด S, ความเร็วยรอบ 130 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด M และ ความเร็วยรอบ 110 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด L (a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$ )

### การกระจายตัวของขนาดอนุภาค (size distribution)

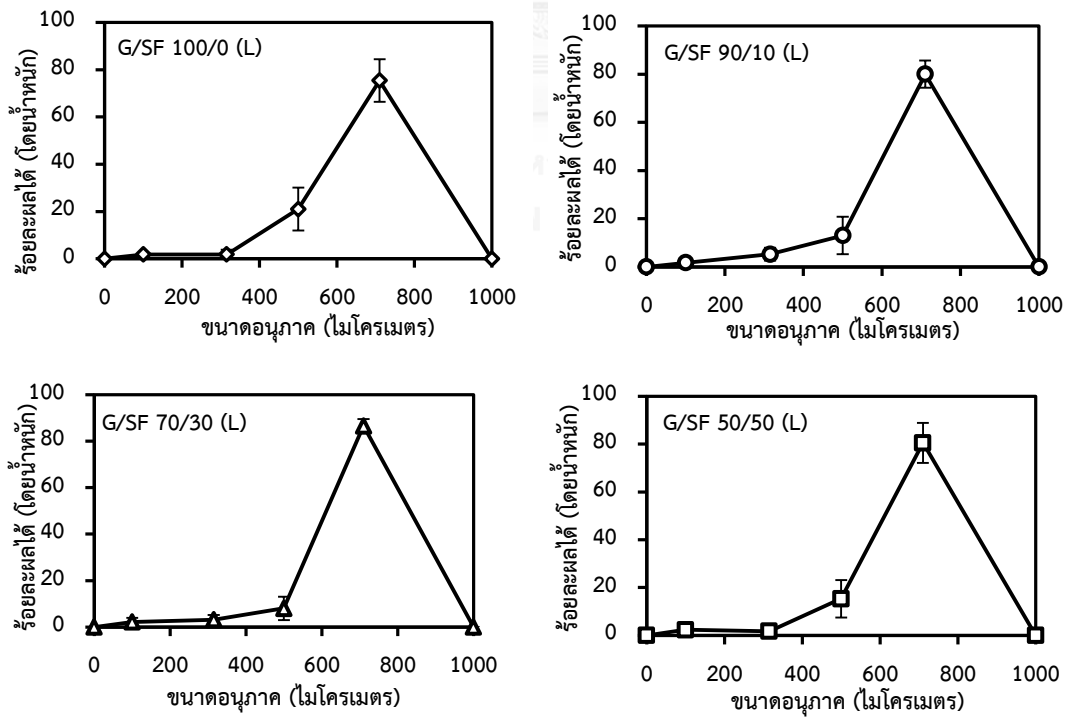
การกระจายตัวของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผลิตได้ทุกอัตราส่วนผสมของขนาดอนุภาค S โดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที มีร้อยละผลได้สูงสุดอยู่ในช่วง 212-315 คิดเป็นร้อยละประมาณ 70 ของอนุภาคทั้งหมดที่ผลิตได้ ส่วนขนาดอนุภาค M ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที การกระจายตัวของขนาดอนุภาคจะอยู่ในช่วง 315 – 500 เป็นส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 70 และขนาดอนุภาค L ที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที มีการกระจายตัวของอนุภาคส่วนใหญ่อยู่ในช่วงมากกว่า 710 ไมโครเมตร ประมาณร้อยละ 70-80



รูปที่ ก.2 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค S (size distribution) ของอนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินที่อัตราส่วนผสมต่างๆ และการคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงกรองขนาดต่างๆ



รูปที่ ๓.3 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค M (size distribution) ของอนุภาคไมโครเจลาติน และไฟโบรอินที่อัตราส่วนผสมต่างๆ และการคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ



รูปที่ ๓.4 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค L (size distribution) ของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินที่อัตราส่วนผสมต่างๆ และการคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ

## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์ค่าความหนืดของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

การวัดความหนืดของสารละลายทำให้ทราบถึงการต้านทานการไหลของสารละลายที่ใช้ ซึ่งวิธีการวัดทำโดยใช้เครื่องวัดความหนืดแบบสั่นสะเทือน (Vibro viscometer) อาศัยหลักการสั่นสะเทือนส่งผ่านไฟฟ้าแม่เหล็กที่แช่ในสารละลายที่ความถี่ 30 เฮิร์ต เหมาะสำหรับความสารที่มีความหนืดสูง

#### การเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก ได้แก่ 100/0, 90/10, 70/30, 50/50 และ 0/100 ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 (โดยน้ำหนัก) ในน้ำปราศจากไอออน
2. จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
3. นำไปสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ค่าความหนืดด้วยเครื่อง Viscometer (SV-10 Vibro Viscometer, A&D Company Ltd., Japan) โดยใช้ปริมาตรในการวัด 10-15 มิลลิลิตร

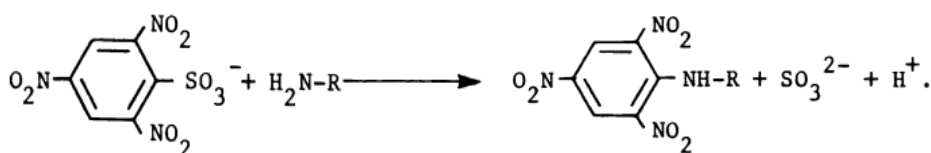


รูปที่ ข.1 เครื่องวัดความหนืดแบบสั่นสะเทือน (Vibro Viscometer)

## ภาคผนวก ค

## การวิเคราะห์ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยวิธี TNBS

การหาร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ โดยสาร TNBS ทำปฏิกิริยากับหมู่  $-NH_2$  อิสระของโปรตีนที่ค่าพีเอชสูง ( $pH > 9$ ) ได้ผลิตภัณฑ์สีเหลืองซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Trinitrophenyl และซัลไฟด์ไอออน ดังรูปที่ ค.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้  $\beta$ -Alanine เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ [Bubnis W.A. และ Ofner lii C.M. 1992]



รูปที่ ค. 1 การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) กับหมู่  $-NH_2$  อิสระของโปรตีน [Bubnis W.A. และ Ofner lii C.M. 1992]

**วิธีการทดลอง** [ดัดแปลงวิธีจาก Bubnis W.A. 1992 และ Ratanavaraporn J. และคณะ 2013]

1. ชั่งน้ำหนักอนุภาคไมโครไม่ผ่านและผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์และด้วยความร้อน 5 มิลลิกรัม
2. เติมสารละลาย  $\text{NaHCO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย TNBS ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในอ่างให้ความร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยปริมาตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศา เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้อนุภาคไมโครละลายอย่างสมบูรณ์
4. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Germany)
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน beta-alanine

### วิธีการทำกราฟมาตรฐาน beta-alanine

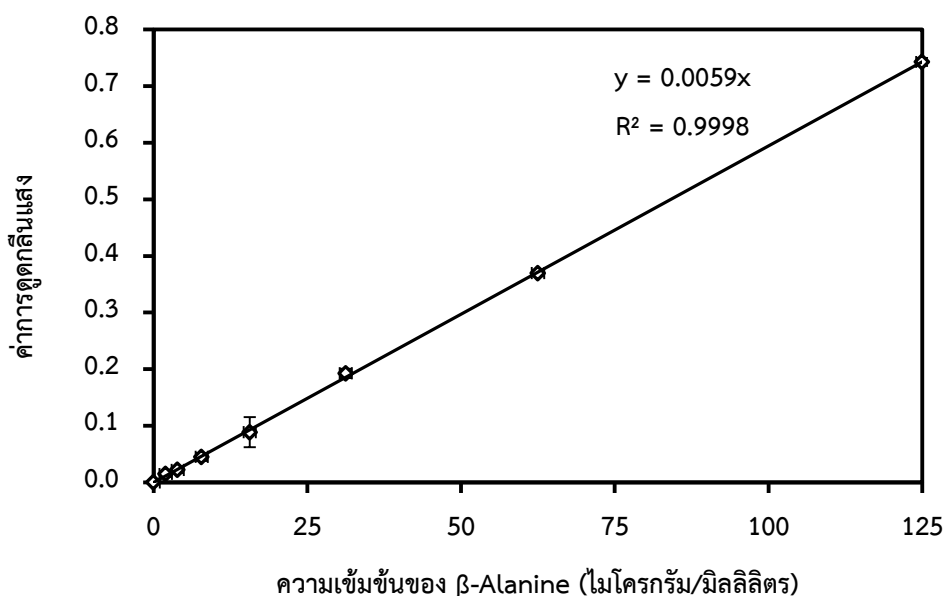
1. เตรียม beta-alanine โดยการเจือจางเป็นลำดับเท่า (serial dilution) ความเข้มข้นร้อยละ 0-1000 โดยปริมาตร และเตรียม blank โดยใช้ น้ำปราศไออน
2. ทำตามขั้นตอนที่ 1-4 ข้างต้นโดยการเปลี่ยนจากอนุภาคไมโครเป็นสารละลาย beta-alanine
3. พล็อตกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ beta-alanine (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

คำนวณร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad \dots\dots\dots(\text{ค.1})$$

โดยที่ A คือ ปริมาณหมู่  $\text{-NH}_2$  อิสระของโปรตีน ก่อนการเชื่อมขวาง

B คือ ปริมาณหมู่  $\text{-NH}_2$  อิสระของโปรตีน หลังการเชื่อมขวาง



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐาน  $\beta$ -alanine (n=3)

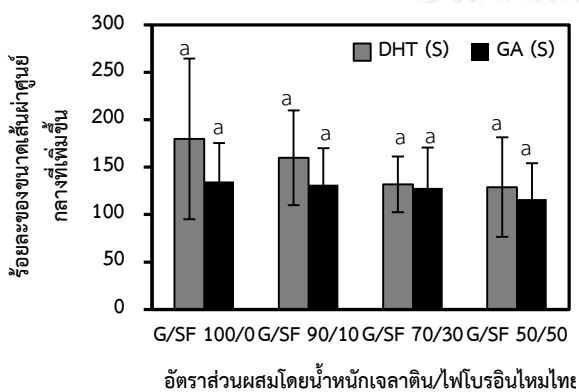


ภาคผนวก ง

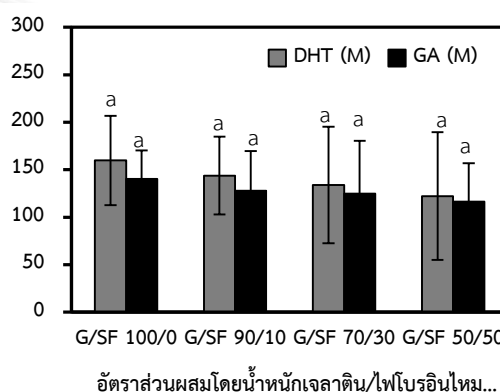
ร้อยละของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่เพิ่มขึ้นจากการบวมน้ำ (Swelling)

การศึกษาระดับการเชื่อมขวางสามารถอธิบายได้ด้วยปัจจัยหลายประการ โดยหนึ่งวิธีการหาอัตราการเชื่อมขวางคือการวัดความสามารถในการดูดซับน้ำที่เพิ่มขึ้นหลังจากเชื่อมขวางอนุภาคไมโคร แต่อัตราการดูดซับน้ำสามารถหาได้ 2 วิธีคือการวัดน้ำหนักของอนุภาคไมโครเปียกภายหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เทียบกับน้ำหนักอนุภาคไมโครแห้ง และการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่เพิ่มขึ้นหลังจากอนุภาคดูดซับน้ำเต็มที่ ดังนั้นในรูปที่ ง.1 แสดงร้อยละของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่เพิ่มขึ้นจากการบวมน้ำของอนุภาค เพื่อการศึกษาระดับการเชื่อมขวาง

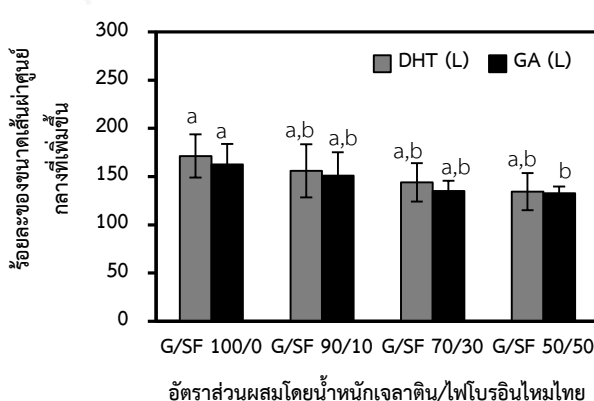
(ก)



(ข)



(ค)



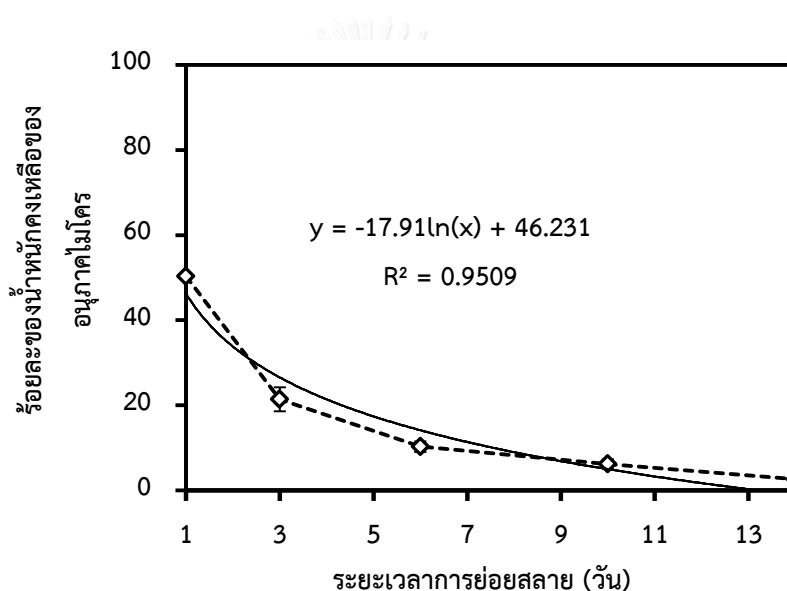
รูปที่ ง.1 ร้อยละของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่เพิ่มขึ้นจากการบวมน้ำ (Swelling) ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ถูกเชื่อมขวางด้วย GA และด้วยวิธี DHT (ก) ขนาด S (ข) ขนาด M (ค) ขนาด L (a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$ )

## ภาคผนวก จ

การหาครึ่งชีวิต (haft life,  $t_{1/2}$ ) ของการย่อยสลายของอนุภาคไมโคร

ค่าครึ่งชีวิต (haft life,  $t_{1/2}$ ) ของการย่อยสลายของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยแสดงถึงการใช้ระยะเวลาของการย่อยสลายที่เร็วก็สามารถย่อยสลายได้ลดลงถึงร้อยละ 50 จากเริ่มต้น โดยสามารถคำนวณค่าครึ่งชีวิตได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนัคงเหลือของอนุภาคไมโครกับระยะเวลาการย่อยสลาย

## ตัวอย่างการคำนวณ



**รูปที่ จ.1** ร้อยละของน้ำหนัคงเหลือของอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100/0 ขนาดอนุภาค M  
กราฟรูปที่ จ.1 สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของน้ำหนัคงเหลือของอนุภาคไมโครกับระยะเวลาการย่อยสลายให้อยู่ในรูปค่าครึ่งชีวิต (haft life,  $t_{1/2}$ ) ได้จากสมการที่อยู่ในรูปของฟังก์ชันลอการิทึม  $y = -17.91\ln(x) + 46.231$  จากสมการสามารถหาค่า  $x$  โดยแทนค่า  $y$  เท่ากับ 50

$$\text{ได้สมการ } y = -17.91\ln(x) + 46.231$$

$$50 = -17.91\ln(x) + 46.231$$

$$x = 0.81 \text{ วัน}$$

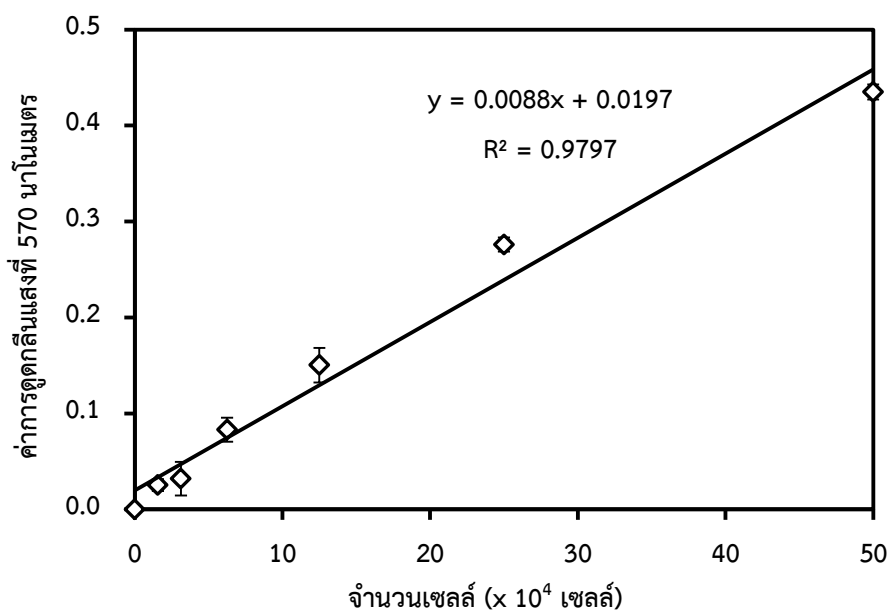
ดังนั้น ระยะเวลาที่สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 0.81 วัน

## ภาคผนวก ฉ

## กราฟมาตรฐานของการยัดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโคร

## ด้วยวิธี Agitation Seeding และวิธี Centrifugal Seeding

การเปรียบเทียบการยัดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโคร โดยเพาะเลี้ยง 2 วิธี คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการเขย่า (Agitation seeding) ทำโดยเพาะเซลล์ลงบนอนุภาคไมโคร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเชื้อที่มี 5 % CO<sub>2</sub> [Takahashi Y. และคณะ 2005] สำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugal Seeding) ทำโดยการเพาะเซลล์ลงบนอนุภาคไมโครแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) เป็นเวลา 5 นาที ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในสภาวะสแตติกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง [Godbey W.T. และคณะ 2004]

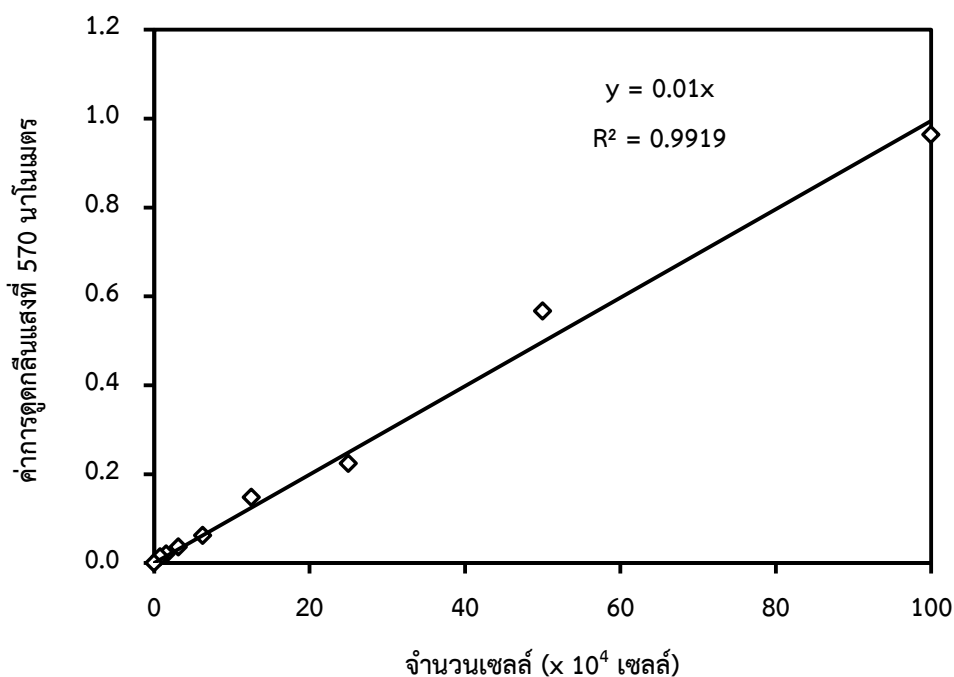


รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานของการยัดเกาะของเซลล์บนอนุภาคไมโครด้วยวิธี Agitation Seeding และวิธี Centrifugal Seeding

## ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Agitation Seeding ที่จำนวน  
เซลล์เริ่มต้นต่างๆ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง

การหาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งแสดงรูปแบบจำนวนเซลล์และร้อยละการยึดเกาะ ทำโดยเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นจาก  $0.5 \times 10^4$ ,  $0.86 \times 10^4$ ,  $1.67 \times 10^4$ ,  $3.34 \times 10^4$  และ  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมของอนุภาคไมโครขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ใน cryo vial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง



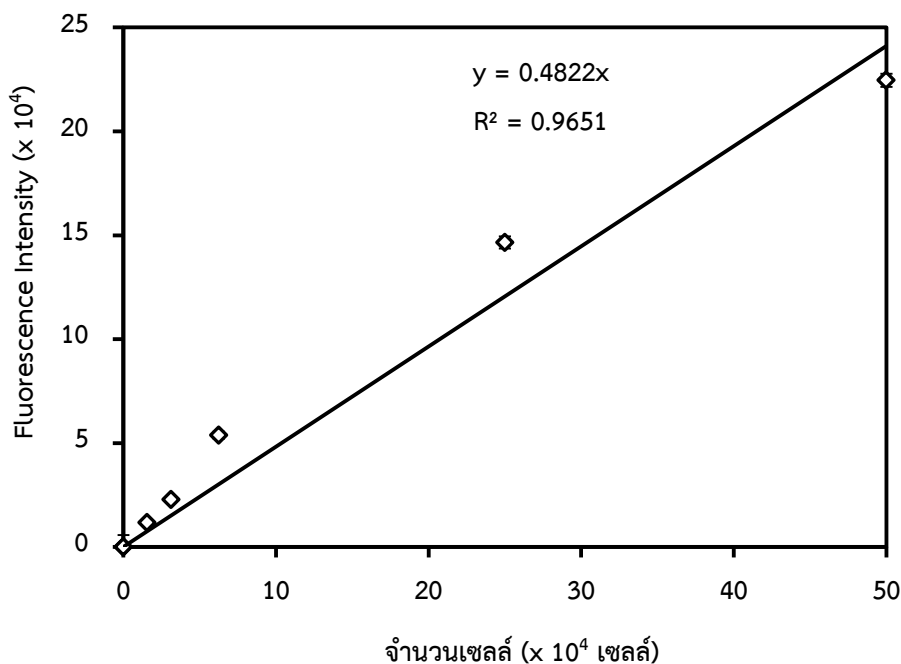
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงด้วย Agitation Seeding ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างๆ

## ภาคผนวก ข

## การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC)

## ด้วยวิธี DNA assay

การวัดปริมาณเซลล์ด้วยวิธี DNA assay โดยการใช้สารเรืองแสง เช่น Bisbenzidine (Hoechst) ที่มีคุณสมบัติจำเพาะกับ DNA โดยย้อมบริเวณเบส A-T ให้เรืองแสงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์มีการกระตุ้นด้วยความถี่ 340-380 นาโนเมตร และปลดปล่อยพลังงานแสงที่ 430-450 นาโนเมตร [Takahashi Y. และคณะ 2005] และหาปริมาณของเซลล์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเซลล์วิธีการมีดังนี้



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูด้วยวิธี DNA assay

ตัวอย่างการคำนวณ

จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่เวลา 7 วัน แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่า Fluorescent intensity ได้ 120,964

จำนวนเซลล์ =  $\frac{\text{Fluorescent intensity ของสารละลายตัวอย่าง} - \text{ตัวควบคุม (Blank)}}{\text{ความชันที่ได้จากราฟมาตรฐาน}}$

ความชันที่ได้จากราฟมาตรฐาน

$$\text{ดังนั้น จำนวนเซลล์} = (120,964 - 10,449) / 0.4822 = 229,189 \text{ เซลล์}$$

### คำนวณอัตราการเจริญเติบโต

คำนวณจาก Log phase (Exponential) ดังสมการต่อไปนี้

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (\text{ต่อชั่วโมง}) \quad (\text{ฉ.1})$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{X} dx \quad (\text{ฉ.2})$$

$$\mu (t_2 - t_1) = \ln x_2 - \ln x_1 \quad (\text{ฉ.3})$$

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{ฉ.4})$$

โดย  $X_1$  คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา  $t_1$

$X_2$  คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา  $t_2$

คำนวณเวลาแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time ; PDT (ชั่วโมง))

โดยที่  $PDT = T_2 - T_1$  และ  $X_2 = 2X_1$

$$\text{จากสมการ (3)} \quad (PDT) = \ln(2X_1) - \ln X_1 \quad (\text{ฉ.5})$$

$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{ฉ.6})$$

จากรูปที่ ฉ.2 สามารถคำนวณอัตราการเจริญเติบโตและเวลาแบ่งตัวทวีคูณจากช่วง Log phase วันที่ 1 ถึง 5 ของการเพาะเลี้ยง

- จำนวนเซลล์วันที่ 1 เท่ากับ  $0.47 \times 10^5$  เซลล์
- จำนวนเซลล์วันที่ 5 เท่ากับ  $1.29 \times 10^5$  เซลล์

$$\text{จากสมการ (ฉ.4)} \quad \mu = \frac{\ln (1.29 \times 10^5) - \ln (0.47 \times 10^5)}{(120 - 24)}$$

$$\mu = 8.27 \times 10^{-3} \text{ ต่อชั่วโมง}$$

จากสมการ (ฉ.6)

$$\begin{aligned} \text{PDT} &= \ln 2 / 8.27 \times 10^{-3} \\ &= 90.88 \pm 4.63 \text{ ชั่วโมง} \end{aligned}$$

ดังนั้น อัตราการเจริญเติบโต ( $\mu$ ) มีค่าเท่ากับ  $8.27 \times 10^{-3}$  ต่อชั่วโมง

เวลาแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) มีค่าเท่ากับ  $90.88 \pm 4.63$  ชั่วโมง

การคำนวณร้อยละการยืดเกาะ

$$\text{ร้อยละการยืดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}}$$

เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์  $1.67 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม และจำนวนเซลล์วันที่เวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ  $1.39 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม

$$\text{ร้อยละการยืดเกาะ} = \frac{1.39 \times 10^4}{1.64 \times 10^4} \times 100$$

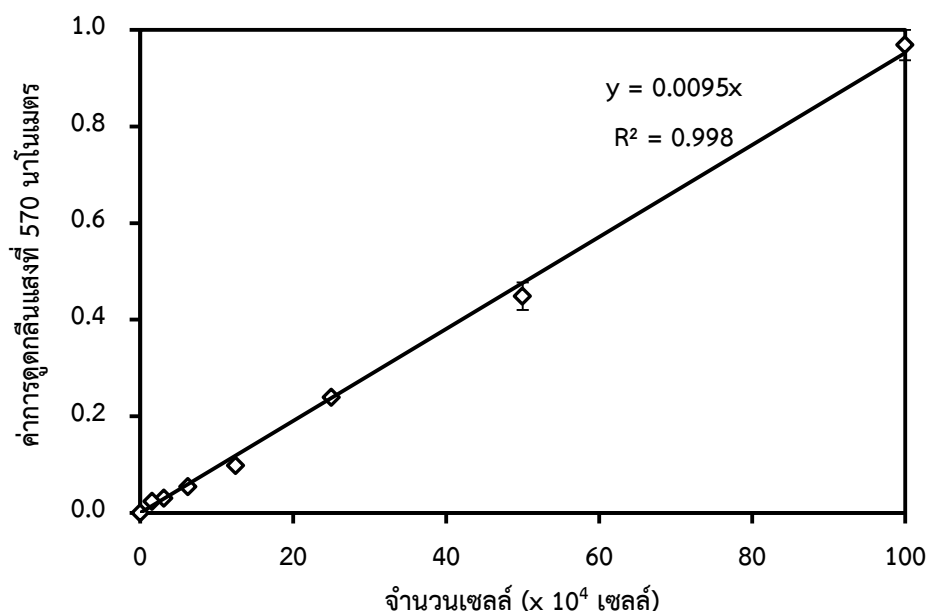
ดังนั้น ร้อยละการยืดเกาะของเซลล์มีค่าเท่ากับ 54

## ภาคผนวก ฉ

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมหลังจากการทดสอบการเจริญเติบโต

ด้วยวิธี MTT assay

การศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ใน cryo vial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงด้วยวิธีแบบ Agitation seeding เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อในสภาวะสแตติกที่เวลาต่างๆ และประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983]

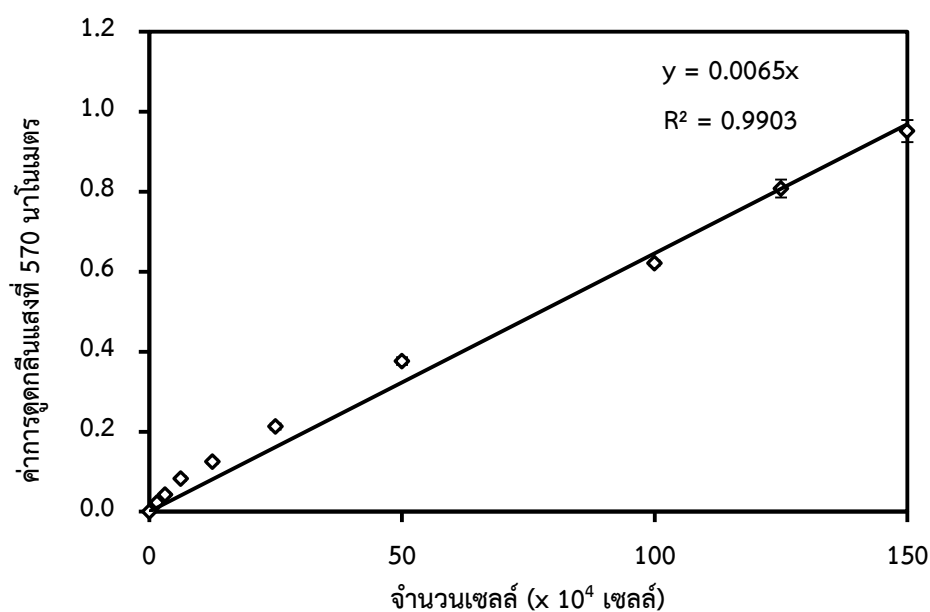


**รูปที่ ฉ.1** กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมหลังจากการทดสอบเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโครขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay



กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมหลังการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ที่  
เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครขนาดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay

การศึกษาผลของอนุภาคไมโครขนาด 3 ขนาด ได้แก่ ขนาด S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) ขนาด M ( $555.66 \pm 23.58$  ไมโครเมตร) และขนาด L ( $736.64 \pm 17.51$  ไมโครเมตร) และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธีการเชื่อมขวาง 2 วิธีคือ การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และการเชื่อมขวางด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะความดันบรรยากาศ ทำโดยเพาะเซลล์ด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ใน cryo vial และเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Agitation seeding เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อในสภาวะสถิตย์ จากนั้นประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983] หลังการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ

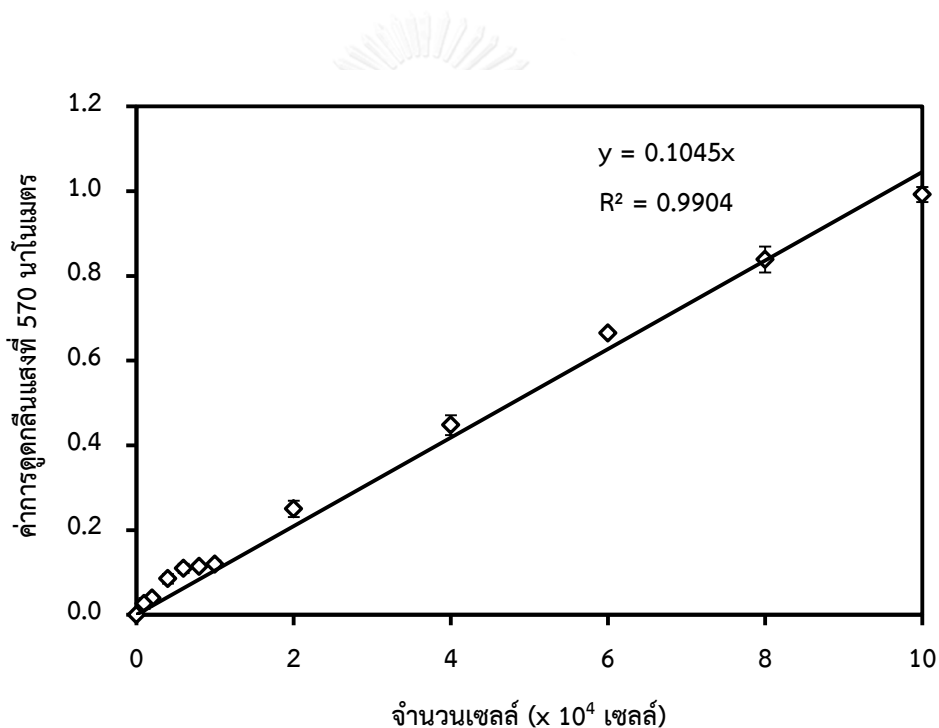


รูปที่ ๓.2 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมบนอนุภาคไมโครขนาด S, M และ L ที่อัตราส่วนผสม 100/0 และ 50/50 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย GA และ DHT ด้วยวิธี MTT assay

### ภาคผนวก ญ

#### การหาความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ของการทดสอบความไวต่อยา

การทดสอบความไวของยาที่มีออกซิเฟนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยเฉพาะเลี้ยงแบบสองมิติบนจานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ใน 96 well plate ( $1.25 \times 10^5$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ จากนั้นวัดหาปริมาณการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983]

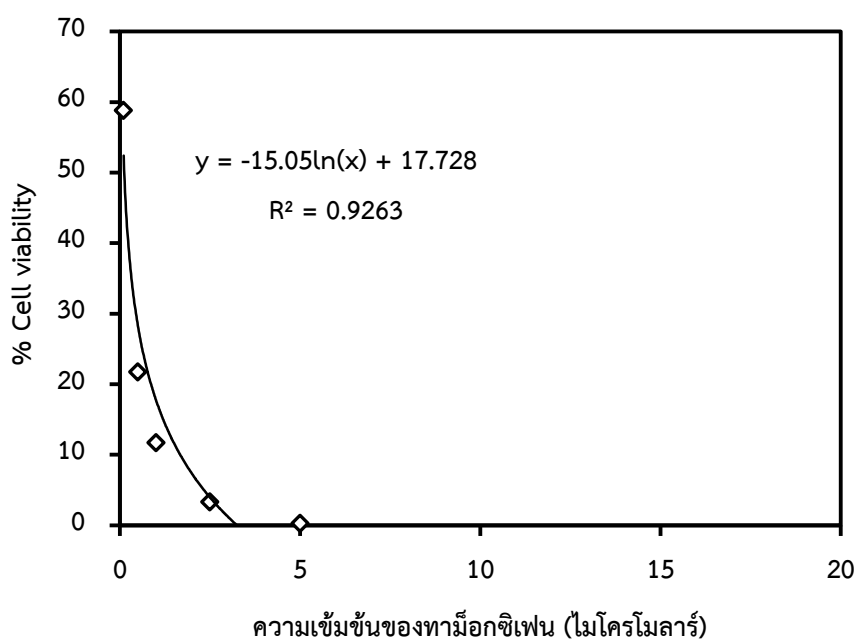


รูปที่ ญ.1 กราฟมาตรฐานของการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ ด้วยวิธี MTT assay

## การหาความสัมพันธ์ของร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และความเข้มข้นของยาในการทดสอบ

### ความไวต่อยาโดยการเลี้ยงแบบสองมิติ

การหาค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายเท่ากับร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) สามารถหาได้จากกราฟรูปที่ ๑.1 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และความเข้มข้นต่างๆของยา ทาม็อกซิเฟน โดยอธิบายได้จากสมการที่อยู่ในรูปของฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic equation) [Sahib H.B. และคณะ 2014]



### รูปที่ ๑.2 ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งในการทดสอบความไวต่อยารักษาโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ

กราฟรูปที่ ๑.2 ใช้สมการในการหาค่าความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายเท่ากับร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ได้จากสมการ  $y = -15.05\ln(x) + 17.728$  ; หาค่า  $x$  โดยการแทนค่า  $y$  เท่ากับ 50

$$50 = -15.05 \ln(x) + 17.728$$

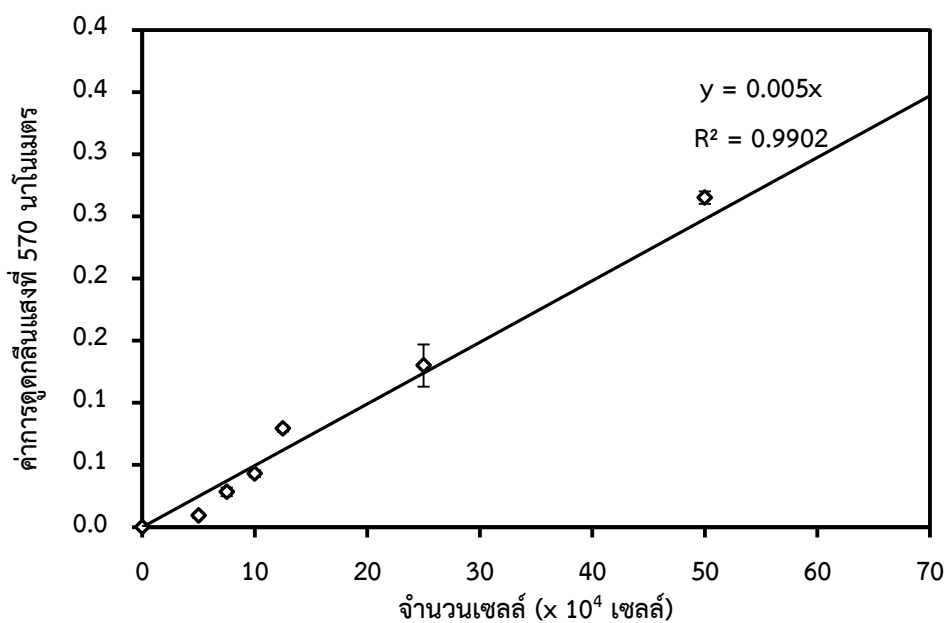
$$\ln(x) = \frac{50 - 17.728}{(-15.05)}$$

$$x = 0.12$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 เท่ากับ 0.12 ไมโครโมลาร์

การทดสอบความไวของยาทาน็อกซิเฟนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์  
มะเร็งเต้านมโดยเพาะเลี้ยงแบบสามมิติ

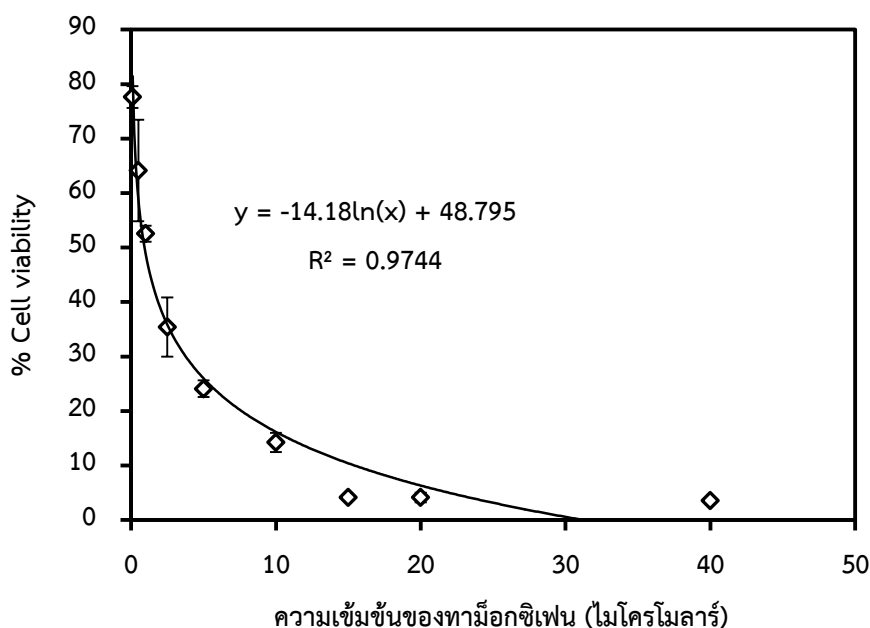
การทดสอบความไวของยาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมแบบสามมิติ ทำโดยเพาะเซลล์ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $1.29 \times 10^6$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรของอนุภาคไมโคร) เป็นเวลา 7 วัน หรือ  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม ( $3.56 \times 10^6$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรของอนุภาคไมโคร) เพาะลงบนอนุภาคไมโครขนาด S ( $316.78 \pm 13.23$  ไมโครเมตร) เป็นเวลา 3 วัน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปริมาณการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay [Mosmann T. 1983]



รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานของการทดสอบความไวต่อยารักษามะเร็งโดยการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ บนอนุภาคไมโครขนาด S ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ด้วยวิธี MTT assay

การหาความสัมพันธ์ของร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และความเข้มข้นของยาโดยการ  
 เล็งแบบสามมิติบนอนุภาคไมโครที่เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์เริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม

การหาความสัมพันธ์ของร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และความเข้มข้นของยาสามารถหาได้  
 จากรูปที่ ญ.4 โดยสมการที่ได้จะอยู่ในรูปของฟังก์ชันลอการิทึมได้สมการ  $y = -14.18 \ln(x) + 48.795$



รูปที่ ญ.4 ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งในการทดสอบความไวต่อยารักษาโดยการ  
 เพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโครขนาด 5 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์  
 โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $8.35 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

สมการฟังก์ชันลอการิทึม  $y = -14.18 \ln(x) + 48.795$  แทนค่า  $y$  เท่ากับ 50 เพื่อหา  $x$

จะได้  $50 = -14.18 \ln(x) + 48.795$

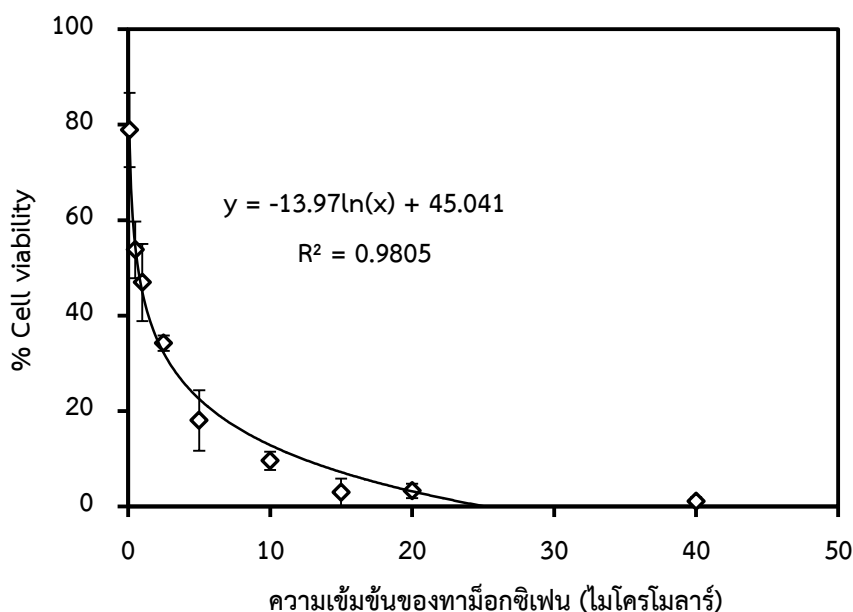
$$\ln(x) = \frac{50 - 48.795}{(-14.18)}$$

$$x = 0.92$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) มีค่าเท่ากับ 0.92 ไมโครโมลาร์

การหาความสัมพันธ์ของร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และความเข้มข้นของยาโดยการเลี้ยงแบบ  
สามมิติบนอนุภาคไมโครที่เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์เริ่มต้น  $23.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม

กราฟรูปที่ ๕.5 สามารถหาความเข้มข้นของยาที่ลดลงเท่ากับร้อยละ 50 ของจำนวนเซลล์ที่  
ตาย ( $IC_{50}$ ) ได้จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และความเข้มข้นของยา  
ได้สมการที่อยู่ในรูปของฟังก์ชันลอการิทึม  $y = -13.97 \ln(x) + 45.041$



รูปที่ ๕.5 ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งในการทดสอบความไวต่อยารักษาโดยการ  
เพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโครขนาด 5 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์  
โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $23.3 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิกรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

สมการ  $y = -13.97 \ln(x) + 45.041$ ; หาค่า  $x$  โดยการแทนค่า  $y$  เท่ากับ 50

$$50 = -13.97 \ln(x) + 45.041$$

$$\ln(x) = \frac{50 - 45.041}{(-13.97)}$$

$$x = 0.70$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของยาที่ทำให้เซลล์ตายลดลงร้อยละ 50 เท่ากับ 0.70 ไมโครโมลาร์

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสวรรรยา สินธพ เกิดเมื่อวันที่ 5 พฤษภาคม พ.ศ. 2530 เกิดที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในปีการศึกษา 2549 จากโรงเรียนแก่นนครวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2552 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

#### ผลงานในการประชุมวิชาการ

S. Sinthop and S. Kanokpanont. Characteristics of Microspheres Prepared from Gelatin Blended with Silk fibroin, Poster Presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON2013), The Tide Resort, Chon Buri, Thailand, 23 – 25 January 2013

S. Sinthop, S. Patumraj, S. Kanokpanont, Development of Gelatin-Thai Silk fibroin Microspheres For Three Dimensional Cell Culture, Oral Presentation, The 5th KKU International Engineering Conference 2014 “Engineering and Technology Responses to Global Challenges”, Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, KhonKaen, Thailand, 27 - 29 March 2014

#### งานที่ได้ตีพิมพ์

S. Sinthop, S. Patumraj, S. Kanokpanont, Development of Gelatin-Thai Silk Fibroin Microspheres for Three Dimensional Cell Culture, Advanced Material Research, 931-932 (2014) : 200-204