

การปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นหนังแท้ด้วยผลิตภัณฑ์ไครโอพรีซิพิเตท, พลาสมา
และเกลือเคอแลทของมนุษย์ เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

นางสาวดวงฤดี อรุณเลิศศรีศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MODIFICATION OF SCAFFOLDS BY HUMAN CRYOPRECIPITATE, PLASMA
AND CONCENTRATED PLATELET FOR SKIN TISSUE ENGINEERING

Miss Duangrudee Arunlertratsamee

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 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นหนังแท้ด้วยผลิตภัณฑ์โครโอปรีซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง
โดย	นางสาวดวงฤดี อรุณเลิศศรีศรี
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.โสครดา กนกพานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.โสครดา กนกพานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ)

..... กรรมการ
(ดร.อุรษา รัชต์ตานนท์ชัย)

ดวงฤดี อรุณเลิศศรีศรี : การปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ชั้นผิวหนังแท้โดยใช้ผลิตภัณฑ์
ไครโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง
(MODIFICATION OF SCAFFOLDS BY HUMAN CRYOPRECIPITATE, PLASMA AND
CONCENTRATED PLATELET FOR SKIN TISSUE ENGINEERING) อ. ที่ปรึกษา:
อ.ดร.ไศรดา กนกพานนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ 140 หน้า.

การกระตุ้นการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อจำเป็นต้องโกรสแฟคเตอร์ (Growth factor) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์
ย้ายที่เข้าสู่บริเวณที่มีการสูญเสียเนื้อเยื่อ เนื่องจากโกรสแฟคเตอร์บริสุทธิ์มีราคาสูง จึงทำให้เกิดความสนใจในการใช้
โปรตีนและไซโตคายน์ที่มีอยู่ในเซลล์และองค์ประกอบของเลือด ในงานวิจัยนี้ศึกษาการปรับปรุงคุณภาพของโครง
เลี้ยงเซลล์โดยใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ไครโอปริซิพิเตท (Cryoprecipitate) พลาสมา (Plasma)
และเกล็ดเลือดเข้มข้น (Concentrated platelet) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการทดลองเตรียมโดยกระบวนการทำแห้งด้วย
ความเย็นของสารละลายผสมระหว่างผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์และสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซานที่มีอัตราส่วน
70:30 (กลุ่มควบคุม) โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกปรับปรุงด้วยผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดมีความเข้มข้นของโปรตีนรวม
จากสารปรับปรุงแตกต่างกัน 3 ค่า โครงเลี้ยงเซลล์ถูกเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนภายใต้สภาวะสูญญากาศ
(Dehydrothermal crosslink) จากการทดสอบลักษณะสมบัติทางกายภาพและทางกลพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติม
สารปรับปรุงมีขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วง 50-225 ไมโครเมตร ความเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ
โปรตีนรวมที่สูงขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์สามารถรับแรงกดทั้งในสภาวะเปียกและแห้งได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ
โปรตีนที่ใช้ปรับปรุงในขณะที่เปอร์เซ็นต์การยึดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง โครงเลี้ยงเซลล์สามารถรับแรงดึงได้แตก
ต่างกันขึ้นกับชนิดและปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนจากสารปรับปรุง ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ
ด้วยการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (Detroit 551) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงสามารถ
กระตุ้นการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่ากลุ่มควบคุม ผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้ในการ
เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนู (L929) บนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานและเจลาติน-ไคโตซาน และแผ่นใยโพลิโพร
พิลีนไม่สานทอ (non woven polypropylene fabric, PP fabric) ที่ถูกปรับปรุงด้วยสารละลายผสมระหว่างคอลลา
เจน-ไคโตซานและผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนแผ่น
ใยได้มากกว่าแผ่นใยที่เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซานเพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นในการทดลองปลูก
ถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานลงในหนูทดลองพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงสามารถเหนี่ยวนำ
ให้เซลล์ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน และสามารถสังเกตเห็นการ
เกิดใหม่ของเส้นเลือดและคอลลาเจนขึ้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมเกล็ดเลือดเข้มข้นที่มีความ
เข้มข้นของโปรตีนของสารปรับปรุงเป็น 10.04% โดยน้ำหนัก มีความเหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ย้ายที่เข้า
สู่โครงเลี้ยงเซลล์ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงถึงความเป็นไปได้อย่างยิ่งในการใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์เพื่อ
ปรับปรุงคุณภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออนิสิต.....
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา ..2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4870297421 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: COLLAGEN / CHITOSAN / CRYOPRECIPITATE / HUMAN PLASMA /
CONCENTRATED PLATELET / SCAFFOLD

DUANGRUDEE ARUNLERTRATSAMEE: MODIFICATION OF SCAFFOLDS BY HUMAN
CRYOPRECIPITATE, PLASMA AND CONCENTRATED PLATELET FOR SKIN TISSUE
ENGINEERING. THESIS ADVISOR: SORADA KANOKPANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR:
TANOM BUNAPRASERT, M.D., 140 pp.

New tissue formation needs growth factors to produce cell migration into the defect areas. Due to the cost of purified growth factors, we interest in using the proteins and cytokines present in cells and blood components. The aim of this study is using product derived from human blood component to modify tissue engineering scaffolds. Modified porous scaffolds were fabricated by freeze drying mixed solution of collagen/chitosan (70/30) with human cryoprecipitate, plasma or concentrated platelet followed by the crosslink process using dehydrothermal treatment (DHT). Series of scaffolds were prepared using these three human blood products at three different protein concentrations. The modified scaffolds had pore size in the range of 50-225 μm . With the increasing blood protein contents, the pore's interconnectivity and the scaffold's compressive modulus increased, however, their percent of elongation decreased. Their tensile strengths depend on types and concentrations of blood product, although swelling properties of modified scaffolds were not differ from control. Results from the in vitro culture of human dermal fibroblast cell line (Detroit 551) showed the scaffolds promoted cell initial attachment and proliferation. These effects were confirmed by other two in vitro tests, the L929 mouse fibroblast cultured on collagen/chitosan or gelatin/chitosan (70/30) scaffolds and on non-woven polypropylene fabrics (PP) coated with blending solutions of collagen/chitosan and human blood products. Results from the scaffolds implanted subcutaneously on wistar rats showed the scaffolds modified with concentrated platelet, contained 10.04% (wt/wt) protein from concentrated platelet, was most suitable for cell migration, neovascularization, and neocollagen production at the implanted sites. The results elucidated that human blood component products had high potential for applications in skin tissue engineering.

Department Chemical Engineering Student's signature.....
Field of study Chemical Engineering Advisor's signature.....
Academic year 2006 Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ดร.โสครดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, อ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม, รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ และ ดร.อุรษา รัชชตานนท์ชัย เป็นอย่างสูงสำหรับทำให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัยได้อย่างถูกต้อง

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. รัฐชาติ มงคลนาวิน ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องที่ดำพินซ์

ขอขอบคุณ บริษัทมิตรชุย ไฮยีน แมททีเรียลส์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่เอื้อเฟื้อแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ สภาอากาศไทยที่เอื้อเฟื้อผลิตภัณฑ์โครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น จากเลือดมนุษย์ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องวิจัย Peripheral nerve (อ.ป.ร.) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการย้อมสีชิ้นเนื้อ (H&E)

ขอขอบคุณ ทูสนับสนุนงานวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ขอขอบคุณ คุณจุฑามาศ รัตนาวารภรณ์ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านความรู้พื้นฐานของเซลล์และเทคนิคในการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ, คุณอิศราวุธ ประเสริฐสังข์ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทดลองในสัตว์ทดลอง และคุณเยาวภา สันติกุล ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน และขอบคุณมากๆ สำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการและวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี, ห้องปฏิบัติการและวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์, ห้องปฏิบัติการ iTissue Lab ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำและความช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 การรักษาบาดแผลที่ผิวหนัง.....	5
2.1.1 ระยะการรักษาบาดแผล.....	5
2.1.2 กฎของการปิดสนิทของบาดแผล.....	8
2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง.....	10
2.3 คอลลาเจน.....	12
2.4 เจลาติน.....	15
2.5 ไคโตซาน.....	19
2.6 Glycosaminoglycans.....	23
2.7 เส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ.....	25
2.8 ไฮโดรคายนและโกรสแฟคเตอร์.....	26
2.8.1 การใช้องค์ประกอบของเลือดเป็นโกรสแฟคเตอร์.....	27
2.8.2 พลาสมา (Plasma).....	30
2.8.3 เกล็ดเลือดเข้มข้น (Concentrated platelet).....	31
2.8.4 ไครโอปริซิพิเตท (Cryoprecipitate).....	32

2.9. การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ.....	34
2.9.1 ชนิดของการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	34
2.9.2 MTT assay for cell viability.....	34
2.10 การตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยการย้อมสี.....	34
2.10.1 เซลล์และองค์ประกอบของเซลล์.....	35
2.10.2 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน.....	35
2.10.3 การย้อมสีขึ้นเนื้อ.....	36
2.11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	36
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	45
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	45
3.2 วัตถุประสงค์ สารเคมี และอุปกรณ์ในการวิจัย.....	47
3.3 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	49
3.3.1 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์.....	49
3.3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	54
3.3.3 วิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	62
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	62
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	63
4.1 ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	63
4.1.1 ลักษณะทางกายภาพ.....	63
4.1.2 สมบัติในการบวมน้ำ.....	67
4.1.3 สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์.....	69
4.1.4 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ.....	72
4.2 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพภายในสัตว์ทดลอง.....	86
4.2.1 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ในหนูทดลองพันธุ์ Wistar rat.....	86
4.2.2 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ในหนูทดลองพันธุ์ Nude mice Bulb C/nu.....	107
5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	115
รายการอ้างอิง.....	118

ภาคผนวก.....	126
ภาคผนวก ก.....	127
ภาคผนวก ข.....	129
ภาคผนวก ค.....	130
ภาคผนวก ง.....	132
ภาคผนวก จ.....	138
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	140

สารบัญญัตราสาร

ตาราง	หน้า
2.1	ข้อมูลโดยประมาณของลักษณะบาดแผลระยะสุดท้ายของบาดแผลตามกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เอง..... 9
2.2	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อเยื่อผิวหนัง.....13
2.3	ตารางแสดงสมบัติของเจลาติน..... 17
2.4	แสดงองค์ประกอบในเจลาติน..... 18
2.5	แสดงลักษณะสมบัติเฉพาะของโพลีโพรพิลีน.....26
2.6	Cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผล..... 27
2.7	Centrifugation for Component Preparation.....31
3.1	แสดงสมบัติของผลิตภัณฑ์โครีโอพริซิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์จากสภากาชาดไทย.....50
3.2	แสดงความเข้มของโปรตีนทั้งหมดของโครีโอพริซิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน.....51
3.3	แสดงความเข้มของโปรตีนทั้งหมดของโครีโอพริซิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน..... 53
3.4	แสดงรหัสของแผ่นเส้นใยโพลีโพรพิลีนไม่สานทอที่เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน -โคโตซานที่ผสมผลิตภัณฑ์โครีโอพริซิเตท พลาสมาและเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์..... 54
4.1	แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง ความหนา และเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน, ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารปรับปรุงในโครงเลี้ยงเซลล์ และขนาดของรูพรุน.....64
4.2	แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง ความหนา และเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน, ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารปรับปรุงในโครงเลี้ยงเซลล์ และขนาดของรูพรุน.....77
4.3	แสดงระยะทางที่เซลล์เคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์จากขอบเข้าสู่ด้านในมีหน่วยเป็นไมโครเมตร..... 101
ก-1	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm จากสารละลายโปรตีน BSA ที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry..... 128

บทที่	หน้า
ค-1	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm จาก Mitochondrial activity (MTT) assay สำหรับกราฟมาตรฐานของเซลล์ L929.....130
ค-2	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm จาก Mitochondrial activity (MTT) assay สำหรับกราฟมาตรฐานของเซลล์ Detroit 551..... 131
ง-1	ตัวอย่างค่า Tensile stress-strain ของ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (CCH)..... 136

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1	แผนภาพแสดงระยะการหายของบาดแผล.....5
2.2	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การดึงยึด (Contraction).....10
2.3	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อเยื่อผิวหนัง.....11
2.4	โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจน..... 14
2.5	แสดงขั้นตอนการสกัดเจลาติน..... 16
2.6	แสดงโครงสร้างของเจลาติน..... 17
2.7	โครงสร้างโมเลกุลของไคโตซาน.....20
2.8	หน่วยซ้ำของ chondroitin-6-sulfate.....24
2.9	โครงสร้างโมเลกุลโพลีโพรพิลีนและแผ่นเส้นใยโพลีโพรพิลีนไม่สานทอ.....25
3.1	แสดงแผนการดำเนินการวิจัย..... 45
3.2	รูปหนูทดลองชนิด Wistar rat..... 47
3.3	แสดงแผนภาพตัวอย่างขนาดชิ้นงานที่ใช้ทดสอบความต้านทานต่อการดึง..... 56
3.4	แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง.....59
3.5	แผนภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง.....61
4.1	รูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้รับการปรับปรุงกลุ่มควบคุม (CCH) และโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ปรับปรุงด้วยไครโอโปรซีพีเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น..... 63
4.2	ภาพแสดงลักษณะและทิศทางการถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพของ โครงเลี้ยงเซลล์..... 65
4.3	รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-ไคโตซานที่ไม่มีการปรับปรุงและมีสารปรับปรุง.....66
4.4	เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน - ไคโตซาน และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่เติมสารปรับปรุง.....68
4.5	ค่าออกคู่สการกคของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคซาน..... 70
4.6	ค่าเปอร์เซ็นต์การยึดตัวจนถึงจุดขาดและความต้านทานต่อแรงดึง..... 71
4.7	Relative cell viability ของ Detroit 551 บนโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-ไคโตซานต่างๆที่เวลา 5 ชั่วโมง 3, 6 และ 9 วัน.....74

ภาพ	หน้า
4.8	รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน-โคโตซานที่ไม่ได้การปรับปรุงและได้รับการปรับปรุง.....77
4.9	Relative cell viability ของ L929 บนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน และ เจลาติน-โคโตซานในสารอาหารที่ไม่มีซีรัม.....79
4.10	รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะพื้นผิวแผ่นใย โพลีโพรพิลีนไม่สานทอที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมา และลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นใยโพลีโพรพิลีนไม่สานทอ..... 82
4.11	Relative cell viability ของ L929 ใน DMEM ที่มีซีรัม 10% บน PP, PP-t และ PP-t/CHCH ที่เวลาต่างๆ.....83
4.12	Relative cell viability ของ L929 บนแผ่นโพลีโพรพิลีนไม่สานทอ ที่กระตุ้นด้วยพลาสมาแล้วที่เคลือบด้วยสารละลายต่างๆ ในสารอาหารที่ไม่มีซีรัม.....85
4.13	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ 4 ชนิด (CCH, C1000, H500 และ P500) ที่ฝังในหนูพันธุ์วิสตาร์ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์.....87
4.14	แสดงภาพตำแหน่งการย้ายที่ของเซลล์เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ฝังในหนูทดลอง..... 89
4.15	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุม (CCH) ที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 1, 2 และ 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E.....93-94
4.16	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโปรตีนจาก C1000 ที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 1, 2 และ 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E.....95-96
4.17	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโปรตีนจาก H500 ที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 1, 2 และ 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E.....97-98
4.18	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโปรตีนจาก P500 ที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 1, 2 และ 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E.....99-100
4.19	ระยะทางที่เซลล์ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน(CCH), โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยโครโอปรีซิพิเตท (C1000), พลาสมา (H500) และเกล็ดเลือดเข้มข้น (P500) ที่ตำแหน่งต่างๆ หน่วยเป็นไมโครเมตร..... 102

ภาพ	หน้า
4.20	ภาพถ่ายบางส่วนของกลุ่มควบคุมที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า.....103
4.21	ภาพถ่ายบางส่วนของ C1000 ที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า.....104
4.22	ภาพถ่ายบางส่วนของ H500 ที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า..... 105
4.23	ภาพถ่ายบางส่วนของ P500 ที่ฝังในหนูพันธุ์ wistar ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า.....106
4.24	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ CCH, C1000 ที่ฝังในหนูพันธุ์ nude mice bulb C/nu ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์..... 108
4.25	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุม (CCH) ที่ฝังในหนูพันธุ์ nude mice bulb C/nu ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E..... 109-110
4.26	ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจาก C1000 ที่ฝังในหนูพันธุ์ nude mice bulb C/nu ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E..... 111-112
4.27	ภาพถ่ายบางส่วนของกลุ่มควบคุมที่ฝังในหนูพันธุ์ nude mice bulb C/nu ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า..... 113
4.28	ภาพถ่ายบางส่วนของ C1000 ที่ฝังในหนูพันธุ์ nude mice bulb C/nu ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า..... 114
ก-1	กราฟมาตรฐานแสดงปริมาณโปรตีน BSA ที่วัดจากวิธี Lowry..... 118
ค-1	กราฟมาตรฐานแสดงจำนวนเซลล์ L929 (mouse fibroblast)..... 130
ค-2	กราฟมาตรฐานแสดงจำนวนเซลล์ Detroit 551human dermal fibroblast..... 131
ง-1	กราฟแสดงระยะยึดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน (กลุ่มควบคุม)..... 132
ง-2	กราฟแสดงระยะยึดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน ที่ถูกปรับปรุง..... 133-135

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

งานวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) เป็นงานวิจัยเพื่อการพัฒนาการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนในผู้ป่วยที่มีการสูญเสียผิวหนังอย่างถาวรทั้งจากการเกิดบาดแผลหรือจากการสูญเสียอวัยวะ (Jones และคณะ, 2002) ประกอบด้วยการพัฒนาด้านวัสดุที่ใช้สำหรับเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นที่อยู่ในการให้เซลล์เจริญเติบโตแทนที่เซลล์ที่เสียหาย และการพัฒนาด้านเซลล์ที่จะต้องมีการแยกเซลล์ต้นแบบ การปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรมของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการพัฒนาเพื่อการพัฒนาเนื้อเยื่อทดแทนคือการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีประสิทธิภาพเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการพัฒนาจะต้องมีความเหมาะสมในหลายๆปัจจัยด้วยกัน เช่น อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradability) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ต้องสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ คุณสมบัติทางกล (Mechanical property) ความเข้ากันได้กับเซลล์ (Biocompatibility) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) (Bigi และคณะ, 2003; Rothamel และคณะ, 2005) สำหรับการพัฒนาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยเฉพาะเนื้อเยื่อผิวหนังในประเทศไทยยังไม่มีผลิตภัณฑ์ที่สามารถใช้กับผู้ป่วยวางจำหน่ายในท้องตลาด ทำให้ต้องมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูงจากต่างประเทศ เกิดผลกระทบต่อผู้ป่วยเองที่อาจต้องรอผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศมาใช้ในการรักษาซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการรักษาที่ต้องใช้เวลานานขึ้น และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงได้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องที่ต้องการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อเยื่อผิวหนังที่ผลิตขึ้นเองภายในประเทศให้สามารถใช้งานได้จริงและสามารถวางจำหน่ายในท้องตลาด อีกทั้งมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับสินค้าที่นำเข้าจากต่างประเทศอีกด้วย

โครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังแท้ตามธรรมชาติมีองค์ประกอบหลัก คือ คอลลาเจน, โปรทีโอไกลแคน (proteoglycan), ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และ โกรสแฟคเตอร์ (growth factor) (Stephan, 2004) คอลลาเจนเป็นสารโปรตีนธรรมชาติที่มีความเหมาะสมที่มีคุณสมบัติให้เซลล์ยึดเกาะเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต เปลี่ยนแปลงรูปร่างและเพิ่มจำนวนซึ่งเหมาะต่อการใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในการรักษาบาดแผลบริเวณผิวหนัง (Ruszczak, 2003) แต่อย่างไรก็ตามการใช้คอลลาเจนเป็นโครงเลี้ยงเซลล์มักจะพบว่าเมื่ออัตราการย่อยสลายเร็ว มีความแข็งแรงทางกลค่อนข้างต่ำ และมี

ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูงจึงมีการใช้สารเติมแต่งอื่นๆ ผสมในโครงสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ ตัวอย่างเช่น ไคโตซาน (poly 1,4 D-Glucosamine) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งได้มาจากกระบวนการ deacetylation ของไคตินที่พบมากในธรรมชาติสามารถนำมาทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการดูดซับทางชีววิทยา (bioabsorbable) และเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาบาดแผลที่ผิวหนังอีกด้วย (Suh และคณะ, 2000) อีกทั้งยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ เนื่องจากเชื้อให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ปล่อยสาร interleukin-8 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนเข้าสู่และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Wang และคณะ, 2003)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำข้อดีของทั้งคอลลาเจนและไคโตซานมาพัฒนาการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไคโตซานผสมกับคอลลาเจน เพื่อเพิ่มความแข็งแรงทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ และนำมาประยุกต์ใช้รักษาบาดแผลที่ผิวหนัง (Tangsadthakun และคณะ, 2006) และยังสามารถลดสัดส่วนการใช้คอลลาเจนที่มีราคาแพงด้วยการแทนที่คอลลาเจนด้วยไคโตซานที่มีราคาถูก และหาได้ง่ายกว่าในประเทศไทย นอกจากนี้ยังได้มีการนำเจลาตินซึ่งเป็นวัสดุที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และมีสมบัติหลายประการคล้ายคลึงกับคอลลาเจนมาใช้เป็นวัสดุหลักในการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ และใช้คอลลาเจนเป็นวัสดุเติมแต่งเพื่อส่งเสริมสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (จุฑามาศ รัตนวราภรณ์, 2548)

การเพิ่มความความสามารถในการดึงดูดให้เซลล์ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการผสมไคโตซานลงในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนแทนการใช้ GAG เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Tangsadthakun และคณะ, 2006) และมีการผสม GAG ที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรทีโอไกลแคน (proteoglycan) ลงในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนเพื่อลดอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของคอลลาเจน และเพิ่มการจับยึดโกรสแฟคเตอร์ให้ยึดติดกับโครงเลี้ยงเซลล์ (Shafritz และคณะ, 1994) และโกรสแฟคเตอร์ที่ถูกยึดอยู่กับโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติในการดึงดูดหรือเหนี่ยวนำให้เซลล์มีเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนรูปร่าง (differentiate) ดังที่พบได้จากการเติม TGF- β 1 ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน-GAG เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์คอนโดโรไซต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับไกลโคโปรตีนที่มีองค์ประกอบหลักเป็นไฟโบรเนคติน, ไฟบริลิน และลามินินซึ่งมีพันธะหลักเป็น RGD-peptide (arginine, glycine, aspartic acid) ที่เป็นตำแหน่งสำคัญในการเริ่มต้นการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์จนเกิดการยึดเกาะของเซลล์ เช่นเดียวกับในไฟบริโนเจนที่เป็นโปรตีนองค์ประกอบหลักที่พบในคริโอปริซิพิเตท (cryoprecipitate), พลาสมา (human plasma) และ เกล็ดเลือด

เข้มข้น (concentrated platelet) (Brecher, 2005) ที่มี RGD-peptide ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ได้และยังลดอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ (Ye และคณะ, 2000)

จากที่กล่าวมาแล้วในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อเยื่อผิวหนังทดแทน นอกจากจะมุ่งเน้นที่การสร้างโครงเลี้ยงเซลล์หรือ ECM แล้วยังจะต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการใช้ไซโตไคน์ (Cytokines) หรือโกรสแฟคเตอร์เพื่อเร่งให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าไปสู่โครงเลี้ยงเซลล์ แต่เนื่องจากปัญหาในการใช้โกรสแฟคเตอร์บริสุทธิ์ที่มีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงจะหลีกเลี่ยงปัญหาด้วยการใช้ซีรัมที่ได้จากผลิตภัณฑ์จากเลือดของมนุษย์ซึ่งโกรสแฟคเตอร์เป็นส่วนประกอบอยู่แล้ว โดยการเติมซีรัมจากเลือดของมนุษย์ 3 ชนิด คือ ไครโอปริซิพิเตท (cryoprecipitate), พลาสมา (plasma) และ เกล็ดเลือดเข้มข้น (concentrated platelet) ของมนุษย์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อเร่งและเหนี่ยวนำเซลล์ให้มีการย้ายที่เข้าไปสู่โครงเลี้ยงเซลล์และเพิ่มความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง

1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาต้นแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากคอลลาเจน-ไคโตซานและเจลาติน-ไคโตซานที่มีการเติมโปรตีนจากไครโอปริซิพิเตท หรือ พลาสมา หรือ เกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ในด้านการเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) การยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ในระยะยาว

1.3. ประโยชน์ที่ได้รับ

1. สามารถเตรียมผลิตภัณฑ์เนื้อเยื่อหนังต้นแบบที่มีระบบกระตุ้นการย้ายที่ของเซลล์เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์
2. เข้าใจถึงผลของไครโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น ที่มีต่อการย้ายที่ของเซลล์ การยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุง

1.4. ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 ขั้่นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำคอลลาเจน-ไคโตซาน และ เจลาติน-ไคโตซาน ที่มีอัตราส่วน 70: 30

1.4.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ในด้านต่างๆ ได้แก่

สมบัติทางกายภาพที่จะพิจารณาถึงขนาดและรูปร่างของรูพรุนรวมไปถึงลักษณะภายใน โครงเลี้ยงเซลล์ (Morphology) ด้วยการพิจารณาภาพที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด ส่องกราด (SEM)

สมบัติทางกล โดยการวัดค่ามอดูลัสการกด (Compressive modulus) และการวัดค่าแรง ดึง (Tensile strength)

1.4.3 ปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน และ เจลาติน-ไคโตซาน ด้วยการเติม ไครโอปริซิพิเตท พลาสมา หรือเกลือดีดเข้มข้นของมนุษย์ที่มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน แตกต่างกัน

1.4.4 ศึกษาผลของความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ ได้รับการปรับปรุงในระดับห้องปฏิบัติการด้วยการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ Detroit 551 human fibroblast ที่เวลา 5 ชั่วโมง และทำการทดสอบการเพิ่มจำนวนของที่เวลา 3, 6 และ 9 วัน

1.4.5 ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษาถึง ความสามารถในการย้ายที่ของเซลล์เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ (cells migration), ความสามารถในการ ย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) และ การต่อต้านทางภูมิคุ้มกัน (Immunological response) ที่ช่วงเวลา 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์

1.4.6 ประยุกต์ใช้สารละลายคอลลาเจน-ไคโตซานที่ผสมไครโอปริซิพิเตท พลาสมา หรือ เกลือดีดเข้มข้นของมนุษย์ซึ่งมีความเข้มข้นที่เหมาะสมมาใช้เคลือบแผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่ สานทอ (non woven polypropylene fabric) เพื่อศึกษาถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับ ห้องปฏิบัติการ

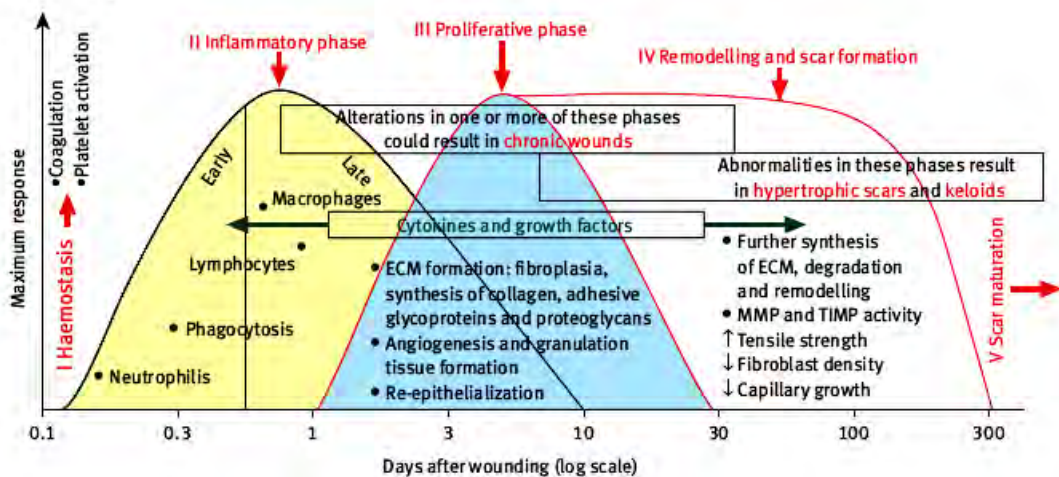
บทที่ 2

ทฤษฎีและตรวจเอกสาร

2.1 การรักษาบาดแผลที่ผิวหนัง (Skin wound healing)(Yannas, 2001)

2.1.1 ระยะเวลาการรักษาบาดแผล (Phase of wound healing) (Enoch และคณะ, 2005)

การรักษาบาดแผลเกิดขึ้นภายใต้ระบบที่มีความต่อเนื่องเป็นลำดับของกระบวนการที่ซ้อนเหลื่อมกัน (Overlapping process) โดยที่ความสมบูรณ์ของกระบวนการรักษาบาดแผลขึ้นอยู่กับกิจกรรมที่หลาทำลายของเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วย การกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis), การเคลื่อนเหตุสารเคมี (chemotaxis), ไมโตจีนีซิส (mitogenesis) และการสังเคราะห์องค์ประกอบของเอ็กตราเซลลูลาร์เมทริกซ์ (extracellular matrix) กระบวนการรักษาบาดแผลดังกล่าวจำแนกได้เป็น 5 ระยะที่ซ้อนเหลื่อมกันดังแสดงในรูปที่ 2.1 กระบวนการเหล่านี้ประกอบไปด้วย การเกิดลิ่มเลือด (Haemostatic), การอักเสบ (Inflammation), การเพิ่มจำนวน (Proliferation), การสร้างแบบจำลองและการเกิดแผลเป็น (Remodeling and scar formation) และการเกิดแผลเป็นระยะสุดท้าย (Scar maturation)



หมายเหตุ ECM: Extracellular matrix
 MMP: Metalloproteinases
 TIMP: Tissue inhibitors of metalloproteinases

รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงระยะการหายของบาดแผล

ที่มา (Enoch และ Leaper, 2005)

ระยะที่ 1: ระยะการห้ามเลือดหรือการเกิดลิ่มเลือด (Hemostasis or blood clot)

เมื่อเกิดบาดแผลที่มีเลือดออกกระบวนการรักษาบาดแผลขั้นแรกที่เกิดขึ้นคือ การเกิดลิ่มเลือดและการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดซึ่งเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่เกิดบาดแผล ลิ่มเลือดเกิดขึ้นจากการรวมตัวของ ไฟบริล, ไฟโบรเนคติน และ ฟอน วิลลิเบรนต์ ซึ่งทำให้เกิดการสร้างเมทริกซ์จำลอง (Provisional matrix) ซึ่งใช้สำหรับการย้ายที่ของเซลล์ (Cellular migration)

ภายในเกล็ดเลือดประกอบไปด้วยเม็ดเล็ก ๆ (Granule) ที่บรรจุโกรสแฟคเตอร์ (Growth factor) ชนิดต่างๆคือ PDGF (Platelet-derive growth factor), EGF (Epidermis growth factor), TGF- β (Transforming growth factor) โกรสแฟคเตอร์เหล่านี้เป็นโปรตีนที่นำไปสู่ลำดับขั้นการรักษาบาดแผลโดยการดึงยึดและการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์, เอนโดทีเลียลและแมคโครฟาจส์ ให้เข้ามาในบริเวณบาดแผล

ระยะที่ 2: ระยะการอักเสบ (Inflammatory phase)

การอักเสบของบาดแผลแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรกและระยะหลังขึ้นอยู่กับเวลาและช่วงเวลาของการตอบสนอง และชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยที่ในระยะเริ่มเกิดขึ้นหลังจากการเกิดลิ่มเลือดแล้ว

การอักเสบระยะแรก (Early inflammatory phase) เกิดขึ้นในช่วงเวลา 1-2 วันแรก เซลล์และอนุภาคแปลกปลอมถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จากเซลล์กลืนกิน (phagocyte) และอนุโมลอิสระจากออกซิเจน เซลล์เอนโดทีเลียลจากขอบของบาดแผลจะเคลื่อนย้ายและเพิ่มจำนวนมาตามชั้นผิวหนังแท้แล้วสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (basement membrane) ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง

การอักเสบระยะหลัง (Late inflammatory phase) เกิดขึ้นในวันที่ 2-3 เซลล์แมคโครฟาจส์ทำหน้าที่ผลิตโกรสแฟคเตอร์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน และการผลิตเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอนโดทีเลียลที่มีผลต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) ขึ้นในบริเวณที่จะซ่อมแซม

ระยะที่ 3: การเพิ่มจำนวน (Proliferative phase)

ระยะการเพิ่มจำนวนเริ่มต้นซ้อนเหลื่อมกับระยะการอักเสบในวันที่ใน 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 2-4 หลังจากเกิดบาดแผล ซึ่งถูกกำหนดโดยการย้ายที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์, การสร้างเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ และการเกิดเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (Granulation tissue) ซึ่งมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อ

และๆสีชมพูอ่อน กระบวนการที่สำคัญที่เกิดขึ้นในระยะการเพิ่มจำนวนคือการแทนที่เมทริกซ์จำลองที่สร้างจากไฟโบรเนคติน และไฟบริโนเจนในระยะการเกิดลิ่มเลือดด้วยเนื้อเยื่อแกรนูเลชันที่สร้างขึ้นใหม่ และการเกิดขึ้นหนังกำพร้า (Epithelialization) ซึ่งเป็นสภาวะสุดท้ายของระยะเพิ่มจำนวน

-การย้ายที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast migration)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ย้ายที่เข้ามาในบาดแผลในวันที่ 2-4 หลังจากเกิดบาดแผล ในขณะที่เซลล์เอนโดทีเลียลย้ายเข้ามาในบาดแผลในอีก 1 วันต่อมา โดยที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ย้ายเข้าสู่บาดแผลด้วยการเหนี่ยวนำของโกรสแฟคเตอร์คือ PDGF และ TGF- β

ภายในบาดแผลเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเพิ่มจำนวนและผลิตเมทริกซ์ใหม่ด้วยไฟโบรเนคติน และไฮยาลูโรแนน (Hyaluronan) ต่อมาจึงผลิตคอลลาเจนและโปรทีโอไกลแคน (Proteoglycan) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ทำหน้าที่เสริมสร้างเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ใหม่ที่จะช่วยสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ นอกจากนี้การเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์จะเป็นตัวช่วยในการควบคุมการสังเคราะห์เอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ และการสร้างแบบจำลองซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลัง

-การเกิดเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ (Formation of the extracellular matrix)

เอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์เป็นแหล่งให้เซลล์ยึดเกาะ และควบคุมการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ เอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ประกอบไปด้วยโปรตีนที่เป็นเส้นใย (คอลลาเจน และ อีลาสติน) และ อินเตอร์สติเชียลเมทริกซ์ (interstitial matrix) ซึ่งประกอบไปด้วยไกลโคโปรตีนที่เป็นตัวยึดเกาะซึ่งฝังตัวอยู่ในโปรทีโอไกลแคน และ ไกลโคสอะมิโนไกลแคน

-การเกิดเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (Formation of granulation tissue)

เนื้อเยื่อแกรนูเลชันถูกสร้างขึ้นในวันที่ 3-5 มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อๆสีชมพูอ่อน และเกิดแองจิโอเจเนซิสหรือการเกิดเส้นเลือดใหม่ ซึ่งเกิดจากปัจจัยเหนี่ยวนำของโกรสแฟคเตอร์หลายชนิด เช่น VEGF (Vascular endothelial growth factor), PDGF, TGF- β และ bFGF (basic Fibroblast growth factor)

-การเกิดขึ้นหนังกำพร้า (Epithelialization)

หลังจากการเกิดบาดแผลเซลล์หนังกำพร้าจะเคลื่อนย้ายจากขอบของบาดแผลเข้าสู่บาดแผลจนกระทั่งปกคลุมทั่วทั้งบาดแผล การเกิดขึ้นหนังกำพร้าต้องอาศัยความชื้นจากสิ่งแวดล้อม สารอาหารที่เพียงพอ และการควบคุมจากโกรสแฟคเตอร์หลายชนิดคือ KGF (Keratinocyte growth factor), EGF และ bFGF

ระยะที่ 4: การสร้างแบบจำลองและการเกิดแผลเป็น (Remodeling and scar formation)

การสังเคราะห์และการสร้างแบบจำลองของเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์เริ่มต้นพร้อมกับการพัฒนาเนื้อเยื่อแกรนูเลชันซึ่งซ้อนทับกับระยะการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (ระยะที่ 3) คอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จะถูกสังเคราะห์ และย่อยสลายอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเข้าสู่ภาวะคงตัวที่เวลาประมาณ 21 วัน หลังจากเกิดบาดแผล ในระยะนี้ขนาดของบาดแผลจะแคบลงเนื่องมาจากแรงดึงยึดของบาดแผลที่เกิดขึ้นเนื่องจากแรงอันตรกิริยาระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์โดยรอบ และอิทธิพลของปริมาณไซโตคัยนที่ประกอบด้วย PDGF, TGF- β และ bFGF

-การย่อยสลายของคอลลาเจน: เกิดจากผลของเอนไซม์ที่ปล่อยจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ แมคโครฟาจที่บริเวณบาดแผล

ระยะที่ 5: การเกิดแผลเป็นระยะสุดท้าย (Scar maturation)

ระยะสุดท้ายของการรักษาบาดแผลคือ การเกิดแผลเป็นซึ่งระยะนี้จะเกิดต่อเนื่องมาจากแผลเป็นที่เริ่มเกิดขึ้นในระยะที่ 4 (Remodeling and Scar formation) โดยที่แผลเป็นดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากกลุ่มของเส้นใยคอลลาเจนที่รวมกันจนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ขึ้นภายใน เอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์เกิดการเรียงตัวเป็นเส้นในแนวเดียวกัน (alignment) เนื่องมาจากแรงดึงยึดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ซึ่งเป็นผลให้เกิดแรงดึง (tensile strength) ในบาดแผลเพิ่มขึ้น

2.1.2 กฎของการปิดสนิทของบาดแผล (The Defect Closure Rule) (Yannas, 2001)

ในสภาวะสุดท้ายของกระบวนการรักษาบาดแผลคือการที่บาดแผลถูกปิดสนิท โดยที่ส่วนของชั้นหนังแท้ที่สูญเสียจะถูกทดแทนด้วยเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ใหม่ (Regeneration tissue) แผลเป็น (scar) การปิดสนิทของบาดแผลขึ้นอยู่กับตัวแปรหลักสามค่าคือเปอร์เซ็นต์การดึงยึด (contraction (%C)) เปอร์เซ็นต์การเกิดแผลเป็น (scar formation (%S)) และเปอร์เซ็นต์การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (regeneration (%R)) จากตัวแปรทั้งสามสามารถแสดงความสัมพันธ์ที่แสดงถึงประสิทธิภาพในกระบวนการรักษาบาดแผลดังแสดงได้ดังสมการที่ (1)

$$C+S+R = 100 \quad (1)$$

จากสมการที่ 1 แสดงว่าสภาวะสุดท้ายของกระบวนการรักษาบาดแผลจะแสดงผลของตัวแปรทั้งสามเป็นอย่างไรดังตัวอย่างได้ในตารางที่ 2.1

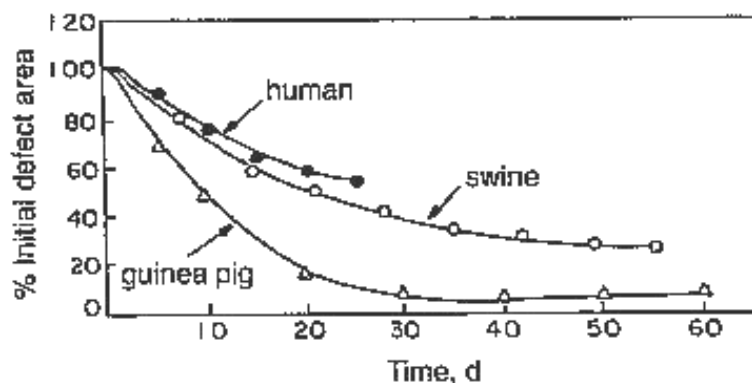
ตารางที่ 2.1. ข้อมูลโดยประมาณของลักษณะบาดแผลระยะสุดท้ายของบาดแผลตามกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เอง

Defect final state	Configuration of
General case of organ defect healing	[C, S, R]
Ideal fetal healing of dermis-free defect(complete regeneration model)	[0, 0, 100]
Spontaneous healing of dermis-free skin defect in several adult rodents and lagomorphs	[96, 4, 0]
Spontaneous healing of dermis-free skin in the adult human	[37, 63, 0]
Spontaneous healing of transected adult peripheral nerve(rat)	[96, 4, 0]
Spontaneous healing of stroma-free defect in adult conjunctiva(rabbit)	[45, 55, 0]

ที่มา (Yannas, 2001)

จากตารางที่ 2.1 ที่แสดงค่าของลักษณะบาดแผลระยะสุดท้าย (Configuration of final state) ของผิวหนังมนุษย์ที่มีค่า [37, 63, 0] ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการปิดของบาดแผลที่ผิวหนังมนุษย์โดยธรรมชาติเกิดจากการดึงยึด (C) 37% และเกิดจากการเกิดแผลเป็น (S) 63% โดยที่ไม่มีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ (R) 0% ดังนั้นการเกิดพังผืดบริเวณบาดแผลซึ่งทำให้เกิดการดึงยึด ซึ่งเกิดขึ้นในการรักษาบาดแผลปกติ โดยเฉพาะเมื่อบาดแผลมีขนาดใหญ่จะทำให้เกิดการผิดรูปหรือพังกั้นได้

ในการพิจารณาค่าของตัวแปรต่างๆจะอาศัยความสัมพันธ์ของตัวแปรนั้นๆ กับขนาดของบาดแผลที่ลดลงตามเวลา ดังเช่นเปอร์เซ็นต์การดึงยึดหาได้จากการวัดขนาดของบาดแผลที่ลดลงตามเวลาเทียบกับขนาดบาดแผลเริ่มต้นดังแสดงตัวอย่างความสัมพันธ์ได้รูปที่ 2.2 ค่าการเกิดแผลเป็นสามารถหาได้จากการวัดค่าดัชนีการเรียงตัว (Orientation Index) ของเส้นใยคอลลาเจนที่วิเคราะห์ได้จากภาพที่เกิดจากการใช้เลเซอร์ส่องผ่านชิ้นเนื้อเยื่อที่เป็นบาดแผล (laser light scattering) โดยที่แสงเลเซอร์จะส่องผ่านชิ้นงานที่ตัดออกมาจากเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองทำให้เกิดเงาตกกระทบบนฉาก (photographic plane) ด้านหลัง ซึ่งภาพที่ปรากฏบนฉากจะถูกวิเคราะห์ด้วยค่ามุมกระเจิงแสง (scattering angle: θ) และค่ามุมการหมุน (rotation angle: β) ซึ่งใช้ในการคำนวณค่าดัชนีการเรียงตัว นอกจากนี้ยังสามารถวัดค่าการรักษาของบาดแผลด้วยการวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยคอลลาเจนโดยการใช้อัลตร้าสตรัคเจอร์



รูปที่ 2.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การดึงยึด (Contraction) ในคน หมู และ หนูตะเภาที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา

ที่มา (Yannas, 2001)

2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง (Tissue Engineering of Skin) (William, 1998; Atiyeh, 2005)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อหมายถึง การประยุกต์ใช้หลักการและวิธีการทางวิศวกรรมและวิทยาศาสตร์รวมไปถึงการพัฒนาด้านชีววิทยาในการซ่อมแซมรักษา และปรับปรุงหน้าที่ของเนื้อเยื่อ วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกเพื่อรักษาและทดแทนบาดแผลที่เกิดจากไฟไหม้แล้วจึงมีการพัฒนาต่อมาเพื่อใช้ทดแทนบาดแผลที่เกิดจากการสูญเสียผิวหนังชั้นหนังแท้ (Dermis) เป็นลำดับ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังมีหลักพื้นฐานเหมือนกันคือการสร้าง Dermal Regeneration Template (DRT) หรือโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังชั้นหนังแท้ที่ไม่สามารถงอกกลับขึ้นมาได้เอง ซึ่งหลักการสร้าง DRT อยู่ที่การเลียนแบบผิวหนังตามธรรมชาติเพื่อเร่งให้เซลล์มีการเกาะ การเคลื่อนที่ การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้กลายเป็นผิวหนังที่สมบูรณ์ และลดปัญหาการเกิดแผลเป็น โดยที่ DRT อาจผลิตได้จากวัสดุธรรมชาติที่มีความเข้ากันได้กับเซลล์อย่างเช่นคอลลาเจน หรืออาจผลิตได้จากผิวหนังคนหรือสัตว์ที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง 1.หนังเทียมแบบโครงเลี้ยงเซลล์ตามธรรมชาติ หรือ Dermal Regeneration Template (DRT) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคล้ายกับ Extracellular matrix (ECM) ของเซลล์ผิวหนังแท้ตามธรรมชาติ ได้แก่ คอลลาเจน และ glycosaminoglycan (GAG) ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่มีวางจำหน่ายแล้วในประเทศอเมริกาคือ Biobrane และ Integra ผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะเหมือนกันที่การใช้งานสำหรับปิดรักษาบาดแผลที่เกิดจากไฟไหม้ และมีองค์ประกอบหลักเป็นคอลลาเจนที่มีแผ่นซิลิโคนเป็นแผ่นปิด

ด้านบน แต่ผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันที่ Biobrane มี Nylon Mesh เป็นส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรง ส่วน Integra จะมี GAG ผสมอยู่ในเนื้อคอลลาเจน 2.หนังเทียมแบบ DRT ที่มีการเพาะเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ลงไปเพื่อกระตุ้นให้มี การเคลื่อนที่ของเซลล์ผู้ช่วยเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้มีผลต้อออกจำหน่ายด้วยกันหลายชนิดเช่น Transcyte ที่ประกอบไปด้วย Silicone, Nylon Mesh, คอลลาเจน และ เซลล์ไฟโบรบลาสโดยทำการเพาะเซลล์ไฟโบรบลาสซึ่งเป็นเซลล์ในชั้นหนังแท้ในชั้นคอลลาเจน ซึ่งใช้สำหรับบาดแผลลึกที่เกิดจากไฟไหม้ ส่วน Apligraf เป็นหนังเทียมอีกชนิดหนึ่งที่ประกอบไปด้วยคอลลาเจนและเซลล์ โดยที่ จะมีทั้งเซลล์ fibroblast ที่เป็นเซลล์ในชั้นหนังแท้ และ เซลล์เคราทีโนไซต์ (keratinocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ในชั้นหนังกำพร้า นอกจากนี้ยังมีหนังเทียมที่ไม่ได้ทำจากคอลลาเจนแต่มีองค์ประกอบหลักเป็น polyglycolic acid (Dexon™) หรือ polyglactin-910 (Vicryl™) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ fibroblast ในชั้น polyglycolic acid หรือ polyglactin-910 นั่นคือ Dermagraft และ 3. ผิวหนังทดแทนที่ใช้ผิวหนังหรือเซลล์ของมนุษย์หรือสัตว์อื่นแทนผิวหนังเดิม ได้แก่ Alloderm (รูปที่ 2.3) และ Surederm ที่นำเอาชั้นผิวหนังมนุษย์ (allograft) มาและทำการกำจัดเซลล์ออก



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อเยื่อผิวหนังยี่ห้อ Alloderm (ก) และ Apligraf (ข)

ที่มา <http://www.biohorizons.com/alloderm.htm>

<http://www.drugs.com/PDR/Apligraf.html>

ลักษณะที่สำคัญในการออกแบบผลิตภัณฑ์วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังต้องคำนึงถึงคุณสมบัติต่างๆคือ คุณสมบัติทางชีวภาพที่เหมาะสมกับการเกาะติดและเพิ่มจำนวนของเซลล์ คุณสมบัติทางกล ขนาดของรูพรุน (pore size) โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้งานควรมีความสามารถในการชักนำให้เกิดการเกาะยึดของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ และการเพิ่ม

จำนวนเซลล์ ด้วยการใช้วัสดุที่นำมาทำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีหมู่ของ RGD ซึ่งจะสามารถชักนำการยึดเกาะของเซลล์ โดย RGD จะแสดงในรูปของ integrin receptor ในการชักนำการยึดเกาะของเซลล์ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง integrin receptor กับเซลล์นี้จะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของเซลล์ (Lee และคณะ, 2003) ส่วนขนาดรูพรุนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จะมีขนาดประมาณ 100-200 ไมโครเมตร (Freyman และคณะ, 2001; O'brein และคณะ, 2005) นอกจากนั้นอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ควรเหมาะสมต่ออัตราการเกิดของเนื้อเยื่อใหม่ โครงเลี้ยงเซลล์ควรจะย่อยสลายไปมากกว่า 50% โดยน้ำหนัก (half life) ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ (Shafritz และคณะ, 1994)

2.3 คอลลาเจน (Collagen)

คอลลาเจน (Stephen, 2004) คือโกลโคโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบมากที่สุด ใน Extracellular matrix ที่พบในธรรมชาติโดยที่คอลลาเจนมีลักษณะที่แตกต่างกันกว่า 20 ชนิด ขึ้นอยู่กับความหลากหลายขององค์ประกอบภายในหน่วยย่อยของโซ่แอลฟา (alpha chain) ชนิดของคอลลาเจนสามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะของโมเลกุลคือ คอลลาเจนที่มีการรวมตัวเป็นเส้นใย เช่น คอลลาเจนชนิด I, II, III, V และ VI และ คอลลาเจนที่ไม่มีการรวมตัวเป็นเส้นใย ซึ่งสามารถแบ่งเป็นชนิดย่อยๆตามลักษณะการเรียงตัวได้เป็นคอลลาเจนที่รวมตัวเป็นร่างแหที่เป็น basement membrane collagens เช่น คอลลาเจนชนิด IV, VIII และ X และ คอลลาเจนกลุ่มสุดท้ายเป็นคอลลาเจนที่มีการแทรกตัวอยู่กับคอลลาเจนที่เป็น triple helix (fibril-associated collagen with interrupted triple helix) ตัวอย่างเช่น คอลลาเจนชนิด IX, XII, XIV และ XIX ตามที่แสดงในตารางที่ 2.2 คอลลาเจนในแต่ละกลุ่มจะมีหน่วยซ้ำที่เหมือนกันคือ Gly-X-Y ซึ่ง X แทน proline และ Y แทน 4-hydroxyproline โมเลกุลของคอลลาเจนประกอบไปด้วย polypeptide α -chain 3 เส้น ซึ่ง α -chain ทั้ง 3 เส้นพันรวมกันทำให้คอลลาเจนมีโครงสร้างเป็นแบบ triple helix แสดงดังรูปที่ 2.4 (Friess และคณะ 1998)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อเยื่อผิวหนัง

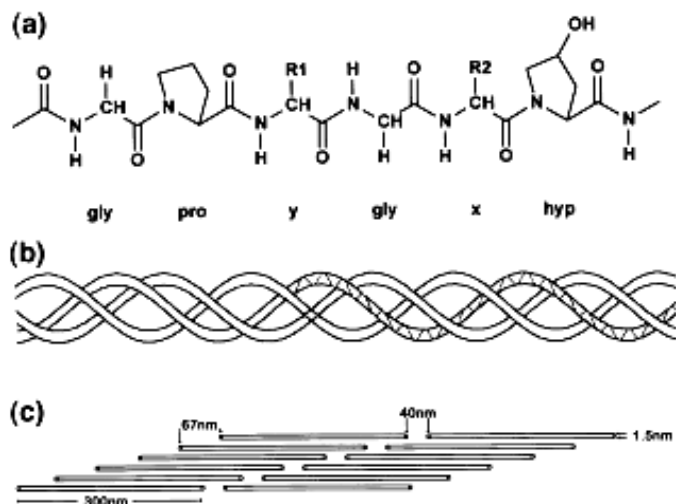
Table showing the various collagen types as they belong to the major collagen families

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

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

ที่มา (Gelse และคณะ, 2003)

คอลลาเจนชนิด I คือ โกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตน้อยกว่า 1% โดยที่โมเลกุลของน้ำตาลจะถูกยึดไว้ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ลักษณะพิเศษทางสรีระวิทยาและลักษณะเฉพาะของวัสดุชีวภาพของคอลลาเจนเกิดจากอนุพันธ์ที่ซับซ้อนของโมเลกุลคอลลาเจน ความหลากหลายของระดับของอันดับโมเลกุลที่จัดเรียงตัวในสายโซ่พอลิเมอร์แสดงได้ดังรูปที่ 2.4 สายโซ่แอลฟาจะรวมตัวกันกลายเป็นเกลียวซึ่งสามารถจำแนกด้วยการวิเคราะห์ด้วย X-ray (รูปที่ 2.4b)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจน ชนิด I. (a) โครงสร้างปฐมภูมิของกรดอะมิโน (b) โครงสร้างทุติยภูมิของเกลียวด้านซ้ายมือและโครงสร้างตติยภูมิของเกลียวด้านขวามือ และ (c) โครงสร้างจตุยภูมิ (Friess และคณะ, 1998)

โครงสร้างตติยภูมิของคอลลาเจน ประกอบด้วยสายโซ่โพลีเปปไทด์ 3 เส้นพันกันเป็นเกลียวจากทางขวา นอกจากนี้ภายในสายโซ่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีด้านปลายสุดเป็นหมู่คาร์บอกซิลที่ไม่รวมตัวเป็นเกลียว ส่วนที่ไม่เป็นเกลียวถูกเรียกว่าเทโรเปปไทด์ (telopeptide)

บทบาทสำคัญของคอลลาเจนที่ใช้สร้างโครงเลี้ยงเซลล์ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ได้มีผู้ทำการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งในด้านลักษณะสมบัติ ความคงตัว ความสามารถในการเป็นโครงให้เซลล์ยึดเกาะเป็นต้น ดังเช่นในปีค.ศ. 2003 Lie Ma และคณะได้ทำการศึกษาการเพิ่มความคงตัวของโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนคอลลาเจนโดยเปรียบเทียบการใช้กรดอะมิโน 3 ชนิด (ไกลซีน, กรดกลูตามิก, ไลซีน) เป็นสะพานเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนชนิด I ซึ่งใช้การเชื่อมโยงพันธะทางเคมีด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ผลจากการศึกษาความคงตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการวัดอัตราการย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสมไลซีนและเชื่อมพันธะด้วย EDAC/NHS (Lys/EDAC) จะมีอัตราการย่อยสลายต่ำที่สุดที่ 9.1% ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี คอลลาเจน (Col/EDAC) และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสมไกลซีน (Gly/EDAC) และเชื่อมพันธะด้วย EDAC/NHS จะมีอัตราการย่อยสลายที่ 23% และ 18% ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่กรดกลูตามิกและเชื่อมพันธะด้วย EDAC/NHS (Glu/EDAC) จะมีอัตราการย่อยสลายสูงถึง 77.1% ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนเพียงอย่างเดียวที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ (UCL:un-crosslinked scaffold) และเมื่อศึกษาขนาดของรูพรุนพบว่าโครงเลี้ยง

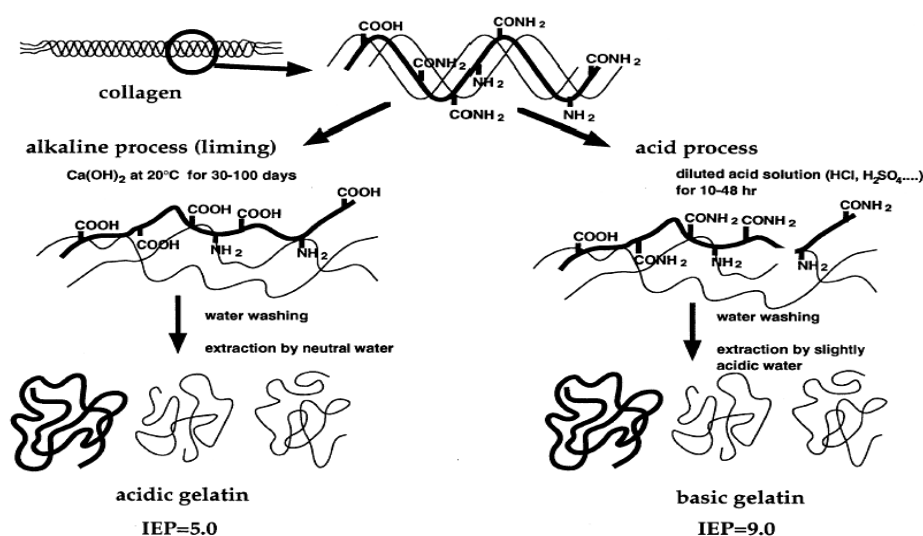
เซลล์ UCL, EDAC, Gly/EDAC, Lys/EDAC และ Glu/EDAC มีขนาด $99\pm 19, 106\pm 17, 101\pm 17, 107\pm 16$ และ 126 ± 18 ไมโครเมตร ตามลำดับ

ในปีค.ศ. 2005 O'Brien และคณะได้ทำการศึกษาผลกระทบของขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ collagen-glycosaminoglycan (CG) เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการยึดและการเติบโตของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ และโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ CG ที่มีขนาดรูพรุนต่างกัน 4 ขนาดโดยการขึ้นรูปด้วยเทคนิค lyophilization สารละลาย CG ถูกเตรียมจากการผสมคอลลาเจนชนิด I (0.5%(w/w)) ที่เตรียมจากเส้นเอ็นของวัวกับ chondroitin-6-sulphate(0.05%(w/w)) ที่ได้จากกระดูกอ่อนของฉลามที่ละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 3.2) โดยจะผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนต่างกัน 4 ขนาดด้วยการนำสารละลาย CG ไปแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากันแต่ต่างกันที่อุณหภูมิแข็งตัวสุดท้าย (final freezing temperature :Tf) คือ $-10^{\circ}\text{C}, -20^{\circ}\text{C}, -30^{\circ}\text{C}$ และ -40°C โครงเลี้ยงเซลล์ถูกเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิที่ 105°C ภายใต้ความดัน 50 mTorr เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิแข็งตัวสุดท้ายเป็น $-40^{\circ}\text{C}, -30^{\circ}\text{C}, -20^{\circ}\text{C}$ และ -10°C จะมีขนาดรูพรุน 95.5, 109.5, 121.0 และ 150.5 ไมโครเมตรตามลำดับ สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Tf $-40^{\circ}\text{C}, -30^{\circ}\text{C}, -20^{\circ}\text{C}$ จะมีขนาดรูพรุนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างขนาดรูพรุนเฉลี่ยในแนวขวางและแนวนอน ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Tf -10°C จะมีขนาดรูพรุนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยจะมีขนาดในแนวขวาง (130.4 ± 20.6 ไมโครเมตร) และแนวนอน (163.9 ± 31.6 ไมโครเมตร) เนื่องจากอิทธิพลของทิศทางของการถ่ายเทอุณหภูมิ ขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีผลอย่างมากต่อการยึดติดของเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนเล็กที่สุด (Tf= -40°C) พบว่ามีปริมาณเซลล์เหลืออยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ 40% ที่เวลา 24 และ 48 ชม. ในขณะที่เหลือปริมาณเซลล์อยู่เพียง 20% ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนใหญ่ที่สุด (Tf= -10°C) สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี Tf -20°C และ -30°C นั้นจะมีจำนวนที่ยึดติดไม่แตกต่างกันอยู่ที่ 30% ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

2.4 เจลาติน (gelatin)

เจลาติน คือโปรตีนที่ไม่ได้เกิดขึ้นในธรรมชาติแต่สกัดได้มาจากคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อ, ผิวหนัง และ กระดูกของมนุษย์และสัตว์ ขั้นตอนในการผลิตเจลาตินเริ่มจากการสกัดเจลาตินจากคอลลาเจนด้วยกระบวนการ acidic หรือ alkaline process แล้วจึงผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (Purification), เพิ่มความเข้มข้นและการทำให้แห้ง

ผลิตภัณฑ์เจลาตินที่ได้จากกระบวนการที่แตกต่างกันแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ Basic gelatin หรือ เจลาตินชนิด A ซึ่งได้จาก alkaline process และ Acidic gelatin หรือ เจลาตินชนิด B ซึ่งได้จาก acidic process ดังแสดงได้ในรูปที่ 2.5 โดยทั่วไปเจลาติน จะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ (Young, S. และคณะ, 2005) และมีลักษณะที่ดีในการควบคุมการส่งผ่าน (Tabata, 1999)



รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin ที่มา (Tabata, 1998)

เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ (Tabata, 1998)

-Basic gelatin (Type A gelatin): ได้มาจาก acid process สกัดได้ยากกว่าแบบ alkaline process และเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจนมีน้อยจึงทำให้เจลาตินมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนและเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

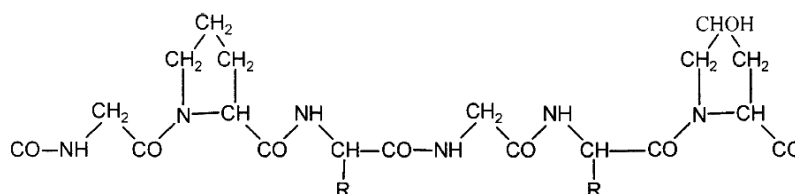
-Acidic gelatin (Type B gelatin): ได้มาจาก alkaline process เป็นขบวนการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลปริมาณมากทำให้เจลาตินมีประจุลบ และมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส

สมบัติของเจลาติน Type A และ B สรุปดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ตารางแสดงสมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B

Property	Type A	Type B
pH	3.8 - 5.5	5.0 - 7.5
Isoelectric point (pI)	7.0 - 9.0	4.7 - 5.4
Gel strength (bloom)	50 -300	50 - 300
Viscosity (cp)	15 -75	20 - 75
Ash (%)	0.3 -2.0	0.5 - 2.0

ลักษณะเฉพาะของเจลาตินคือ สารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่มีปริมาณสูง เช่น glycine, proline และ hydroxyproline ซึ่งโครงสร้างของเจลาตินประกอบไปด้วยหน่วยซ้ำของกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันคือ glycine-X-Y ซึ่ง X และ Y คือ proline และ hydroxyproline ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2.6



R = glycine-X-Y triplet

X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของเจลาติน

ที่มา (Lee, 2005)

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด และมีปริมาณของกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ที่มาก เช่นเดียวกับคอลลาเจน และเนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโน methionine, tyrosine และ cystine ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophilic จึงทำให้ เจลาตินละลายน้ำได้ดี (Neuman, 1949) ซึ่งสามารถสรุปปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ใน เจลาตินดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงองค์ประกอบในเจลาติน

กรดอะมิโน	% กรดอะมิโนในเจลาติน
Alanine	8.9%
Arginine	7.8%
Asperic acid	6.0%
Glutamic acid	10.0%
Glycine	21.4%
Histidine	0.8%
Hydoxylysine	1.0%
Hydroxyproline	11.9%
Isoleucine	1.5%
Leucine	3.3%
Lycine	3.5%
Methionine	0.7%
Phenylanine	2.4%
Proline	12.4%
Serine	3.6%
Theronine	2.1%
Tyrosine	0.5%
Valine	2.2%
Total	100%

ความสำคัญของเจลาตินถูกใช้เป็นอย่างมากในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่พบได้จากงานวิจัยของ Tabata ในปี 1999 ที่ศึกษาการใช้เจลาตินเป็นวัสดุทดแทนผิวหนังที่มีสมบัติในการควบคุมการส่งผ่าน (control release) โกรสแฟคเตอร์ bFGF (basic fibroblast growth factor) โดยในการทดลองทำการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจลจากเจลาตินแล้วเชื่อมโยงพันธะด้วยกลูตาแรลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆกันภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากนั้นจึงนำแผ่นไฮโดรเจลที่ได้แช่ในสารละลายไกลซีน (glycine) เพื่อกำจัดหมู่แอลดีไฮด์ออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง จากนั้นทำการเติม bFGF

จากผลการทดลองใช้ไฮโดรเจลในการควบคุมการส่งผ่าน bFGF (basic fibroblast growth factor) พบว่า bFGF ที่อยู่ใน basic gelatin จะถูกส่งผ่านได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่ bFGF ที่อยู่ใน acidic gelatin จะถูกส่งผ่านได้น้อย และไฮโดรเจลที่มีค่าการดูดซับน้ำสูงกว่า จะสลายตัวได้เร็วกว่าไฮโดรเจลที่มีค่าการดูดซับน้ำที่ต่ำกว่า ซึ่งแสดงถึงผลการใช้เจลาตินในการควบคุมการส่งผ่านโกรสแฟคเตอร์ในโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

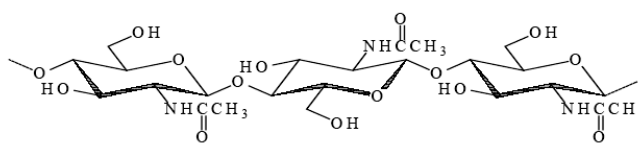
ในงานวิจัยของ Kang และคณะในปี 1999 ที่ศึกษาวิธีการเตรียมวัสดุรูพรุน โดยการเตรียมไฮโดรเจลที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจากเจลาตินที่มีการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลายกลูตาาราลดีไฮด์ หลังจากการล้างไฮโดรเจลด้วยไกลซีนและน้ำแล้วจึงนำไปไฮโดรเจลไปแช่แข็งเพื่อการทำแห้งที่จุดเยือกแข็งต่อไป โดยที่ทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการแช่แข็ง 3 อุณหภูมิ คือ -20°C , -80°C และ ไนโตรเจนเหลว โครงสร้างของรูพรุนที่ได้จากการทำแห้งมีลักษณะแตกต่างกันตามอุณหภูมิแช่แข็ง โดยที่แผ่นไฮโดรเจลที่ถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว จะมีโครงสร้างที่เป็น 2 มิติ (two-dimension) ในขณะที่แผ่นไฮโดรเจลที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะมีโครงสร้างเป็น 3 มิติ รูพรุนจะมีความต่อเนื่องกันมากขึ้น โดยมีขนาดรูพรุนประมาณ 250 ไมโครเมตร ซึ่งเมื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แผ่นจะมีโครงสร้างเป็น 2 มิติและมีขนาดรูพรุนประมาณ 85 ไมโครเมตร

2.5 ไคโตซาน (Chitosan)

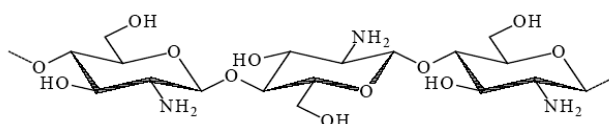
ไคติน เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติมีชื่อทางเคมีว่า Poly [β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose] โดยพบเป็นองค์ประกอบของเปลือกแข็งที่หุ้มเซลล์ของรา ยีสต์ และจุลินทรีย์หลายชนิด หรือพบเป็นโครงสร้างแข็งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำพวกแมลง กุ้ง ปู ปลาหมึก เป็นต้น ไคตินมีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ไคตินประกอบขึ้นจากน้ำตาลหน่วยย่อย คือ N-acetyl-D- glucosamine มาเรียงต่อกันเป็นสาย ละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ แต่ไม่ละลายในด่างเจือจาง

ไคโตซานคืออนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่อะซิติดลของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine (เรียกว่า deacetylation คือ เปลี่ยนน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine เป็น glucosamine) ออกตั้งแต่ 50 % ขึ้นไป มีชื่อทางเคมีว่า poly [β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2- deoxy-D-glucopyranose] และไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทั้งหมดและน้ำที่มีค่า pH เป็นกลางหรือด่าง แต่สามารถละลายในกรดอ่อน ไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของ น้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine อยู่ในสายพอลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับการกำจัดหมู่อะซิติดล (หรือเปอร์เซ็นต์การ

เกิด deacetylation) มีผลต่อสมบัติและการทำงานของไคโตซาน นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายไคโตซานซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีสายยาวและสารละลายมีความหนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเป็นต้น ดังนั้นการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์จะต้องพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation และน้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างของไคตินและไคโตซานแสดงดังนี้



โครงสร้างของไคติน



โครงสร้างไคโตซาน

รูปที่ 2.7 โครงสร้างโมเลกุลของไคโตซาน

ไคติน/ไคโตซานนั้นเป็นวัสดุเชิงประกอบที่มีความเหนียวฉีกขาดยาก และสามารถรับแรงได้สูงและไม่เปลี่ยนรูปร่างได้ง่าย ๆ ถ้าหากพิจารณาในเชิงโครงสร้าง ไคตินจะจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างผลึกเหลวแบบคลอสเทอริก (cholesteric liquid crystal structure) โดยมีโปรตีนและแคลเซียมคาร์บอเนตแทรกทำให้วัสดุนี้ทนแรงได้ทุกทิศทาง ไคติน/ไคโตซานมีความเป็นวัสดุพิเศษคือ วัสดุสามารถทำหน้าที่ทางเคมีหรือทางชีวภาพบางอย่างได้ด้วยตัวเอง (functional materials) ตัวอย่างเช่น เป็นแผ่นโพลาร์เมมเบรน (polar membrane) ซึ่งสามารถใช้ในการแยกแอลกอฮอล์(เจือจาง)โดยกระบวนการเพอร์วาพอเรชัน (pervaporation) เป็นต้น

สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคติน-ไคโตซาน (ภาวดี เมธะคานนท์, 2545)

การละลาย (Solubility)

ไคตินไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ด่างเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) เข้มข้น กรดซัลฟูริก (กรด

กำมะถัน) เข้มข้น กรดฟอสฟอริก (78-97%) กรดฟอร์มิก (anhydrous formic acid) และ DMAc-LiCl (*N, N*-Dimethylacetamide Lithium chloride) ความยากในการละลายของไคตินในตัวทำละลายต่างๆ เป็นผลมาจากสายโซ่โมเลกุลที่อยู่กันอย่างหนาแน่นมีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกัน (หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อะซีตามิโด)

ไคโตซานไม่ละลายน้ำ ต่างและตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มี pH น้อยกว่า 6 กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิกเป็นกรดที่นิยมใช้ในการละลายไคโตซาน กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก สามารถละลายไคโตซานได้เช่นกันแต่ภายใต้การคนที่อุณหภูมิสูงปานกลาง อย่างไรก็ตามในบางครั้งอาจมีตะกอนขาวคล้ายฝุ่นเกิดขึ้น

สารละลายไคโตซานมีความเหนียว ใส มีพฤติกรรมแบบนอน-นิวโตเนียน (non-newtonian) ในสารละลาย หมู่อะมิโนของไคโตซานจะแตกตัว โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pK_a) ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุพอลิเมอร์โดย pK_a ของไคโตซานมีค่าอยู่ในช่วง 6.2 – 6.8

น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

ไคตินในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากกว่า 1×10^5 ในขณะที่ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง กว่า 1×10^5 ถึง 1×10^6 ขึ้นอยู่กับขั้นตอนในการผลิต

Degree of Deacetylation

เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นไคติน-ไคโตซาน เนื่องจากไคติน-ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ระหว่างสองโมโนเมอร์ *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่ร่วมกันของมอนอเมอร์แรกมากกว่า คือมีค่า degree of deacetylation ต่ำ จะแสดงสมบัติเด่นของไคติน แต่ถ้าสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สองมากกว่า คือมีค่า degree of deacetylation สูงจะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซาน

ความหนืด (Viscosity)

ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น degree of deacetylation น้ำหนักความหนืดโมเลกุล ความเข้มข้น ionic strength ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่

ชนิดของกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายพอลิเมอร์จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เช่นความหนืดของไคโตซานในกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่า pH ลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริกจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ของสารละลายเพิ่มขึ้น

ความสามารถในการตกตะกอน (Coagulating ability)

ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอน (flocculant and coagulating agent) ที่ดี เนื่องจากการมีหมู่อะมิโนจำนวนมากที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวก และจับกับสารที่มีประจุลบได้ เช่น โปรตีน สีย้อม และพอลิเมอร์อื่น จากการวิจัยประสิทธิภาพของไคโตซานในการแยกโปรตีนออกจากหางนม พบว่าความสามารถในการจับโปรตีนเป็นสัดส่วนผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานนอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถจับกับโลหะหนักได้ โดยไนโตรเจนในหมู่อะมิโนของไคโตซานจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้ไอออนของโลหะสามารถสร้างพันธะเชิงซ้อน (coordinate) กับหมู่อะมิโนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่อะมิโนไคโตซานมีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่อะซิติกในไคติน ดังนั้นไคโตซานที่มี degree of deacetylation สูงจะมีอัตราการดูดซับหรือความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะสูง ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะของไคโตซานยังขึ้นอยู่กับอีกหลายปัจจัย เช่น ความเป็นผลึก และความสามารถในการดึงดูน้ำของไคโตซาน

การประยุกต์ใช้ไคโตซานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ได้มีการนำไคโตซานมาทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (Zhang, 2001) เพื่อใช้เป็นวัสดุปิดแผลซึ่งอาจเป็นได้ทั้งในรูปของแผ่นเยื่อบาง (membrane) แผ่นคล้ายฟองน้ำ (sponge) หรือผสมร่วมกับผ้าฝ้าย หรือใช้เป็นผงละเอียด โดยจะมีผลกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ และป้องกันการติดเชื้อ จึงช่วยทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้น (Mi และคณะ, 2001) เป็นต้น

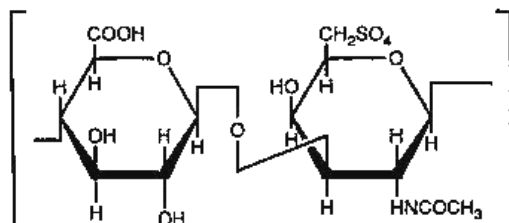
จากงานวิจัยของ Tangsadthakun และคณะ ในปี 2006 ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของมวลโมเลกุลของไคโตซานต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนและไคโตซาน ด้วยการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยความเย็นแล้วเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อน (Dehydrothermal crosslinking) ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนของคอลลาเจน/ไคโตซาน 5 อัตราส่วนคือ 100/0; 90/10; 70/30; 50/50; 30/70; 10/90 และ 0/100 และทำการเปลี่ยนค่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (M_w : weight-averaged molecular weight) 4 ค่าคือ XLMW (49 kDa), LMW (180 kDa), MMW (460 kDa), HMW (1,450 kDa) จากการทดสอบพบว่าในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไคโตซานมวลโมเลกุลสูง (HMW) ที่มี

อัตราส่วนของโคโตซาน 30 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าโมดูลัสเพิ่มขึ้น และมีประสิทธิภาพมากในการนำไปทดสอบการเกาะเลี้ยงเซลล์ (cell adhesion and proliferation) ด้วยเซลล์ผิวหนังของหนูและมนุษย์ โดยทำการทดสอบด้วยการจำลองสภาวะของสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ด้วยจำนวนเซลล์ 20,000 เซลล์ต่อหนึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่ารูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน/โคโตซานอยู่ในช่วง 100-200 μm

งานวิจัยของ Mao และคณะในปี 2003 ได้ศึกษาถึงการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน ด้วยการใช้เทคนิคการทำแห้งที่จุดเยือกแข็ง (Freeze drying technique) โครงเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว (monolayer) และแบบ 2 ชั้น (bilayer) ถูกเตรียมแตกต่างกันที่อุณหภูมิแช่แข็งโดยโครงเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียวจะถูกแช่แข็งในตู้แช่ที่อุณหภูมิต่างกันคือ -20°C , -40°C และ -60°C ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์แบบ 2 ชั้นจะถูกแช่โดยตรงด้วย lyophilizing plate ที่มีอุณหภูมิ -56°C แล้วทำการศึกษสมบัติทางกายภาพ ทางกลและการย่อยสลาย จากการศึกษาพบว่าการจัดเรียงตัวของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 2 ชั้นประกอบด้วยชั้นที่เบากว่าซึ่งกับสัมผัสอากาศและชั้นที่หนาแน่นกว่าซึ่งสัมผัสกับกรดแช่แข็ง และการเรียงตัวของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 2 ชั้นมีความเป็นระเบียบมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิในการแช่แข็งที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ขนาดของรูพรุนเล็กลง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการใช้โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนเหมาะสมกับงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

2.6 Glycosaminoglycans (GAG)

Glycosaminoglycans เป็นองค์ประกอบสำคัญที่อยู่ในชั้นผิวหนังซึ่งอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน ที่อยู่ในชั้นหนังแท้ (dermis) GAGs มีหลายชนิด มีลักษณะที่แสดงประจุเป็นลบและมีโครงสร้างคล้ายโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่มีสาขา GAG มีหลายชนิด เช่น chondroitin-6-sulfate, dermatan sulfate, keratin sulfate, hyaluronan และ heparin เป็นต้น หน้าที่หลักของ GAG คือทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนสายหลักกลายเป็น proteoglycans อีกทั้งยังสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านทานการย่อยสลายของ Extracellular matrix และสามารถจับยึดโมเลกุลโปรตีนจำพวกไซโตไคน์และโกรสแฟคเตอร์ ที่มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของเซลล์ในกระบวนการรักษาบาดแผลตัวอย่างเช่น TGF- β 1 (Shafritz, 1994) ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเกาะติด การเคลื่อนที่ การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์



รูป 2.8 หน่วยซ้ำของ chondroitin-6-sulfate (Sharfritz, 1994)

จากรูป 2.8 แสดงหน่วยซ้ำของ Chondroitin-6-sulfate (CS) ที่เป็นหนึ่งใน GAG พื้นฐานที่พบในชั้นหนังแท้ที่มีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อตั้งเห็นจากงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีการใช้ chondroitin-6-sulfate (Shafritz และคณะ, 1994; Pek และคณะ, 2004; Lee และคณะ, 2004) เป็น GAG ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการลดอัตราการย่อยสลายและเพิ่มความสามารถในการเกาะติดของเซลล์

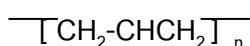
ในปี 1994 Shafritz และคณะได้ทำการศึกษาผลของ glycosaminoglycan ในโครงเลี้ยงเซลล์ collagen- GAG ที่มีผลต่อการหายของบาดแผล (delay wound contraction and induces regeneration) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบผลจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็น collagen type I กับ GAG ที่มีความแตกต่างกัน 4 ชนิดคือ Chondroitin-6-sulfate, dermatan sulfate, decorin (a proteoglycan-containing dermatan sulfate chain) และ aggrecan (a proteoglycan in which 90 % of chondroitin-6-sulfate) แล้วทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งควบคุมขนาดของรูพรุนด้วยการปรับเครื่อง lyophilizer ให้มีอุณหภูมิ -40°C ถึง -38°C และการเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิ 105°C ความดัน 50 mmHg เป็นเวลา 24 ชม. แล้วปิดทับโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย poly(dimethylsiloxane) เพื่อควบคุมความชื้นของบาดแผล เมื่อทำการทดสอบขนาดรูพรุนโครงเลี้ยงเซลล์ collagen-GAG พบว่ามีขนาด 91 ± 12 , 99 ± 23 , 102 ± 26 , 94 ± 23 , และ 160 ± 26 ไมโครเมตร ในโครงเลี้ยงเซลล์ collagen-Chondroitin-6-sulfate, collagen-aggrecan, collagen-dermatan sulfate, collagen-decorin, collagen ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายด้วยการใช้เอนไซม์ collagenase ซึ่งพบว่าอัตราการย่อยสลายเป็น 23.4 ± 3.4 , 38.6 ± 6 , 8.0 ± 3.9 ในโครงเลี้ยงเซลล์ collagen-Chondroitin-6-sulfate, collagen-aggrecan, collagen-dermatan sulfate แต่ไม่สามารถวัดอัตราการย่อยสลายใน collagen-decorin และมีอัตราการย่อยสลาย 12.5-43.5 ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนเพียงอย่างเดียว และเมื่อทดสอบจลนศาสตร์ในการปิดของบาดแผล (kinetics of wound contraction) ในการทดลองในหนูตะเภาพบว่า เมื่อ

เย็บโครงเลี้ยงเซลล์ collagen- GAG จะมีการลดขนาดของแผลซ้ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนเพียงอย่างเดียว

2.7 เส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ (non-woven polypropylene fabric)

ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยทั่วไปแล้วมักจะสนใจการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเหมาะสมกับการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ ดังเช่นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็น 3 มิติที่ช่วยสนับสนุนให้มีการถ่ายเทสารอาหารและออกซิเจนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่มักจะผลิตจากวัสดุที่เป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติเช่น คอลลาเจน, เจลาติน และไคโตซาน (Ma, 2004; Mao, 2003; Zhang, 2001) แต่นอกจากวัสดุจากธรรมชาติดังกล่าวแล้ว งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อก็กังมีความสนใจที่จะใช้วัสดุสังเคราะห์เพื่อช่วยในการสร้างความแข็งแรงให้กับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากวัสดุจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า มีการใช้วัสดุสังเคราะห์อย่างเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอมาใช้ในการศึกษาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากลักษณะเด่นที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความไม่เป็นพิษ (non-toxicity) (Li, 2001; Tyan, 2001) และมีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใยขนาดเล็กซึ่งช่วยเพิ่มสมบัติทางกลและมีราคาถูก (Gentleman, 2003; Lopergolo, 2000)

แต่เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของพอลิพรอพิลีนประกอบไปด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างโมเลกุลพอลิพรอพิลีนและแผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ

โครงสร้างโมเลกุลดังกล่าวแสดงถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ที่เป็นข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทางชีวภาพ (biomaterial) (Wei, 2006; Li, 2001) จึงนำไปสู่การพัฒนาปรับปรุงโครงสร้างพื้นผิวของพอลิพรอพิลีนให้มีความชอบน้ำ (Hydrophilicity) ขึ้นด้วยวิธีต่างๆ เช่น การกระตุ้นด้วยพลาสมา (Wei, 2006) และการเชื่อมพันธะกับคอลลาเจน (Tyan, 2001) โดยที่ลักษณะสมบัติของพอลิพรอพิลีนแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 แสดงลักษณะสมบัติเฉพาะของพอลิพรอพิลีน

วัสดุสังเคราะห์	ความหนาแน่นจำเพาะ	อัตราการดูดซึมน้ำ (%)	อุณหภูมิหลอมละลาย	การส่องผ่านแสง UV	ทนทานต่อความร้อน
Polypropylene (PP)	0.90	0.01	338	Translucent	ไม่ทน

ดัดแปลงจาก ชัยณรงค์ รัตนกรีกากุล, 2547

2.8 ไซโตคายน์และโกรสแฟคเตอร์ (Cytokine and growth Factor) (ชาญวิทย์ ตันดีพิพัฒน์, 2544)

ไซโตคายน์เป็นโมเลกุลโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่หน้าที่สำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ โดยที่ไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อมักเรียกว่าโกรสแฟคเตอร์ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ การย้ายที่ของเซลล์เข้ามาในเมทริกซ์ และการสร้างเมทริกซ์ หรือสารที่เป็นโครงสร้างของ Connective tissue สำหรับไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผลนั้นมีด้วยกันหลายชนิดโดยที่แต่ละชนิดจะมีแหล่งที่มาและทำหน้าที่แตกต่างกันไปดังแสดงได้ในตารางที่ 2.6

การทำงานของโกรสแฟคเตอร์มีความซับซ้อน และต้องการสภาวะที่เหมาะสมทั้งทางด้านสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อีกทั้งยังจะต้องอาศัยโกรสแฟคเตอร์เช่นเดียวกันเพื่อกระตุ้นการทำงานของโกรสแฟคเตอร์เองดังเช่น ตัวอย่างการทำงานของโกรสแฟคเตอร์ในระยะที่บาดแผลเกิดลิ่มเลือด เช่น Interleukin-1 (IL-1) จะกระตุ้นเอนไซม์โปรทีเอสจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ TNF- α จะควบคุมปริมาณของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ส่วนในระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวและมีการซ่อมแซมเมทริกซ์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์, เซลล์เอนโดทีเลียล และ เซลล์เคราทีโนไซต์ มีบทบาทในการสร้างโกรสแฟคเตอร์ โดยเคราทีโนไซต์จะสร้าง TGF- β , TGF- α และ IL-1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์หลัง IGF-1, bFGF, TGF- β , PDGF, Keratinocyte growth factor (KGF) และ Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Endothelial cell จะผลิต bFGF, PDGF และ Vascular Endothelial cell Growth Factor (VEGF) ซึ่งโกรสแฟคเตอร์ทั้งหมดจะส่งเสริมการย้ายที่ของเซลล์, การเพิ่มจำนวน, การสร้างเส้นเลือดใหม่ และการสร้างสารประกอบเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์

ตารางที่ 2.6 ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผล (wound healing) (สมบุญชัย ศิริสวัสดิ์
สุข, 2547; Naughton, 2002)

Cytokines	Symbol	Source	Function
Platelet-derive growth factor	PDGF	Platelet, macrophages, endothelial cell	เพิ่มจำนวนเซลล์ fibroblast และ คอลลาเจน, กระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว
Epidermal growth factor	EGF	Platelet and plasma	เพิ่มจำนวน Epithelial cell, fibroblast และ เนื้อเยื่ออ่อน (granulation tissue)
Transforming growth factor	TGF-	macrophages , lymphocytes	มีหน้าที่เหมือนกับ EGF
Interleukins	IL-1	Macrophages, lymphocytes	เพิ่มจำนวน Fibroblast, ปรับสารเคมีให้ เป็นกลาง (neutrophilchemotaxis)
Tumor necrosis factor	TNF	Macrophages, mast cell ,T lymphocytes	เพิ่มจำนวน Fibroblast
Fibroblast growth factor	FGF	Brain, pituitary, macrophages and many cell	เพิ่มจำนวน Fibroblast และ epithelial cell; เร่งการสะสมของ matrix, ปิดของ บาดแผล, สังเคราะห์หลอดเลือด (angiogenesis)
Keratinocyte growth factor	KGF	Fibroblast	เพิ่มจำนวน Epithelial cell
Insulinlike growth factor-1	IGF-1	Liver, plasma, and fibroblast	สังเคราะห์ sulfated protoglycans, คอลลาเจน และเพิ่มจำนวน fibroblast
Human growth hormone	huGH	Pituitary and plasma	กระบวนการ Anabolism
Interferons	IFN	Lymphocytes and fibroblast	ยับยั้งการเพิ่มจำนวน fibroblast และ การสังเคราะห์ คอลลาเจน

ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาถึงผลของโกรสแฟคเตอร์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ เซลล์และการสร้างเอ็กตราเซลล์ลูลาร์เมทริกซ์ ดังเช่นในงานวิจัยในปี ค.ศ. 2005 ของ Pangborn ซึ่ง ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของโกรสแฟคเตอร์ 4 ชนิด ที่มีต่อการสร้าง ECM ในการเลี้ยง เซลล์แก้วตา (meniscal fibrochondrocytes) ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจาก poly-glycolic acid (PGA) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร หนา 1.5 มิลลิเมตร เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาเตรียม ได้จากแก้วตาของกระต่ายขาวพันธุ์ New Zealand โดยที่มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2.5 ล้านเซลล์/มิลลิลิตรของโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากทำการเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 9 วัน ใน DMEM แล้วจึงทำการเติมโกรสแฟคเตอร์ด้วยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้ครึ่งหนึ่งของ ปริมาตรทั้งหมดเป็นโกรสแฟคเตอร์แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้ transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) เข้มข้น 1, 10, and 100 ng/ml ; insulin-like growth factor I (IGF-I) เข้มข้น 5, 12.5, and 50 ng/ml; platelet-derived growth factor-AB (PDGF-AB) และ basic fibroblastic growth factor (bFGF) เข้มข้น 10, 25, and 100 ng/ml ซึ่งมีการเลี้ยงเซลล์ในโครง เลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโกรสแฟคเตอร์เป็นตัวควบคุมแล้วจึงทำการวิเคราะห์ผลด้วย Radiolabeling assay ที่แสดงปริมาณ S-sulfate และ H-proline ที่ถูกเซลล์นำไปใช้ในการสร้าง GAG และ คอลลาเจน เมื่อทำการศึกษาภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ PGA ที่ใช้ TGF- β 1-medium จะมีความหนาแน่นของเซลล์และ/หรือ ECM แตกต่างกับการใช้โกรสแฟคเตอร์ชนิด อื่น และเมื่อพิจารณาปริมาณ H-proline พบว่าใน TGF- β 1 และ bFGF ที่มีความเข้มข้น ในระดับกลางและสูงจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวควบคุม แต่ใน IGF-I และ PDGF-AB ไม่มีความแตกต่าง ส่วนปริมาณ S-sulfate ในกลุ่มของ TGF- β 1 พบว่ามีแนวโน้ม ของการใช้ S-sulfate เพิ่มขึ้นตามเวลา โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของโกรสแฟคเตอร์ที่มีค่าสูง จะเห็นความแตกต่างของ S-sulfate อย่างมีนัยสำคัญสำหรับการทดสอบทางชีววิทยาที่พิจารณา จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าในกลุ่มของ IGF-I และ bFGF เท่านั้นที่มีจำนวนเซลล์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับการศึกษาการปลดปล่อยโกรสแฟคเตอร์หรือไซโตไคน์ออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ได้ มีการศึกษามาแล้วหลายรูปแบบดังเช่นในปี ค.ศ.1997 Oluyinka O. และคณะ ได้ทำการศึกษาผล ของคอลลาเจนที่มีต่อการปลดปล่อย cytokines จากเกล็ดเลือด (platelet) ด้วยการศึกษาริมาณ โกรสแฟคเตอร์ 2 ชนิด คือ PDGF-AB และ TGF- β 1 ที่ปล่อยออกมาจากเกล็ดเลือดซึ่งแยกออกมา จากเลือดของรอกหมู โดยที่เกล็ดเลือดจะถูกกระตุ้นโดยคอลลาเจน และ arachidonate แล้วทำการ วิเคราะห์ปริมาณโกรสแฟคเตอร์ด้วยเทคนิคการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีที่ถูกเชื่อมโยง (ELISA;

enzyme-linked immunosorbent assay) จากผลการศึกษพบว่าคอลลาเจนสามารถกระตุ้นการปลดปล่อยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมและ arachidonate สามารถกระตุ้นการปลดปล่อยเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าคอลลาเจน

ในปีค.ศ. 2004 Lee และคณะได้ทำการศึกษผลของการปลดปล่อย TGF- β 1 จากเม็ดโคโตซานขนาดเล็ก (chitosan microsphere) ที่มีต่อการเลี้ยงเซลล์กระดูก (chondrocytes) บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากคอลลาเจน-โคโตซาน-ไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan : GAG) TGF- β 1 ถูกบรรจุอยู่ในอนุภาคโคโตซานด้วยการทำสารละลาย อิมัลชันที่เป็นประจุ (emulsion-ionic cross-linking) แล้วจึงทำการศึกษการปลดปล่อย TGF- β 1 จากอนุภาคใน PBS ด้วย ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) หลังจากนั้นจึง ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่มีความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักและ 1.0 % โดยน้ำหนักตามลำดับด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยการทำให้แข็งแล้วทำให้แห้งในสภาวะความดัน สูง (lyophilized) แล้วจึงทำการเชื่อมโยงพันธะกับ chondroitin -6-sulfate ด้วย EDC หลังจากนั้น จึงทำการใส่อนุภาค โคโตซาน-TGF- β 1 ด้วยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารแขวนลอย TGF- β 1 ซึ่งมี ปริมาณ 0.45 มิลลิกรัม ในเอทานอล 90% แล้วนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงซึ่งจะมีปริมาณ TGF- β 1 ประมาณ 10 นาโนกรัม จากผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มีอนุภาคเล็กๆเกาะอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ และผลจากการวิเคราะห์การปลดปล่อย TGF- β 1 ออกจากไมโครสเฟียร์พบว่า ปริมาณของ TGF- β 1 ที่ปลดปล่อยออกมาแบบสะสมจะมีค่าเพิ่มขึ้นแล้วคงที่ นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์ ผลการทดสอบทางชีวภาพในการเลี้ยงเซลล์ chondrocyte ซึ่งเป็นเซลล์กระดูกด้วยการวิเคราะห์ จำนวนเซลล์ที่เกาะและเพิ่มจำนวน (cell attachment and proliferation) ในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย ปริมาณ DNA พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มี growth factor TGF- β 1 จะมีจำนวนเซลล์มากกว่า ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโกรสแฟคเตอร์ TGF- β 1 อีกทั้งเมื่อพิจารณาปริมาณของ GAG และ น้ำหนักโดยรวมของโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยง เซลล์ที่ไม่มี TGF- β 1 พบว่าในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี TGF- β 1 จะมี GAG และน้ำหนักแห้งมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโกรสแฟคเตอร์จึงสามารถสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคของโกรสแฟคเตอร์ TGF- β 1 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างกระดูกได้

2.8.1 การใช้องค์ประกอบของเลือดเป็นโกรสแฟคเตอร์ (Growth factor)

องค์ประกอบและคุณสมบัติของเลือด (วิน เชยชมศรี, 2540)

เลือดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบไหลเวียนเลือดของมนุษย์และสัตว์ซึ่งทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ เพื่อจัดหาปัจจัยพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับเซลล์ในร่างกายทำให้เซลล์สามารถทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพอันเป็นผลให้ร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นสามารถดำรงชีพได้ปกติ

องค์ประกอบของเลือด

เลือดจัดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ชนิดหนึ่ง ที่มีลักษณะเป็นของเหลวไหลเวียนอยู่ในหลอดเลือดประกอบด้วย

ก. ส่วนที่เป็นน้ำเลือดที่เรียกว่าพลาสมา (plasma) เป็นของเหลวที่เป็นตัวกลางให้เม็ดเลือดแขวนตัวลอยอยู่คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของเลือด

ข. ส่วนที่เป็นเม็ดเลือด (Corpuscles หรือ formed elements) คือส่วนที่เป็นตัวเซลล์แขวนลอยไหลเวียนในหลอดเลือดทั่วร่างกาย ได้แก่ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดหรือ thrombocyte คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของเลือด

2.8.2 พลาสมา (Plasma)

พลาสมา หมายถึง น้ำเลือดที่แยกเอาส่วนของเม็ดเลือดและเกล็ดเลือดออกไปแล้วด้วยการปั่น พลาสมามีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองซึ่งมีสารต่างๆละลายอยู่ ได้แก่ โปรตีนชนิดต่างๆ รวมถึงปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด (coagulation factor) พลาสมาจะถูกแยกออกจากเม็ดเลือดที่ตกตะกอนด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ (sterilized) จากนั้นเลือดจะถูกแช่แข็งภายใน 6 ชม. หลังจากรับบริจาคแล้วเพื่อพยายามรักษาสารที่ทำให้เลือดแข็งตัวไว้ พลาสมาแช่แข็ง (Fresh frozen plasma, FFP) จะมีปริมาณ 180 - 300 มล. ต่อ 1 ยูนิต โดยที่ใน 1 ยูนิตจะมีสารที่ทำให้เลือดแข็งตัวเช่น factor VIII ประมาณ 200 ยูนิต และสารที่ทำให้เลือดแข็งตัวชนิดละลายยาก เช่น fibrinogen 2-4 mg/ml

ขั้นตอนการเตรียมพลาสมา (Brecher, 2005)

ปั่นแยกน้ำเลือดด้วยความเร็วแบบ heavy spin (ตารางที่ 2.7) ที่อุณหภูมิ 1- 6 °C แล้วแช่แข็งเก็บที่อุณหภูมิ - 18 °C

ข้อบ่งใช้พลาสมา (ชาญวิทย์ ตันดีพิพัฒน์, 2544)

1. ในผู้ป่วย hemophilia ที่มีภาวะเลือดออกแต่ยังไม่ได้ตรวจว่า เป็นการขาด factor VIII
2. ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเลือดออกทางสูติกรรม เลือดไม่แข็งตัวเพราะมีไฟบริโนเจนต่ำ

ตารางที่ 2.7 ตารางแสดงการปั่นแยกการเตรียมองค์ประกอบของเลือด

Heavy spin	
Red cells	} 5000 x g, 5 minutes
Platelets from whole blood	
Cell-free plasma	} 5000 x g , 7 minutes
Cryoprecipitate	
Light spin	
Platelet-rich plasma	2000 x g , 3 minutes
To calculate relative centrifugal force in g :	
$Rcf \text{ (in g)} = 28.38 \times R^* \times (\text{rpm}/1000)^2$	

R^* = radius of centrifuge in inches

ที่มา (Brecher, 2005)

ข้อบ่งใช้พลาสมา (ชาณวิทย์ ตันดีพิพัฒน์, 2544)

1. ในผู้ป่วย hemophilia ที่มีภาวะเลือดออกแต่ยังไม่ได้ตรวจว่าเป็นการขาด factor VIII
2. ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเลือดออกทางสูติกรรม เลือดไม่แข็งตัวเพราะมีไฟบริโนเจนต่ำ

ข้อแนะนำการให้พลาสมา

1. ให้ตามหมู่เลือด ABO ของผู้ป่วย โดยไม่ต้อง compatibility testing
 - ถ้าไม่มี ให้ FFP 'AB' แก่ผู้ป่วยทุกหมู่เลือดได้
 - ผู้ป่วยหมู่เลือด 'O' สามารถรับ FFP ทุกหมู่เลือดได้
2. ก่อนใช้น้ำ FFP มาละลายในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 37°C จนน้ำแข็งละลาย
3. การให้ควรระวังอันตรายจาก
 - Circulatory overload จากการให้จำนวนมากหรือเร็วเกินไป
 - Transfusion reactions จากการแพ้พลาสมาโปรตีน

2.8.3 เกล็ดเลือดเข้มข้น (Concentrated platelet) (Brecher, 2005)

เกล็ดเลือดเข้มข้นเตรียมได้จากเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20°C แล้วทำการแยก platelet-rich-plasma (PRP) ภายใน 4 ชม. หลังจากนั้นจึงทำการปั่นแยก PRP เพื่อแยกเอา

ของเหลวที่เป็นพลาสมาออกหลังจากนั้นจึงนำเกล็ดเลือดที่ปั่นแยกได้มาทำการแขวนลอยอีกครั้ง ในน้ำเลือด (plasma) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20-24 °C ในสภาวะที่มีการสั่นเบาๆ ช้า ๆ อย่าง ต่อเนื่อง เพื่อป้องกันไม่ให้ Platelet ตกตะกอน โดยที่ในเกล็ดเลือดเข้มข้น 1 ยูนิตมีปริมาณเกล็ด เลือดต่อยูนิตมากกว่า 5.5×10^{10} platelets/unit

ขั้นตอนการเตรียมเกล็ดเลือดเข้มข้น

- 1.ปั่นแยกเกล็ดเลือดออกจากพลาสมาที่อุณหภูมิประมาณ 20 °C ด้วยความเร็วแบบ light spin ซึ่งจะได้ platelet rich plasma (PRP)
- 2.ปั่น PRP ที่อุณหภูมิ 20 °C ด้วยความเร็วแบบ heavy spin
- 3.เก็บเกล็ดเลือดที่แยกได้ในพลาสมาปริมาตรไม่เกิน 70 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีการสั่น เบาๆอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 20-24 °C

ข้อบ่งใช้เกล็ดเลือด

สำหรับผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำและมีภาวะเลือด หรือเพื่อป้องกันภาวะเลือดออกจากการมี เกล็ดเลือดต่ำ ซึ่งเกิดจากการสร้างไม่พอ มีการสูญเสีย หรือการถูกทำลาย

ปริมาณการให้เกล็ดเลือด

เกล็ดเลือดเข้มข้น 1 ยูนิตต่อน้ำหนักตัว 10 กิโลกรัม การให้เกล็ดเลือดเข้มข้นมาตรฐาน 1 ยูนิต ควรเพิ่มเกล็ดเลือดให้มีปริมาณ 10,000/ไมโครลิตร ในผู้ป่วยน้ำหนัก 1 กิโลกรัม

ข้อแนะนำการให้เกล็ดเลือด

ให้ตามหมู่เลือด ABO แต่ถ้าไม่มี

-ให้เกล็ดเลือดเข้มข้น 'O' แก่ผู้ป่วยหมู่เลือด 'A' หรือ 'B' ได้

-ให้เกล็ดเลือดเข้มข้น 'A' หรือ 'B' แก่ผู้ป่วยหมู่เลือด 'AB'

2.8.4 ไครโอปริซิพิเตท (Cryoprecipitate) (ชาญวิทย์, 2544)

ไครโอปริซิพิเตท คือตะกอนโปรตีนของพลาสมาแช่แข็ง (FFP) ที่ไม่ละลายที่อุณหภูมิ 1-6 °C ในแต่ละถุงของไครโอปริซิพิเตทประกอบไปด้วย factor VIII ประมาณ 70 หน่วย ไฟบริโนเจน อย่างน้อย 150 มิลลิกรัมและ ไฟโบรเนคติน 50-80 มิลลิกรัม ควรเก็บรักษาไครโอปริซิพิเตทไว้ที่

อุณหภูมิ -20°C หรือต่ำกว่า ซึ่งสามารถเก็บได้นาน 1 ปี และก่อนการใช้งานจะต้องละลาย
 ไครโอปริซิพิเตทอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ $30-37^{\circ}\text{C}$

ขั้นตอนในการเตรียมไครโอปริซิพิเตท (Brecher, 2005)

1. เก็บตัวอย่างเลือดที่ได้รับบริจาค
2. ทำการปั่นแยกให้เซลล์เม็ดเลือดตกตะกอนด้วยปริมาตรอย่างน้อย 200 มิลลิลิตร ด้วย
 ความเร็วระดับ heavy spin (ตาราง 2.4)
3. แช่วังพลาสมาที่ปั่นแยกได้ทันทีด้วยเครื่องทำความเย็นหลังจากนั้นจึงละลายพลาสมาแช่
 แช่ที่อุณหภูมิ $1-6^{\circ}\text{C}$
4. เมื่อพลาสมาละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วก็ทำการแยกน้ำพลาสมาออกด้วยการปั่นแยก
 แบบ Heavy spin แล้วแยกทันที ได้ไครโอปริซิพิเตทติดอยู่ที่ผนังที่บรรจุ
5. เก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -30°C

ข้อบ่งใช้ไครโอปริซิพิเตท

1. เพื่อทดแทนแฟคเตอร์ VIII ในผู้ป่วย hemophilia A และ von Willebrand disease
2. เพื่อทดแทนไฟบริโนเจนในปัญหาเลือดออกทางสูติกรรม หรือภาวะอื่นๆ การให้ไครโอปริ
 ซิพิเตท ครั้งละ 10 ยูนิต จะเท่ากับได้ไฟบริโนเจนประมาณ 2 กรัม
3. เพื่อทดแทน von Willebrand factor ในผู้ป่วยที่มี platelet dysfunction
4. เพื่อทดแทนไฟโบรเนคติน และ แฟคเตอร์ XIII

ข้อแนะนำการให้ไครโอปริซิพิเตท

1. เมื่อต้องการใช้น้ำละลายในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 37°C แล้วเติม normal saline ลงไปถว
 ละ 10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันและควรรวมเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อความสะดวกในการให้ผู้ป่วย
2. เมื่อละลายแล้วควรให้ผู้ป่วยโดยเร็วที่สุดจึงจะได้ผลดีตามต้องการ ถ้ายังไม่ใช้ควรเก็บไว้
 ที่อุณหภูมิ $1-6^{\circ}\text{C}$
3. ไม่จำเป็นต้องให้ตามหมู่เลือด ABO และไม่ต้องทำ compatibility testing

2.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro* cell culture)

2.9.1 ชนิดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Davey, 2003)

2.9.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ขั้นปฐมภูมิ (Primary cell cultures)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะปฐมภูมินั้นเริ่มต้นจากเซลล์ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตโดยตรงก่อนที่จะมีการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน หรือมีการปรับปรุงพันธุกรรมให้กลายเป็นเซลล์ไลน์ (Cell lines) โดยที่การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนครั้งแรกเรียกว่าการเพาะเลี้ยงขั้นปฐมภูมิ แต่เซลล์ในระยะปฐมภูมิที่แยกได้โดยตรงจากสิ่งมีชีวิตนั้นจะมีข้อจำกัดในการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่างซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์แต่ละชนิด

2.9.1.2 Cell line culture

Cell line คือ เซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงรูปแบบมาจากเซลล์ปฐมภูมิด้วยเชื้อไวรัส ลักษณะเฉพาะของ cell line คือเซลล์ที่สามารถเพิ่มจำนวน หรือ เปลี่ยนแปลงรูปร่างได้อย่างไม่จำกัดขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่ศึกษาเช่น L929 mouse skin fibroblast หรือ CCL551 human skin fibroblast จากการศึกษาพบว่ามีต้นแบบมากมายในการแยกชนิดของเซลล์ สภาวะในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการประเมินค่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์

2.9.2 MTT assay for cell viability (Mosmann, 1983; Choi และคณะ, 2004)

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ tetrazolium มีสีเหลือง โดยที่ MTT ที่ถูกละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี phenol red จะถูกเปลี่ยนเป็นผลึก formazan สีม่วงที่เนื่องจากการถูกทำลายวงแหวน tetrazolium ด้วยเอนไซม์ dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้แต่สามารถละลายได้โดยใช้ตัวทำละลาย เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) สารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณผลึก formazan ที่ถูกละลายออกมาซึ่งแปรผันโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

2.10 การตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยการย้อมสี (กัลยา ผลการกุล, 2534)

วัตถุประสงค์ของการย้อมสีเนื้อเยื่อคือการย้อมสีของเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อนั้นๆ เพื่อให้ศึกษาลักษณะรูปร่าง หรือ ปริมาณ ของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งโดยทั่วไป

เซลล์ในร่างกายนั้นจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ นิวเคลียส (Nucleus) และไซโตพลาสซึม (Cytoplasm)

2.10.1 เซลล์และองค์ประกอบของเซลล์

2.10.1.1 นิวเคลียส

ภายในนิวเคลียสมี Nucleolus ซึ่งมีรูปร่างกลมติดสีเข้มจัดซึ่งมีสาร RNA (ribonucleic acid) อยู่มาก นอกจากนี้ในนิวเคลียสยังมีส่วนประกอบสำคัญอีกอย่างคือ Chromatin ซึ่งประกอบด้วย DNA (Deoxyribonucleic acid) ซึ่งมีทั้งชนิด inactive และ active ถ้าย้อมสีด้วย H&E พบว่าส่วน inactive chromatin จะติดสีน้ำเงิน ถ้าเป็นส่วน active จะไม่มีสี

2.10.1.2 ไซโตพลาสซึม

เป็นส่วนหนึ่งของ Protoplasm ที่อยู่รอบนิวเคลียสจะติดสีจางมากถ้าตัดและย้อมด้วยวิธีธรรมดา ไซโตพลาสซึมจะประกอบด้วยส่วนเล็กๆ 2 ชนิด คือ Organelles และ Inclusion คือส่วนที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยที่ส่วนที่มีชีวิตจะประกอบไปด้วย Endoplasmic reticulum, Golgi complex, Mitochondria, Lysosome, Microtubule ในขณะที่ส่วนที่ไม่มีชีวิตจะประกอบไปด้วย ส่วนกักเก็บอาหารประเภทไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปเมตริกซ์ เอนไซม์ และเม็ดสีต่างๆ

2.10.2 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue)

เป็นเนื้อเยื่อที่มีหน้าที่สำคัญในการยึดหรือเชื่อมโยงเนื้อเยื่อต่างๆเข้าด้วยกัน ประกอบด้วยเซลล์ที่มีจำนวนน้อยและสสารระหว่างเซลล์ที่เรียกว่าเมตริกซ์ซึ่งมีจำนวนมาก ในส่วนของเมตริกซ์ประกอบด้วยไฟเบอร์ที่เป็นเส้นใยแทรกระหว่างเซลล์ และ Amorphous ground state ที่เป็นส่วนที่ไม่มีรูปร่างลักษณะคล้ายวุ้น

เมตริกซ์ หรือ Intercellular Substance มี 2 ชนิดคือไฟเบอร์และ ground substance

-ไฟเบอร์ แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด

1. คอลลาเจนไฟเบอร์ (collagen fiber) เป็นสารโปรตีนรวมตัวกันเป็นบันเดิล (bundle) เมื่อไม่ย้อมจะเห็นเป็นสีขาว เมื่อย้อมด้วย H&E จะติดสีแดงของ eosin คอลลาเจนไฟเบอร์ถูกสร้างโดย fibroblast cell ซึ่งทำหน้าที่เป็น connective tissue cell

2. อีลาสติกไฟเบอร์ (elastic fiber) มีขนาดเล็กกว่าคอลลาเจนไฟเบอร์ถูกสร้างขึ้นโดย fibroblast cell ขณะสดจะเป็นสีเหลือง เมื่อย้อมด้วย H&E จะติดสีแดงของ eosin

3. เรติคิวลาร์ไฟเบอร์ (reticular fiber) เป็นเส้นใยขนาดเล็กประสานกันเป็นร่างแหทำหน้าที่เป็นโครงของอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไชกระดูก เมื่อย้อมด้วย H&E จะไม่ติดสี

-Ground Substance มีลักษณะคล้ายวุ้น (gel) ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

1. Protein polysaccharide (mucopolysac) ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ

-Non-sulfated form ส่วนใหญ่เป็นพวกกรดไฮยาลูโรนิก hyaluronic acid ที่สร้างโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์

-Sulfated form เป็นพวก chondroitin sulfuric acid ติดสีชมพูของ eosin พบใน cartilage และ bone matrix

2. Tissue fluid เป็นของเหลวที่อยู่เนื้อเยื่อ

2.10.3 การย้อมสีขึ้นเนื้อ (Tissue staining)

การย้อมสีขึ้นเนื้อมีการย้อมสีธรรมดา (Routine staining) และวิธีพิเศษ (special staining) ซึ่งมีวิธีการต่างกันมากโดยในทางปฏิบัติจะทำการย้อมสีธรรมดาก่อนเมื่อแปรผลได้ไม่ชัดเจนจึงจะอาศัยการย้อมสีวิธีพิเศษเพื่อช่วยในการแปรผลภายหลัง

การย้อมสีขึ้นเนื้อด้วยวิธีธรรมดา ที่นิยมใช้เป็นมาตรฐานคือ วิธี Haematoxylin และ Erosin โดยผลที่ได้จากการย้อมคือ นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินของ heamatoxylin ส่วน ไซโตพลาสซึมจะติดสีแดงของ erosin

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ที่ผ่านมาจะมีงานวิจัยหลายชิ้นให้ความสนใจเกี่ยวกับการใช้องค์ประกอบที่แยกได้จากเลือดมาทำการทดสอบเพื่อศึกษาถึงผลกระทบของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในเลือด ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Sarkar , 2006; Schlegel, 2004) ดังเช่นในงานวิจัยของ Sarkar และคณะในปี ค.ศ. 2006 ซึ่งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของการใช้โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่มี platelet-rich plasma (PRP) ในการศึกษาการสร้างตัวของกระดูกใหม่บริเวณบาดแผล (2.5) cm ในกระดูกหน้าแข้งของแกะในช่วงเวลา 12 สัปดาห์ โดยเริ่มจากการแยก PRP ออกจากเลือดแกะด้วยการปั่นแยก (centrifuge) 2 ขั้นตอนคือการปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) ออกมาก่อนแล้วจึงนำของเหลวที่ได้จากการปั่นแยกครั้งแรกมาปั่นแยกอีกครั้งให้เกล็ดเลือด (platelet) และ เม็ดเลือดขาว (leukocytes) แล้วจึงมาแขวนลอยอีกครั้งในน้ำเลือด (plasma) จากการทดสอบปริมาณเกล็ดเลือดพบว่าใน PRP จะมีเกล็ดเลือดประมาณ 477×10^3 ยู

นิต หลังจากนั้นจึงนำ PRP ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร มาใส่ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน (80x25x4 mm) แล้วจึงนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปฝังที่บริเวณบาดแผลในกระดูกของสัตว์ทดลองเพื่อทำการเปรียบเทียบผลกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติม PRP ผลจากการศึกษาด้วยการวิเคราะห์ด้วยรังสี X-ray, การทดสอบแรงกลทางชีวภาพ (Biomechanical testing), การประเมินภาพถ่ายเอกซเรย์ในแนวราบของกระดูก (computed tomography; CT) และการประเมินผลของกายวิภาคของเนื้อเยื่อกระดูก สามารถสรุปได้ว่าการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่ที่แสดงได้จากความหนาแน่นของแร่ธาตุของกระดูกและภาพถ่าย แต่ไม่อาจสรุปได้ว่า PRP มีผลต่อการสร้างกระดูกขึ้นใหม่เนื่องจากผลที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากงานวิจัยของ Tajima และคณะ ในปี 2006 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับระบบการเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติที่ช่วยเสริมสร้างการสร้างกระดูกในหนู ซึ่งระบบดังกล่าวคืออนุภาคเบตา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (β -tricalcium-phosphate) ที่มีรูพรุนซึ่งภายในบรรจุพลาสมา โดยทำการศึกษาพลาสมา 2 กลุ่มคือ PRP (platelet rich plasma) และ PPP (platelet poor plasma) ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวน, การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์กระดูก และความสามารถในการเกิดกระดูกของเซลล์ไขกระดูก (MSCs: bone marrow stem cells) ในการศึกษาเริ่มต้นจากการเตรียม PRP และ PPP ด้วยการปั่นแยกจากเลือดของหนูแล้วทำการวิเคราะห์หาจำนวนเกล็ดเลือดและความเข้มข้นของโกรสแฟคเตอร์ 2 ชนิดคือ PDGF-AB และ TGF- β 1 ด้วยวิธี ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) พบว่ามีจำนวนเกล็ดเลือด 912.55×10^3 และ 29.44×10^3 เกล็ดเลือด/ไมโครลิตร ใน PRP และ PPP สำหรับความเข้มข้นของ TGF- β 1 และ PDGF-AB สามารถวัดได้ใน PRP เท่านั้นซึ่งมีค่า 131.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ 602.73 พิโกกรัม/มิลลิลิตร ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ MSCs จำนวน 2.5×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ MSCs จำนวน 2.5×10^3 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ในสารอาหารที่มี PRP และ PPP ที่เวลา 0,3,6,10 วัน ด้วยการการวัดปริมาณ DNA และค่ากิจกรรมของแอลคาไลน์ฟอสเฟต (alkaline phosphate (ALP) activity) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า PRP ส่งผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์แต่ยังการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์กระดูก และจากการศึกษา ยังพบอีกว่าการเลี้ยงเซลล์ในวุ้นไฟบริลที่เป็น 3 มิติให้ผลในการเปลี่ยนแปลงสภาพดีกว่าการเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงโดยที่ในกลุ่มของ PPP จะมีค่า ALP activity สูงที่สุด และผลจากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถูกฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบไปด้วยเซลล์ MSCs ที่แขวนลอยอยู่ใน PRP หรือ PPP ซึ่งบรรจุอยู่ในเบตา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟตเป็นเวลา 3 และ 6 สัปดาห์ ซึ่งจากการประเมินผล

จากภาพที่ได้จากเทคนิคการย้อม H&E พบว่าการใช้ PPP สามารถช่วยให้เกิดการสร้างกระดูกได้ดีกว่าใน PRP

งานวิจัยในปี 2006 Qui และคณะได้ทำการศึกษาผลของพลาสมาไฟโบรเนคติน (plasma fibronectin) ของมนุษย์ที่มีต่อการหายของบาดแผลในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน โดยการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผลของพลาสมาไฟโบรเนคตินกับกลุ่มควบคุม(สารละลาย normal saline) ที่หยดลงบนบาดแผลบริเวณหลังของหนูพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ที่ถูกทำให้เป็นโรคเบาหวานแล้ววัดขนาดการปิดของบาดแผล และประเมินย้ายที่ของเซลล์ไฟโบรบลาส การสร้างคอลลาเจน และการเกิดเส้นเลือดโดยวิธีการทางมิชวิทยา (histology) การตรวจสอบที่เวลาต่างๆ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้พลาสมาไฟโบรเนคตินที่ได้จากโครโอโปรซีพีเททของมนุษย์ โดยก่อนทำการทดลองในหนู พลาสมาไฟโบรเนคตินถูกทำให้บริสุทธิ์ (purified) ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ในสารละลายซูโครสและซีเตรท จากผลการทดสอบพลาสมาไฟโบรเนคตินมีผลทำให้บาดแผลมีขนาดเล็กลงได้เร็วกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนั้นยังพบเซลล์ไฟโบรบลาสที่ย้ายที่เข้าสู่บาดแผล และยังเกิดการสร้างคอลลาเจนขึ้นใหม่อีกด้วยเนื่องมาจากผลโดยตรงของ TGF- β 1 ที่อยู่ในพลาสมาไฟโบรเนคตินซึ่งกระตุ้นให้เซลล์เกิดการย้ายที่และเพิ่มจำนวนซึ่งมีผลต่อการสร้างคอลลาเจนใหม่ที่ใช้ในการปิดของบาดแผล

ในปีค.ศ. 2006 Zhu และคณะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของ Platelet-rich plasma (PRP) และ Platelet-enriched fibrin glue ที่มีต่อการเกิดกระดูกในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของการเกิดเนื้อเยื่อกระดูกที่เวลา 12 สัปดาห์ ในระบบที่แตกต่างกัน 2 ระบบคือ ระบบที่ผสมระหว่าง PRP/bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)/bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) และระบบของ Platelet-enriched fibrin glue/BMSCs/BMP-2 โดยที่ PRP, fibrinogen และ BMSCs ถูกเตรียมมาจากเลือดและไขกระดูกต้นขาของหนู ในการทดลองนี้สารละลายผสมทั้ง 2 ระบบจะถูกฉีดเข้าสู่ใต้ผิวหนังของหนูทดลองพันธุ์ nude mice bulb/C จากการทดสอบปริมาณกระดูกที่เกิดขึ้นใหม่จากการวิเคราะห์ด้วย histomorphometric analysis พบว่าระบบที่ใช้ Platelet-enriched fibrin glue มีปริมาณกระดูกที่เกิดขึ้นใหม่ได้มากกว่าในระบบของ PRP เนื่องจากปริมาณของไฟโบรโนเจนใน Platelet-enriched fibrin glue ที่มีมากกว่าใน PRP ถึง 12 เท่า โดยที่ไฟโบรโนเมทริกซ์จะเป็นตัวเสริมให้ BMSCs สามารถยึดเกาะ เพิ่มจำนวน และเปลี่ยนสภาพได้ดีซึ่งส่งผลต่อการเกิดเนื้อเยื่อกระดูก

ในงานวิจัยของ Choi และคณะในปี 2004 ที่ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของความเข้มข้นของ Platelet rich plasma (PRP) ที่มีต่อความอยู่รอด (viability) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone cells) ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้เซลล์และเกล็ดเลือดที่แยกได้จากสุนัข ในการทดลองเตรียมเกล็ดเลือดจากการปั่นแยกเกล็ดเลือดออกจากน้ำเลือดที่มีปริมาณเกล็ดเลือดต่างกัน 3 ชนิดคือ PRP, platelet poor plasma (PPP) และ concentrated platelet (PC) ซึ่งมีจำนวนเกล็ดเลือด $124 \times 10^4/\mu\text{l}$, $12 \times 10^4/\mu\text{l}$ และ $110 \times 10^4/\mu\text{l}$ ตามลำดับหลังจากการทดลองเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันเป็นเวลา 7 วัน ใน DMEM with 10% Fetal calf serum ที่มีการเติมเกล็ดเลือดชนิดกันที่มีความเข้มข้นต่างๆคือ 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50% และ 100% ใน DMEM แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธีการ MTT เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม(ไม่เติมเกล็ดเลือด) พบว่าใน PRP เซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มจำนวนมากขึ้นที่ความเข้มข้น 1% และ 5% และจะมีจำนวนลดลงที่ค่าความเข้มข้นสูงและที่ PRP 100% แสดงผลว่าเป็นพิษต่อเซลล์ และใน PPP แสดงผลเช่นเดียวกันกับ PRP แต่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า ส่วนใน PC พบว่ามีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ความเข้มข้น 30% แล้วลดจำนวนที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า PRP ที่มีความเข้มข้นต่ำ(1-5%) สามารถกระตุ้นความอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

จากงานวิจัยของ Crovetti และคณะในปี ค.ศ. 2004 ที่ทำการศึกษาการใช้เจลเกล็ดเลือด (platelet gel) ของมนุษย์ในการรักษาบาดแผลเรื้อรังที่ผิวหนัง เนื่องมาจากเกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในการรักษาบาดแผลเพราะเป็นแหล่งของโกรสแฟคเตอร์ (PDGF, TGF- β , VEGF) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของเจลเกล็ดเลือดที่มีต่อการลดขนาดของบาดแผล, การเกิดเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน และอาการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีแผลเป็นหนองที่ผิวหนัง 24 ราย โดยที่ผู้ป่วยแต่ละรายจะมีจำนวนและสาเหตุของการเกิดแผลเป็นหนองต่างกัน เจลเกล็ดเลือดเตรียมได้จากส่วนผสมของเกล็ดเลือดและโครโอโปรตีนพิเททของผู้ป่วยเอง (autologous) และจากผู้อื่น (homologous) แล้วทำให้เกิดเจลด้วยการเติม calcium gluconate โดยที่เกล็ดเลือดและโครโอโปรตีนพิเททจะถูกกระตุ้น (activated) ก่อนการใช้งานที่อุณหภูมิ 37°C ขั้นตอนในการรักษาเริ่มจากการวางเจลเกล็ดเลือดบนบาดแผลแล้วจึงปิดด้วยวัสดุปิดแผลโดยมีระยะเวลาในการรักษา 1 เดือน ด้วยการเปลี่ยนแผ่นเจลเกล็ดเลือดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ผลจากการศึกษาพบว่าในผู้ป่วย 9 คนมีการตอบสนองอย่างสมบูรณ์คือขนาดของบาดแผลลดลง โดยที่ผู้ป่วย 7 ใน 9 คนมีขนาดบาดแผลลดลงมากกว่า 50% แต่อีก 2 คนขนาดบาดแผลลดลงไม่ถึง 50% ผู้ป่วย 2 คนได้รับการเย็บปิดบาดแผล ผู้ป่วย 4 รายหยุดการรักษา และผู้ป่วย 9 รายมีการตอบสนองบางส่วนและยังคงรับการรักษาต่อ และเมื่อ

พิจารณาผลของการเกิดเนื้อเยื่อแกรนูโลเซลล์ สามารถพบเนื้อเยื่อแกรนูโลเซลล์เพิ่มขึ้นได้ตั้งแต่
 ลับดาห์แรก และจะเกิดขึ้นหนึ่งกำพร้าว่างสมบูรณ์ในเวลาต่อมา และยังได้รับการยืนยันจาก
 ผู้ป่วยทุกรายว่าความเจ็บปวดลดลงในขณะที่ทำการรักษาด้วยเจลเกล็ดเลือด

ในปี ค.ศ. 2002 Carter และคณะการรักษาบาดแผลด้วยการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง
 รูปร่างและการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้ Platelet-rich plasma (PRP) โดยทำการศึกษาด้วย
 ต้นแบบบาดแผลและ PRP ที่ได้จากม้า ทำการแยก PRP ออกจากเลือดม้าด้วยการปั่นแยก โดยมี
 จำนวนเกล็ดเลือดที่ปั่นแยกได้ 1.4×10^{11} platelet แล้วจึงเตรียม PRP-gel ด้วยการเติมทรอมบิน
 (thrombin) การตรวจสอบปริมาณโกรสแฟคเตอร์ใน PRP-gel ด้วย ELISA kit พบว่า PRP-gel มี
 องค์ประกอบของ PDGF-AB อยู่ 745 ± 120 pg/ml และมี TGF- β 1 อยู่ 7480.7 ± 1315 pg/ml จาก
 การทดสอบการใช้ PRP-gel ในการรักษาบาดแผลด้วยการปิดที่บาดแผลบริเวณใต้หัวเข่าและข้อ
 ต่อเปรียบเทียบกับบาดแผลที่ไม่ได้ใช้ PRP-gel (กลุ่มควบคุม) แล้วทำการวิเคราะห์ผลการรักษา
 บาดแผลด้วยการย้อมชิ้นเนื้อบริเวณที่เกิดบาดแผลด้วย cytokeratin 10 (cytokeratin 10
 staining) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เคราทีโนไซต์ และการย้อม trichrome
 (trichrome staining) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่ จากผลการศึกษาในวันที่ 7
 สามารถสังเกตเห็นการย้อมติดสี cytokeratin 10 อย่างชัดเจนกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งแสดงถึงปริมาณ
 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เคราทีโนไซต์ไปเป็นเซลล์ผิวหนังกำพร้าว่าง และที่ 79 วัน บาดแผลที่
 ปิดด้วย PRP-gel มีคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่เรียงตัวขนานกันอย่างหนาแน่นและถูกปกคลุมด้วย
 ผิวหนังชั้นหนึ่งกำพร้าว่าง ในขณะที่กลุ่มควบคุมสามารถพบคอลลาเจนไฟเบอร์ที่เรียงตัวกันอย่างไม่
 เป็นระเบียบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของ PDGF และ TGF ที่สามารถพบได้ใน
 เกล็ดเลือด

ในปี ค.ศ.1998 Meana และคณะได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ชั้นหนึ่งกำพร้าว่างของมนุษย์
 (human Epithelium) ของมนุษย์ในเมทริกซ์ที่มีองค์ประกอบพื้นฐานเป็นไฟบริลเจลซึ่งมีเซลล์ไฟโบ
 รบลาสที่มีชีวิตฝังตัวอยู่ โดยในการทดลองนี้ใช้เซลล์เคราทีโนไซต์ของมนุษย์ที่แยกได้จากวิธีของ
 Rheinwald และ Green เพาะเลี้ยงลงบนไฟบริลเจลด้วยจำนวนที่แตกต่างกัน ไฟบริลเจลเตรียมได้
 จากไฟบริโนเจนที่ปั่นแยกออกมาจากโครโอปริซิพิเตท ขั้นตอนการเตรียมไฟบริลเจลเริ่มจากการ
 เติมสารละลายไฟบริโนเจนลงในสารอาหาร DMEM ที่มีซีรัม 10% ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์
 ไฟโบรบลาสจำนวน 50,000 เซลล์ หลังจากนั้นจึงเติม CaCl_2 และ bovine thrombin แล้วจึงทำ
 การเพาะเลี้ยงเซลล์เคราทีโนไซต์ลงบนไฟบริลเจล ผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่าเซลล์สามารถ
 เพิ่มจำนวนทั้งในชั้นของหนึ่งกำพร้าว่าง (epithelium) และชั้นของไฟโบรบลาสที่อยู่ในเจลตามการ

วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วย BrdU assay และเมื่อทำการทดลองในสัตว์ทดลองโดยการนำแผ่นเจลที่เติมไปด้วยเซลล์เคราตินไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสเย็บติดกับบาดแผลที่ผิวหนังของหนูทดลองพันธุ์ athymic nude mice แล้วศึกษาผลด้วยเทคนิคการย้อม (H&E) พบว่าเซลล์เคราตินไซต์ในชั้นหนังกำพร้ามีการจัดเรียงตัวเป็นชั้นคล้ายคลึงกับชั้นผิวหนังกำพร้าของมนุษย์

เอกสารสิทธิ์

1) US patent no. 5800537

ในปีค.ศ. 1998 Bell; Eugene ได้ทำการค้นพบวิธีการสร้างอนุภาคของ ECM โดยการใช้โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชีวิตลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังค้นพบการสร้างพันธะระหว่างอนุภาคของโพลีคอลลาเจน หรือเส้นใยคอลลาเจนที่จับยึดกับโพลีเมอร์ หรือเส้นใยคอลลาเจนเอง โครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวสามารถใช้เป็นเนื้อเยื่อทดแทนหรือเป็นต้นแบบในการวิจัยและทดสอบ การค้นพบยังรวมไปถึงการปั่นเส้นใยที่เป็นอนุภาคของเมทริกซ์ที่เป็นองค์ประกอบและระเหิดแห้ง (freeze drying) โพลี

การอ้างสิทธิ์

ขั้นตอนการผลิตอนุภาค ECM (Extracellular matrix particulates) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้คือ การแปรรูปเนื้อเยื่อที่มี ECM และเซลล์ที่มีชีวิตด้วยแยกเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อโดยไม่ทำการแยกโกรสแฟคเตอร์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ออกด้วยสารละลายเกลือ และขั้นตอนการแยก ECM ที่ผ่านกระบวนการนำไปผลิตอนุภาคของ ECM ซึ่งจะนำไปยึดติดกับโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนทั้งแบบที่เป็นโพลีเมอร์และเป็นเส้นใย แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกออกจากเนื้อเยื่อลงในโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ทำให้เกิดการยึดเกาะ ซึ่งจะใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อและเซลล์จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนู

2) US patent no. 6051750

ในปีค.ศ. 2000 Bell; Eugene ได้ทำการค้นพบเพิ่มเติมถึงกระบวนการผลิตเส้นใยพอลิเมอร์เคลือบด้วยอนุภาค ECM (particulate-coated polymer thread) ที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อทดแทนซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ คือ 1.กระบวนการปั่นเนื้อเยื่อที่มี ECM และเซลล์ที่มีชีวิต 2. กระบวนการแยกเซลล์ออกจากโครงเลี้ยงเซลล์โดยไม่แยกโกรสแฟคเตอร์ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ออก 3.กระบวนการแยก ECM เพื่อนำมาทำเป็นอนุภาค ECM 4.ขั้นตอนการแปร

รูปพอลิเมอร์ที่เป็นคอลลาเจนให้เป็นเส้นใย และ 5.การเคลือบเส้นพอลิเมอร์กับอนุภาค ECM สำหรับใช้เป็นต้นแบบเพื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ

3) US patent no. 6790454

ในปีค.ศ.2004 Abdul Malak และคณะได้ทำการค้นพบโครงสร้างค้ำจุนที่ทำด้วยคอลลาเจนแบบใหม่ที่ใช้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ด้วยการผลิตวัสดุผสมที่ประกอบด้วยชั้นพอลิเมอร์ที่เป็นรูพรุนซึ่งปกคลุมด้วยชั้นเยื่อแผ่นคอลลาเจนที่ประกอบไปด้วยฟิล์มคอลลาเจน หรือโฟมคอลลาเจนที่สามารถรับแรงอัดได้สูง โดยที่ฟิล์มคอลลาเจนจะทำแห้งในอากาศหรือในแก๊ส ซึ่งอย่างน้อยที่สุดหนึ่งในชั้นคอลลาเจนทั้ง 2 ชั้นจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีชีวิตที่ได้จากแหล่งกำเนิดเซลล์ที่เป็นเด็กและเป็นผู้ใหญ่ ผลิตภัณฑ์วัสดุผสมนี้ถูกใช้เป็นโครงคอลลาเจนที่ใช้ในการผลิตผิวหนังเทียมที่ใช้ทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งจะมีผลต่อศักยภาพในการสร้างผิวหนังที่ถูกทำลายขึ้นมาใหม่ในการทดลองในสิ่งมีชีวิต

การอ้างสิทธิ์

การสร้างผลิตภัณฑ์ผิวหนังประกอบที่ผลิตจากคอลลาเจนที่ประกอบด้วยชั้นคอลลาเจนที่มีรูพรุนที่เตรียมได้จากการอัดโฟมคอลลาเจนที่ความดัน 50 บาร์ แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์และคอลลาเจนที่เลือกใช้เลือกจากกลุ่มของคอลลาเจนและ คอลลาเจนผสมที่ผสมด้วยเซลลูโลสอย่างน้อยหนึ่งชนิดคือ dextran, alginate, carrageenan, glycosaminoglycan และ chitosan ซึ่งจะมีการเชื่อมโยงพันธะทางเคมีด้วย diphenyl phosphorylaxide, aldehyde, glutaraldehyde, carbodihymide หรือ succinimide

4) US patent no. 6214338

ในปีค.ศ. 2001 Antanavich และคณะได้ค้นพบว่าพลาสมาเข้มข้นประกอบไปด้วยเกล็ดเลือด (platelet) และสารที่เกล็ดเลือดปล่อยออกมา ซึ่งก็คือไฟบริโนเจนที่มีความเข้มข้น 5-400 mg/ml นอกจากนั้นพลาสมาเข้มข้นยังประกอบไปด้วยน้ำ สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ โดยที่ไฟบริโนเจนในพลาสมาเข้มข้นนั้นจะไม่สลายตัวอย่างมีนัยสำคัญ

การอ้างสิทธิ์

พลาสมาเข้มข้นประกอบไปด้วยเกล็ดเลือด สารเคมีที่ปล่อยจากเกล็ดเลือดซึ่งก็คือไฟบริโนเจนที่มีความเข้มข้น 5-400 mg/ml พลาสมาเข้มข้นเตรียมได้จากเลือด (whole blood) โดยที่

platelet ในพลาสมาเข้มข้นจะมีความเข้มข้นอย่างน้อยเป็น 4/3 เท่าของ platelet จากพลาสมาธรรมดา นอกจากนี้พลาสมาเข้มข้นยังมีสารประกอบที่เป็น collagen fleece, hyaluronic acid, wound-healing factor, zinc ions ที่มีผลต่อการยับยั้งระยะเวลาในการเกิดลิ่มเลือด (coagulation) และขั้นตอนการผลิตพลาสมาเข้มข้น เริ่มจากการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกจากเลือดที่มีการเติมสารป้องกันการเกิดลิ่มเลือด (anticoagulated agent) เพื่อให้ได้แล้วจึงทำการตั้งน้ำออกจากพลาสมาจนได้พลาสมาเข้มข้น

5) US patent no. 7169610

ในปีค.ศ. 2007 Brown และคณะได้ค้นพบนิยามของสารอาหารปราศจากซีรัมที่เซลล์เย็บ เซลล์เส้นใย (fibroblast) โดยเฉพาะคอนโดโรไซต์ของข้อต่อกระดูก (articular chondrocytes) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้สารอาหารที่มีซีรัม สารอาหารที่ถูกนิยามประกอบไปด้วย platelet-derived growth factor (PDGF) และสารเคมีอื่นๆ และการค้นพบนี้ยังรวมไปถึงวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยการ incubate คอนโดโรไซต์ในสารอาหารที่ปราศจากซีรัมที่ได้ นิยามไว้ วิธีนี้ทำให้การยึดเกาะ (attachment) และเพิ่มจำนวน (proliferation) ของคอนโดโรไซต์ จากปริมาณต่ำให้เพิ่มขึ้นในขณะที่ยังคงรักษาความสามารถในการเปลี่ยนรูปร่าง (differentiation) ไว้

การอ้างสิทธิ์

1. ขั้นตอนแผ่ขยายและเพิ่มจำนวนของคอนโดโรไซต์ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการเพาะเลี้ยง คอนโดโรไซต์ในสารอาหารพื้นฐานที่มี PDGF และกรดไขมันอย่างน้อย 4 ชนิดซึ่งอยู่ในกลุ่มของ stearic acid, myristic acid, oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, arachidonic acid, linolenic acid, cholesterol, and alpha-tocopherol acetate.

2. สารอาหารปราศจากซีรัมที่ประกอบด้วยสารอาหารพื้นฐาน, PDGF, stearic acid, myristic acid, oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, arachidonic acid, linolenic acid, cholesterol, and alpha-tocopherol acetate.

3. PDGF ที่ใช้ในข้อ 2 จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1-1 ng/ml, 1-5 ng/ml, 5-10 ng/ml, 10 ng/ml, 10-15 ng/ml, 15-50 ng/ml และ 50-100 ng/ml

4. สารอาหารพื้นฐานในข้อ 2 ประกอบไปด้วย cDRF ซึ่งมี human serum albumin (HSA) ที่ได้จากพลาสมาของมนุษย์

6) US patent no. 7091015

ในปีค.ศ. 2006 Redl และคณะได้ค้นพบการยึดติดของเนื้อเยื่อ (Tissue adhesive) ที่มีไฟบริโนเจนเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน ซึ่งภายในบรรจุด้วยตัวยับยั้งอิลาสเตส (elastase inhibitor) การอ้างสิทธิ์

1. องค์ประกอบของการยึดติดเนื้อเยื่อคือผลของการรักษาขึ้นอยู่กับปริมาณของไฟบริโนเจน (ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์เพื่อเปรียบเทียบกับโครโอโปรซีพิเตท) และอีกริน (Eglin)
2. Tissue adhesive ในข้อ 1 เกี่ยวข้องกับโปรตีนจากมนุษย์ (human protein) ที่เตรียมจากเลือด, พลาสมา และ โครโอโปรซีพิเตท
3. Tissue adhesive ในข้อ 1 เกี่ยวข้องกับอัตราส่วนน้ำหนักของอีกรินต่อไฟบริโนเจนที่มีค่าจาก 1:100 จนถึง 1:150,000
4. Tissue adhesive ในข้อ 1 เกี่ยวข้องกับพลาสมิโนเจน (Plasminogen) อย่างน้อย 0.0001 mg/mg ของไฟบริโนเจน

7) US patent no. 7112342

ในปีค.ศ. 2006 Worden ค้นพบการปรับปรุงสารรักษาบาดแผลจากวุ้นเกล็ดเลือด (platelet gel wound healant) และวิธีการเตรียมและการใช้วุ้นเกล็ดเลือดสำหรับการรักษาบาดแผลที่ถูกเปิดออก การปรับปรุงสารรักษาบาดแผลประกอบไปด้วยผลของปริมาณโกรสแพคเตอร์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) สารแอนติ-ออกซิแดนซ์ (วิตามิน A หรือ C) หรือยาปฏิชีวนะ

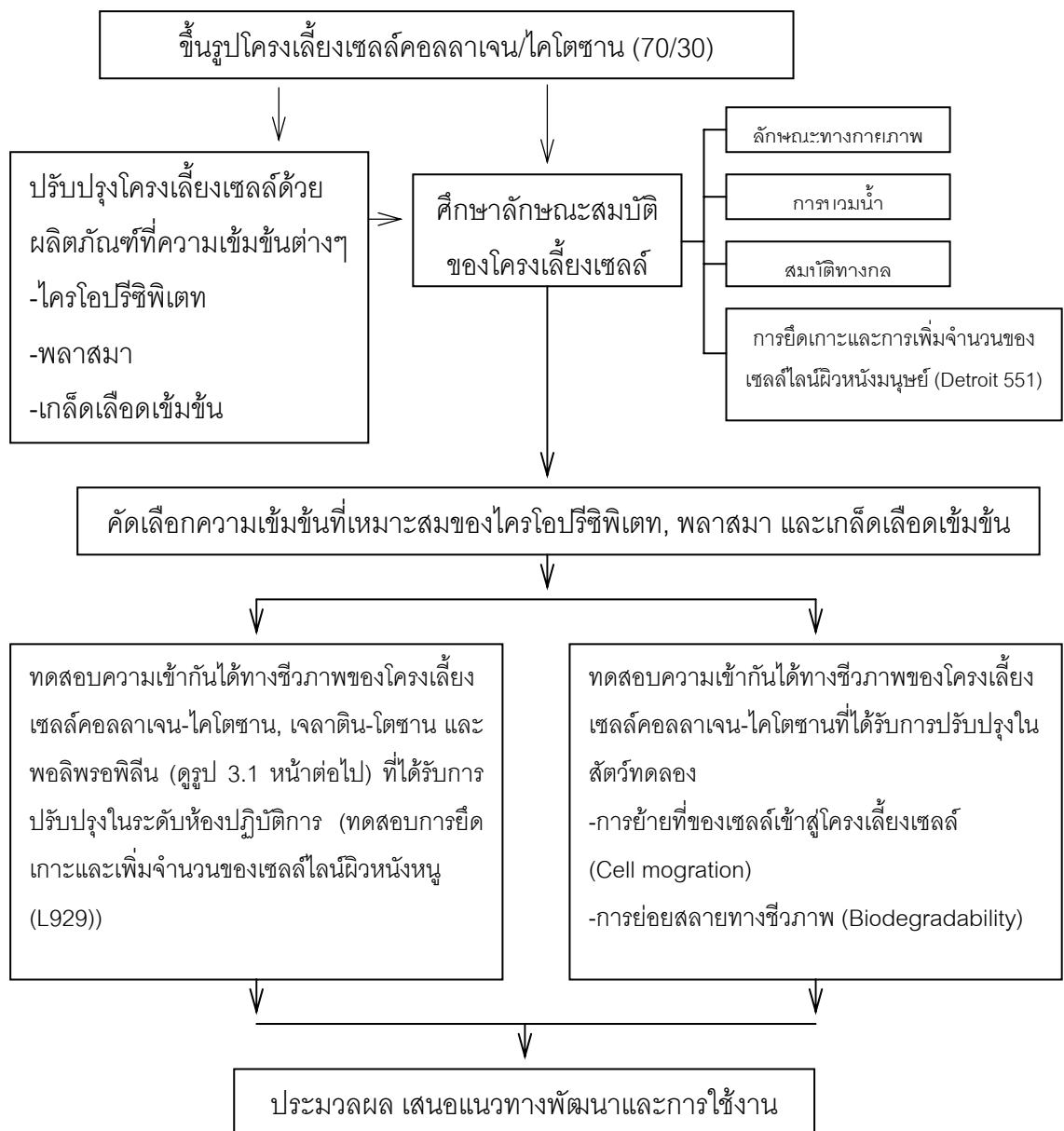
การอ้างสิทธิ์

1. วิธีการบำบัดบาดแผลในผู้ป่วยประกอบไปด้วยขั้นตอนในการรักษาที่มีผลเนื่องมาจากการใช้เกล็ดเลือดเข้มข้นที่ถูกกระตุ้นด้วยกรดแอสคอร์บิก ซึ่งมีค่าระหว่าง 20 mg และ 65 mg/ml ของเกล็ดเลือดเข้มข้น
2. วิธีการที่อ้างในข้อ 1 เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นที่มีผลมาจากตัวทำการ (agonist) ทั้งหมด
3. วิธีการที่อ้างในข้อ 2 เกี่ยวข้องกับตัวทำการที่เลือดมาจากทรอมบิน (thrombin), กอลลาเจน, ADP (adenosine diphosphate) และ อะซิติลโคลีน (acetylcholine :ACH)

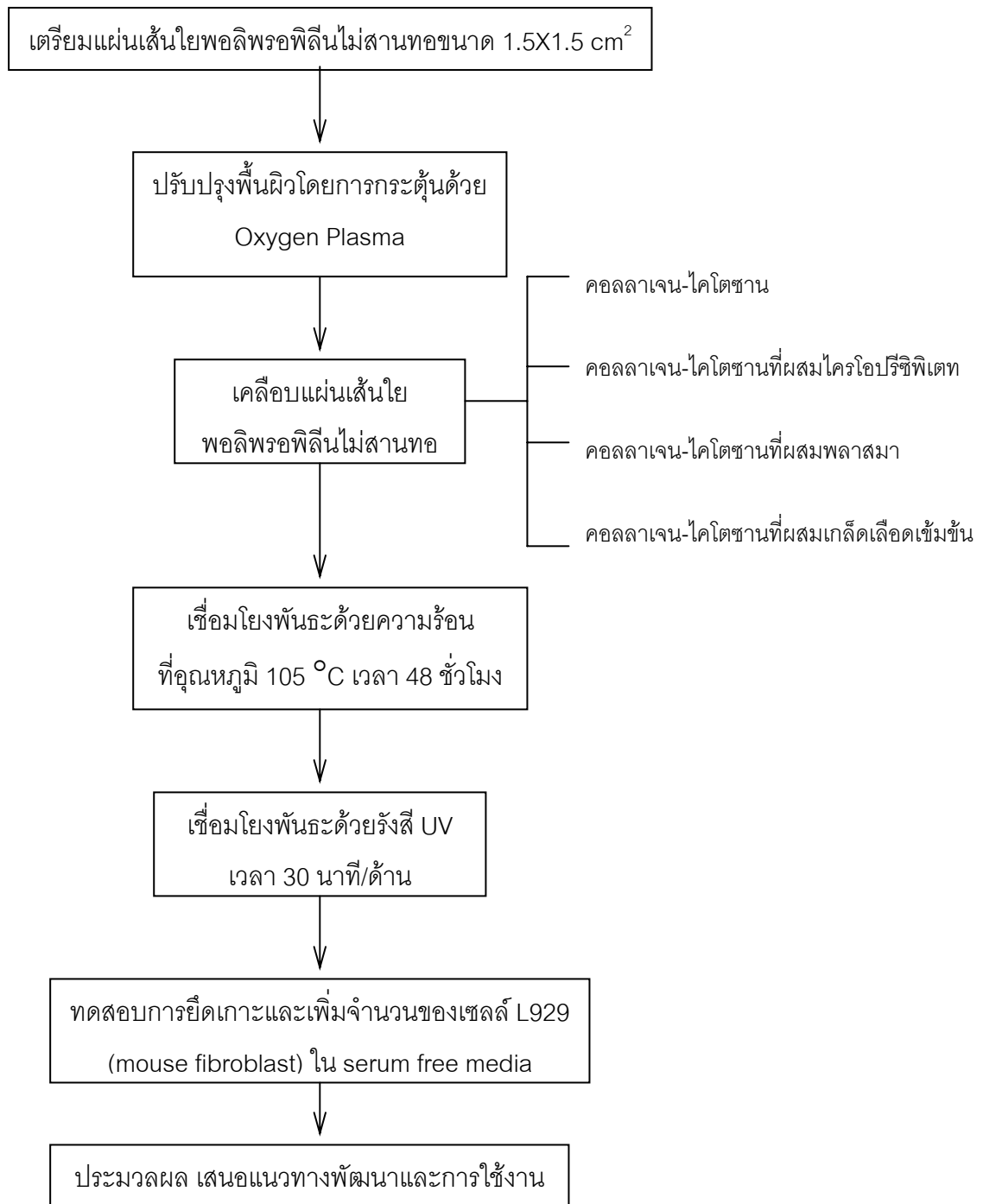
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

สรุปแผนการดำเนินการวิจัยดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงแผนการดำเนินการวิจัย



รูปที่ 3.1 (ต่อ) แสดงแผนการดำเนินการวิจัย

3.2 วัตถุประสงค์ สารเคมี และอุปกรณ์ในการวิจัย

3.2.1 สัตว์ทดลอง

หนูทดลองชนิด Wistar rat อายุ 4 – 5 สัปดาห์เพศเมีย น้ำหนักเฉลี่ย 30-40 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 หนูทดลองชนิด Wistar rat

ที่มา www.nalc.mahidol.ac.th/nalcwwwtha/rat.jpg

3.2.2 วัตถุประสงค์ และสารเคมี

- คอลลาเจนชนิด I จากบริษัท Nitta Gelatin Inc, Japan (Cat..No.060210)
- เจลาตินชนิด A, bloom 300 จากบริษัท Nitta Gelatin Inc, Japan (Cat.No.050803)
- โคโตซานมวลโมเลกุลสูง (1,450 kDa) จากบริษัท Fluka, Sigma-Aldrich, Japan (Cat.No. 48165)
- แผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ จากบริษัท Mitzui Hygiene Materials Thailand
- ไครโอปริซิพีเตทจากสภากาชาดไทย (Lot No. 49403303)
- พลาสมาจากสภากาชาดไทย (Lot No. 4806050)
- เกล็ดเลือดเข้มข้นจากสภากาชาดไทย (Lot No. 49402104)
- น้ำกลั่น (double-distilled water)
- น้ำปราศจากไอออน (deionization water)
- Sodium Phosphate monobasic จากบริษัท Antibioticos, Spain
- Sodium Phosphate dibasic จากบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany
- Sodium hydrogen carbonates (NaHCO_3) จากบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany
- Human skin fibroblasts (Detroit 551)

- Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with EDTA·Na, Gibco BRL, Canada)
- MTT (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (USB corporation, Cleveland, OH, USA)
- Dulbecco's modified eagle medium, DMEM (10%medium + L-glutamine + AB, Hyclone, Utah, USA)
- Ethanol (99.7-100%, VWR International Ltd., Poole Dorset, United Kingdom)
- Dimethylsulfoxide, DMSO จากบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany
- Fetal Bovine Serum (FBS) จากบริษัท Invitrogen Corp., Paisley, UK

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digit balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
2. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (5-digit balance) รุ่น AE 240 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
3. แท่งกวนแม่เหล็กและแผ่นให้ความร้อน (Magnetic stirrer/hot plate) รุ่น RCT Basic ของบริษัท Ika labortechnik, Germany
4. เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave) รุ่น HVE 25/50 ของบริษัท Hirayama, Japan
5. ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum drying oven and pump) รุ่น VD23 ของ บริษัท Binder ประเทศเยอรมัน
6. เครื่องทำความเย็น -40°C รุ่น Heto, PowerDry LL3000 ประเทศ อเมริกา
7. Lyophilizer รุ่น Heto, PowerDry LL3000 ประเทศ อเมริกา
8. Fine coat (JFC-1100E, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
9. Scanning Electron Microscopy (JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
10. Universal Testing Machine (No. 5567, Instron, USA)
11. Laminar Flow (Safe/Maxi Safe 2010,Holten, USA)
12. CO₂ incubator (New Brunswick Scientific, Innova CO170, USA)
13. Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)

14. Polystyrene tissue culture discs (NUNC, Denmark)
15. 24-well and 48-well polystyrene tissue culture plates (NUNC, Denmark)
16. Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
17. กระจกใสไม่มีขุ่น
18. โถดูดความชื้น (Desiccators)
19. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
20. กล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast microscope)

3.3 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์

3.3.1.1 ตรวจสอบปริมาณโปรตีนรวมในโคริโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น

หาปริมาณโปรตีนรวมในสารปรับปรุงโดยใช้วิธี Lowry (ภาคผนวก ก.) ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 3.1 เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะการเก็บรักษา การใช้งาน และองค์ประกอบแตกต่างกันจึงมีขั้นตอนการเตรียมผลิตภัณฑ์ก่อนการใช้งานแตกต่างกันดังนี้คือ

-โคริโอปริซิพิเตท: ละลายโคริโอปริซิพิเตทแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 °C (ชาญวิทย์ ตันดีพิพัฒน์, 2544)

-พลาสมา: อุ่นพลาสมาที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที (inactivated) (Soltis, 1978) เพื่อเป็นการยับยั้งหมู่ IgG

-เกล็ดเลือดเข้มข้น: อุ่นเกล็ดเลือดเข้มข้นที่อุณหภูมิ 37 °C (ชาญวิทย์ ตันดีพิพัฒน์, 2544)

3.3.1.2 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์




1) โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน

1.1) โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโคริโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์

-เตรียมสารละลายคอลลาเจน : นำคอลลาเจนชนิด I ในกรดไฮโดรคลอริก จากบริษัท Nitta Gelatin มาทำการระเหิดน้ำออก (lyophilize) แล้วจึงนำคอลลาเจนแห้งที่ได้มาละลายในสารละลายอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก) โดยการปั่นกวนที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-เตรียมสารละลายไคโตซาน : เตรียมสารละลายไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (1,450 kDa) ความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก) ในสารละลายอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

ตาราง 3.1 แสดงสมบัติของผลิตภัณฑ์ไครโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์จากสภากาชาดไทย

ผลิตภัณฑ์	ไครโอปริซิพิเตท	พลาสมา	เกล็ดเลือดเข้มข้น
รูปถ่ายผลิตภัณฑ์			
ปริมาตรต่อยูนิต (ml)	~3	200	50-60
องค์ประกอบหลัก	Factor VIII \geq 70 IU/unit, fibrinogen \geq 140 mg/unit	Blood coagulation factor ครบทุกชนิด	platelet \geq 5.5×10^{10} platelets/unit
การทดสอบ	Negative Syphilis , HBsAg, Anti-HCV, Anti- HIV, HIV-RNA, HCV-RNA	เช่นเดียวกับ ไครโอปริซิพิเตท	เช่นเดียวกับ ไครโอปริซิพิเตท
ความเข้มข้นโปรตีน ทั้งหมด*(mg/ml)	122.83 mg/ml	76.19 mg/ml	74.33 mg/ml
การเตรียมผลิตภัณฑ์ ก่อนการใช้งาน	ละลายไครโอปริซิพิเตทแช่ แข็งที่อุณหภูมิ 37 °C	อุ่นพลาสมาที่ อุณหภูมิ 56 °C เป็น เวลา 30 นาที	อุ่นเกล็ดเลือด เข้มข้นที่อุณหภูมิ 37 °C

หมายเหตุ *ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมด (Total protein) คัดเทียบจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (ภาคผนวก ก.) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

-ผสมสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซานด้วยอัตราส่วน 70:30 โดยน้ำหนัก (Tangsadthakun และคณะ, 2006) และผลิตภัณฑ์ไครโอพรีซิพิเตท พลาสมาและเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ที่ผ่านการตรวจสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดซึ่งแสดงได้ในตารางที่ 3.1 ด้วยความเข้มข้นโปรตีนต่างๆ ตามที่แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดของไครโอพรีซิพิเตท พลาสมาและเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน

รหัสโครงเลี้ยงเซลล์	แหล่งที่มาของโปรตีนที่ใช้ปรับปรุง	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ปรับปรุง* (ไมโครกรัมโปรตีน/โครงเลี้ยงเซลล์)	น้ำหนักแห้งรวม (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์สารปรับปรุงต่อน้ำหนักแห้ง (%wt/wt)
CCH	ไม่มีการปรับปรุง	-	4.70±0.02	0.00
C100	ไครโอพรีซิพิเตท	100	4.83±0.05	2.72±1.90
C500	ไครโอพรีซิพิเตท	500	5.45±0.09	13.87±1.32
C1000	ไครโอพรีซิพิเตท	1000	5.94±0.11	20.71±3.92
H100	พลาสมา	100	4.84±0.09	2.89±1.88
H500	พลาสมา	500	5.63±0.11	16.29±3.88
H1000	พลาสมา	1000	5.75±0.10	18.18±2.72
P100	เกล็ดเลือดเข้มข้น	100	4.71±0.04	2.29±2.09
P500	เกล็ดเลือดเข้มข้น	500	5.23±0.09	10.03±3.94
P1000	เกล็ดเลือดเข้มข้น	1000	5.86±0.10	19.94±1.63

หมายเหตุ * ปริมาณโปรตีนทั้งหมดคิดเทียบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Lowry

เปอร์เซ็นต์สารปรับปรุงคำนวณได้จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์สารปรับปรุง(\% wt/wt)} = \frac{W - Wc}{W} \times 100$$

โดยที่ W คือ น้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่เติมสารปรับปรุง

Wc คือ น้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ไม่เติมสารปรับปรุง

-ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ : ปั่นกวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำให้สารละลายที่ผสมแล้วไม่มีฟองด้วยปั๊มสุญญากาศ หลังจากนั้นจึงดูสารละลายที่ไม่มี

ฟองใส่ลงในหลุมของจานเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม (24-well culture plates) ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปทำแห้งด้วยการระเหิดน้ำออกด้วยความดันที่อุณหภูมิ -40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วย Lyophilizer (HetoPowerDry LL3000, USA) สุดท้ายจึงนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยการให้ความร้อน (Dehydrothermal crosslink) ที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยใช้เครื่อง Vacuum oven Model , Binder รุ่น VD 23 ประเทศอเมริกา

1.2) โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ไม่มีการปรับปรุง

-ดำเนินการเช่นเดียวกับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยไครโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ในหัวข้อ 1.1) โดยยกเว้นขั้นตอนการผสมสารปรับปรุงทั้ง 3 ชนิด

2) โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่ไม่ได้ปรับปรุง และ ปรับปรุงคุณภาพด้วยการผสมไครโอปริซิพิเตท, พลาสมา, เกล็ดเลือดเข้มข้น

จากลักษณะเด่นของเจลาตินที่มีสมบัติคล้ายคลึงกับคอลลาเจน แต่มีราคาถูก และสามารถผลิตได้ในเมืองไทย จึงนำไปสู่การพัฒนาผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบหลัก อีกทั้งเจลาตินยังมีสมบัติในการควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีประจุตรงข้าม ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ใช้ควบคุมการปลดปล่อยสารโปรตีนจากองค์ประกอบของเลือดที่ผสมในโครงเลี้ยงเซลล์

-การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน ดำเนินการเช่นเดียวกับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานในหัวข้อ 1) แต่เปลี่ยนสารละลายคอลลาเจนเข้มข้น 0.5% เป็นสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก) ในสารละลายอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ซึ่งปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อน (Dehydrothermal crosslink) ที่อุณหภูมิ 140°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดจากสารปรับปรุงในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงความเข้มของโปรตีนทั้งหมดของไครโอปริซิพิเตท พลาสมาและเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน

รหัสโครงเลี้ยงเซลล์	แหล่งที่มาของโปรตีนที่ใช้ปรับปรุง	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ปรับปรุง* (ไมโครกรัมโปรตีน/โครงเลี้ยงเซลล์)	น้ำหนักแห้งรวม (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์สารปรับปรุงต่อน้ำหนักแห้ง (%wt/wt)
GCH	ไม่มีการปรับปรุง	-	4.73±0.08	0.00
GC1000	ไครโอปริซิพิเตท	1000	6.27±0.04	22.86±0.53
GH500	พลาสมา	500	5.80±0.10	16.61±1.63
GP500	เกล็ดเลือดเข้มข้น	500	5.98±0.10	19.09±1.32

หมายเหตุ * ปริมาณโปรตีนทั้งหมดคิดเทียบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Lowry

เปอร์เซ็นต์สารปรับปรุงคำนวณได้จากน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน

3) การเตรียมแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ (non-woven polypropylene fabric)

จากข้อจำกัดความเป็นวัสดุชีวภาพ (Biomaterial) ของพอลิพรอพิลีนที่มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) สูง เนื่องจากลักษณะโครงสร้างโมเลกุลที่ประกอบไปด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน จึงเป็นเหตุผลของการปรับปรุงพื้นผิวของเส้นใยเพื่อเพิ่มความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ของแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอด้วยการเคลือบสารละลายที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ขั้นตอนการเตรียมแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอออกเป็นการปรับปรุงพื้นผิวของเส้นใยและการเคลือบแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโตซาน

-การปรับปรุงพื้นผิว (Surface modifying)

ตัดแผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอให้มีขนาด 1.5X1.5 ตารางเซนติเมตรแล้วทำการกระตุ้นด้วยพลาสมาจากก๊าซออกซิเจน โดยใช้เครื่องกำเนิดพลาสมา (Plasma regenerator) แบบที่ด้าพินซ์ (Theta pitch) [Kamsing, 2005] ภายใต้สภาวะความดัน 10 ปาสคาล ความต่างศักย์ 24 กิโลโวลต์ พลังงาน 48 กิโลจูล โดยทำการกระตุ้นแบบพัลส์ (pulse) 1 ครั้ง

-การเคลือบแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ (non woven polypropylene fabric coating)

แช่แผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่กระตุ้นด้วยพลาสติกในสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซาน และสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยไครโอปริซิพิเตท, พลาสติก และเกล็ดเลือดเข้มข้น ซึ่งมีความเข้มข้นสารละลายทั้งหมดในสารละลายกรดอะซิติกเป็น 0.05% โดยน้ำหนัก หลังจากแช่แผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอในสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำแผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอไปตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิ 105 °C ภายใต้สภาวะสูญญากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเชื่อมโยงพันธะเพิ่มเติม (further crosslink) ด้วยรังสี UV เป็นเวลาด้านละ 30 นาที โดยที่รหัสของแผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอแสดงได้ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงรหัสของแผ่นเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสติก แล้วเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซานที่ผสมผลิตภัณฑ์ไครโอปริซิพิเตท พลาสติก และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์

รหัสแผ่นใยพอลิพรอพิลีน	แหล่งที่มาของโปรตีนที่ผสมในสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซาน	ความเข้มข้นโปรตีน*ในสารละลายที่เคลือบบนแผ่นใย (ไม่โครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรของสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซาน)
PP-CCH	ไม่มีการปรับปรุง	0
PP-C1000	ไครโอปริซิพิเตท	1000
PP-H500	พลาสติก	500
PP-P500	เกล็ดเลือดเข้มข้น	500

หมายเหตุ * ปริมาณโปรตีนทั้งหมดคิดเทียบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Lowry

3.3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

การทดสอบสมบัติทางกายภาพ

- ลักษณะพื้นผิวโดยรวม (Morphology)

พิจารณาลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์โดยรวมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM) ด้วยเครื่อง Joel JSM 5400 ที่มีความ

ต่างศักย์ 12-15 kV ทำการเคลือบทองโคโรนเล็ยงเซลล์ด้วย Ion sputtering device, JFC 1100 แล้วจึงพิจารณาลักษณะพื้นผิวโคโรนเล็ยงเซลล์ตามแนวแกนตั้ง

- สมบัติการบวมน้ำ (Swelling properties)

การทดสอบการบวมน้ำของโคโรนเล็ยงเซลล์โดยคำนวณได้จากผลต่างของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักเปียกของโคโรนเล็ยงเซลล์ น้ำหนักเปียกของโคโรนเล็ยงเซลล์ทำได้โดยแช่โคโรนเล็ยงเซลล์ในสารละลาย PBS buffer ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นซับโคโรนเล็ยงเซลล์ทั้งสองด้านด้านละ 10 วินาที ด้วยกระดาษไม่มีขุย (Kimwipe) และชั่งน้ำหนักของโคโรนเล็ยงเซลล์ทันทีได้เป็นค่าน้ำหนักเปียกของโคโรนเล็ยงเซลล์ ซึ่งสามารถคำนวณ % swelling ได้จากสมการ

$$\% \text{ swelling} = \frac{W_{so} - W_o}{W_o} \times 100$$

โดย W_{so} และ W_o คือน้ำหนักของโคโรนเล็ยงเซลล์หลังจากที่ถูกดูดซับน้ำและน้ำหนักเริ่มต้นตามลำดับ

การทดสอบสมบัติทางกล

- ความต้านทานต่อแรงกด (Compressive modulus)

- ความต้านทานต่อแรงกดของโคโรนเล็ยงเซลล์แบบแห้ง (Dry compressive modulus)

ทำการทดสอบสมบัติทางกลของโคโรนเล็ยงเซลล์แห้งโดยวัดความต้านทานต่อแรงกด (compression test) ด้วยการคำนวณค่า compressive modulus ซึ่งเป็นค่าความแข็งแรงของโคโรนเล็ยงเซลล์โดยการกดโคโรนเล็ยงเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และหนา 3 มิลลิเมตร ด้วย universal testing machine (INSTRON No.5567 , NY, USA) ที่ constant tensile deformation rate (0.5 มิลลิเมตร/นาที) ในสภาพที่แห้งที่ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งค่า compressive modulus สามารถคำนวณได้จากค่าความชันของกราฟระหว่างความเค้น - ความเครียด (stress-strain) ในช่วงความเครียด 5 - 35% ทำการรายงานผลด้วยค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 6 ตัวอย่าง

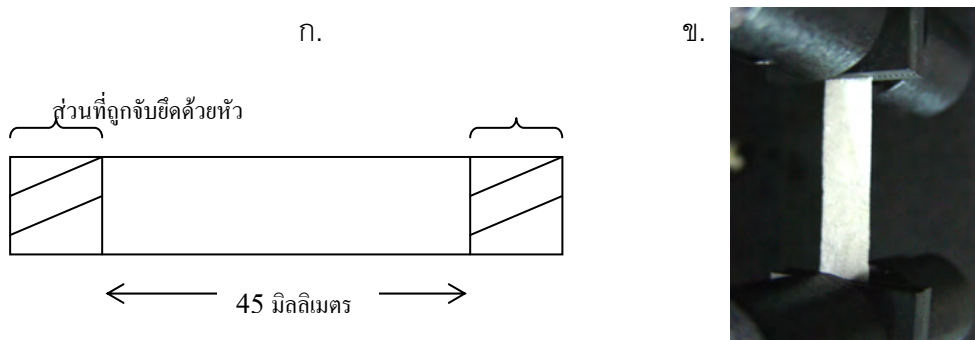
- ความต้านทานต่อแรงกดของโคโรนเล็ยงเซลล์แบบเปียก (Wet compressive modulus)

ทำการทดสอบสมบัติทางกลของโคโรนเล็ยงเซลล์เปียกที่แช่ในสารละลาย PBS buffer ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดขนาดโคโรนเล็ยงเซลล์เปียก

แล้ววัดความต้านทานต่อแรงกดเช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบแห้ง ทำการรายงานผลด้วยค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 6 ตัวอย่าง

-ความต้านทานต่อแรงดึง (Tensile stress) (Daamen และคณะ, 2003)

ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ในภาชนะมีเนื้อเยื่อขนาด 60 X 100 มิลลิเมตร ให้มีความหนาของโครงเลี้ยงเซลล์ 3 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิค Lyophilisation เช่นเดียวกับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ในข้อ 3.3.1 แล้วจึงใช้ใบมีดโกนตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีขนาด กว้าง 10 มิลลิเมตร ยาว 60 มิลลิเมตร และหนา 3 มิลลิเมตร แล้วจึงทำการวัดค่าแรงดึงด้วยเครื่อง universal testing machine (INSTRON No.5567 , NY, USA) ที่ constant tensile deformation rate (0.5 มิลลิเมตร/นาที) ในสภาพที่แห้งที่ 25 องศาเซลเซียส โดยวัดขนาดความยาวชิ้นงานที่ถูกจับยึดที่หัวยึดให้มีความยาว 45 มิลลิเมตร (รูป 3.3) ทำการรายงานผลด้วยค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 5 ตัวอย่าง



รูป 3.3 แสดงแผนภาพตัวอย่างขนาดชิ้นงานที่ใช้ทดสอบความต้านทานต่อการดึง (ก) และภาพโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (กลุ่มควบคุม) ที่ถูกจับยึดด้วยหัวจับขณะทำการวัดค่าความต้านทานต่อแรงดึง (ข)

การทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

-การเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biocompatibility)

(Mosmann, 1983)

-การเพาะเลี้ยงเซลล์ Detroit 551 (human fibroblast cell) และ L929 (mouse fibroblast)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Detroit 551 หรือ L929 ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร (NUNC, Roskilde, Denmark) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's modified eagle

medium (DMEM) ที่ประกอบไปด้วย 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin-B โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่มีสภาวะความดันบรรยากาศที่มี 5% CO₂ และ 95% air อุณหภูมิ 37 °C

-การทดสอบการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell adhesion and proliferation)

ทำการฆ่าเชื้อ (sterilized) โครงเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในจานเพาะเซลล์ขนาด 24 หลุมด้วยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในเอทานอลเข้มข้น 70% เป็นเวลา 30 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (autoclave) ทำการเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนใหม่ 3 ครั้ง แต่ครั้งแช่ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นแช่ด้วย PBS ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากที่ได้ดู PBS ออกจากหลุมแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตรหลุมละ 350 ไมโครลิตร ก่อนทำการใส่เซลล์จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่เวลา 5 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์การยึดเกาะของเซลล์ และที่เวลา 3, 6 และ 9 วัน สำหรับการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วย MTT assay (Mosmann, 1983) โดยย้อมเอนไซม์ด้วย 0.5% 3-(4-5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,(-diphenyltetrazolium bromide :MTT solution) อบต่อ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้ง และละลายผลึก formazan ด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) ผสมกับ glycine buffer (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl adjusted to pH 10.5 with 1 M NaOH) ในอัตราส่วน 9:1 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

-การเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง (*in vivo* biocompatibility)

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) โดยการปลูกถ่ายผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์ลงในสัตว์ทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้ามาที่ผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์ (cells infiltration), ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) และ การต่อต้านทางภูมิคุ้มกัน (Immunological response) ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

- วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

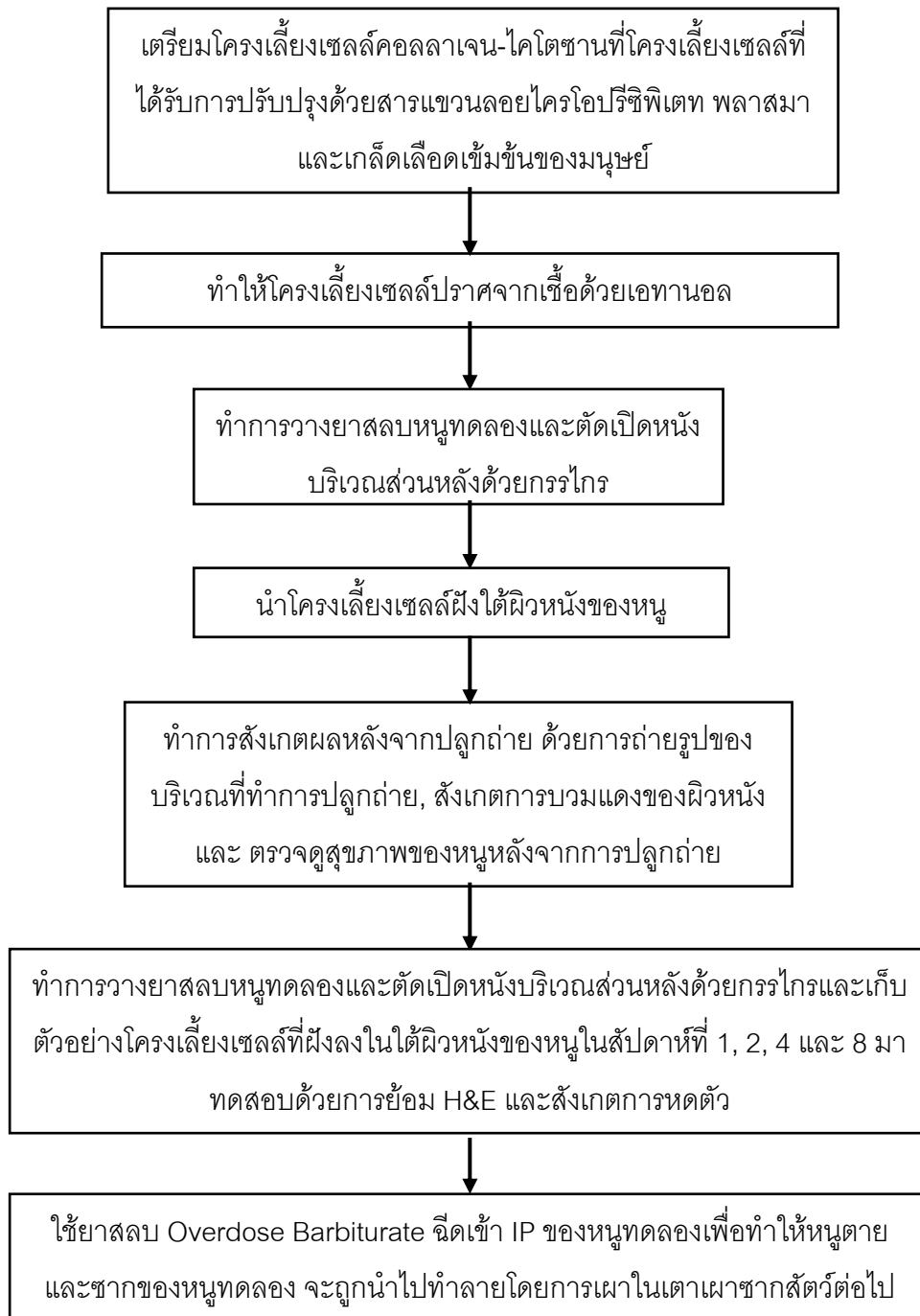
(1) การทดลองแบ่งออกเป็น 4 โมเดล ในหนูทดลองสองสายพันธุ์คือสายพันธุ์ Wistar rat และ Nude mice bulk C/nu โดยที่แต่ละโมเดลในหนูทดลองสายพันธุ์ Wistar rat จะทำการศึกษา 4 ช่วงเวลาคือ สัปดาห์ที่ 1, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ในแต่ละช่วงเวลาจะใช้หนูในการปลูกถ่ายจำนวน 3 ตัว (n=3) ดังนั้นในการทดลอง 4 โมเดล ใช้หนูพันธุ์วิสตา (Wistar rat) จำนวน 12 ตัว ส่วนโมเดลที่ทำการทดลองในหนูสายพันธุ์ Nude mice bulk C/nu ทำการศึกษา 3 ช่วงเวลาคือ สัปดาห์ที่ 1, 2, และ 4 สัปดาห์ ในแต่ละช่วงเวลาใช้หนูในการปลูกถ่ายจำนวน 6 ตัว (n=3) ดังนั้นในการทดลอง 4 โมเดล ใช้หนูพันธุ์วิสตา (Wistar rat) จำนวน 18 ตัว และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักซึ่งได้รับการปรับปรุงด้วยผลิตภัณฑ์โครโอพริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร หนา 3-5 มิลลิเมตร จำนวนชนิดละ 18 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา (n=3) ของแต่ละโมเดลถูกนำไปย้อมด้วยเทคนิค Hematoxylin and Erosin และ วัดขนาดการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์

-ในการทดลองนี้ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นสารละลายคอลลาเจน-โคโตซาน (70/30) 1% โดยน้ำหนัก เพื่อลดอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ภายในสัตว์ทดลอง โดยมีขั้นตอนการผลิตเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.1.2 ข้อ 1) แต่ทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายคอลลาเจนและโคโตซานให้มีความเข้มข้นเป็น 1% โดยน้ำหนัก

(2) หนูทดลองพันธุ์ Wistar (outbred) เพศเมีย น้ำหนักประมาณ 30-40 กรัม อายุ 3-5 สัปดาห์จำนวน 12 ตัว และหนูทดลองพันธุ์ Nude mice bulk C เพศเมีย น้ำหนักประมาณ 15-20 กรัม อายุ 6-8 สัปดาห์จำนวน 18 ตัว ซึ่งสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ซึ่งพิจารณาการใช้สัตว์ทดลองโดยเน้นในเรื่อง Immunological response, Cell infiltration into scaffold และ biodegradability สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงตามแนวทางปฏิบัติของ Home office guidelines on the scientific use of animal (Scientific procedures) Act 1986 กล่าวคือ หนูถูกเลี้ยงในห้องควบคุมเชื้อที่ภาควิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ 25 +/- 3 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 60 +/- 90 % วงจรการให้แสง 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด มีการถ่ายเทอากาศเพียงพอ มีการดูแลให้อาหารและน้ำ ในระหว่างทำการทดลองหนูถูกเลี้ยงให้อยู่แยก 1 ตัวต่อ 1 กรง

-วิธีการทดลอง (สรุปได้ตั้งแผนผังในรูปที่ 3.4)

แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพสามารถสรุปได้ดังนี้



รูปที่ 3.4 แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง

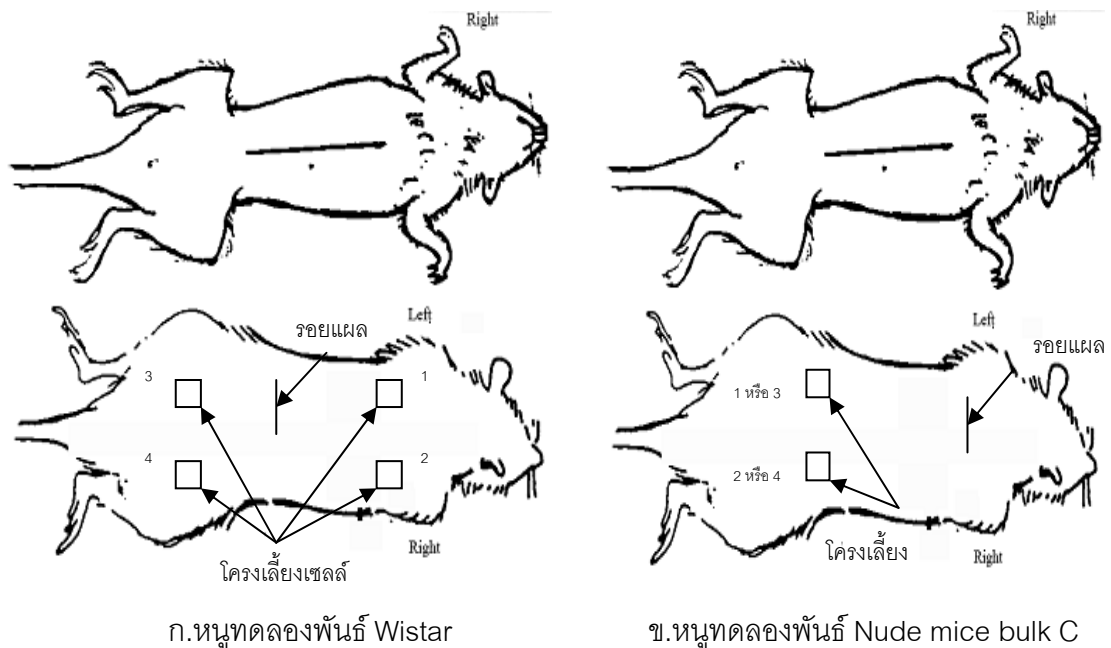
(1) ทำการวางยาสลบหนูทดลองพันธุ์ Wistar โดยวิธีฉีด Barbiturate (Pentobarbital) เข้าที่ช่องท้องอย่างช้าๆ ด้วยปริมาณ 60 มิลลิกรัม/น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม สำหรับหนูพันธุ์ Nude mice bulk C จะทำการวางยาสลบด้วยการฉีด Keptamine/Xylacine ด้วยปริมาณ Keptamine 80 มิลลิกรัม/น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม และ Xylacine 16 มิลลิกรัม/น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม โดยทำการเดินยาอย่างช้าๆ และตรวจดูการตอบสนองของสัตว์โดยดูจากการกระพริบตาเมื่อใช้นิ้วเคาะที่หัวถ้าสัตว์กระพริบตาแสดงว่ายังไม่สลบ แต่ถ้าหยุดกระพริบตาแสดงว่าสลบให้หยุดเดินยา

(2) หลังจากที่หนูสลบแล้ว โคนขนบริเวณส่วนหลังที่มีลักษณะโค้งเป็นสัน (dorsa) ของหนูพันธุ์ Wistar ด้วยปัตตาเลี่ยน ทำการฆ่าเชื้อด้วยเบต้าดีน และตัดเปิดหนังบริเวณนั้นด้วยกรรไกรให้มีความยาวของแผลประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้คีมคีบทำโพรง (pocket) ได้ผิวหนังบริเวณหลังของหนู นำโครงเลี้ยงเซลล์ฝังใต้ผิวหนังของหนูโดยฝังให้ห่างจากกลางหลังที่ผ่าเพื่อป้องกันผลจากการอักเสบต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าสู่ชั้นโครงเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเย็บปิดแผลด้วยด้ายเย็บแผล และทำความสะอาดแผลโดยไม่ต้องปิดแผล สำหรับหนูพันธุ์ Nude mice bulk/C ไม่ต้องโกนขนเนื่องจากหนุสายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีขนจึงสามารถตัดเปิดหนังเพื่อทำโพรงและฝังชิ้นงานเช่นเดียวกับหนูพันธุ์ Wistar แต่จำนวนชิ้นงานที่ฝังในหนูพันธุ์ Nude mice bulk/C จะมีปริมาณน้อยกว่าจำนวนชิ้นงานที่ฝังในหนูพันธุ์ Wistar เนื่องจากหนุสายพันธุ์ Nude mice bulk/C มีขนาดเล็ก ดังแสดงในแผนภาพในรูปที่ 3.5

(3) ทำการสังเกตผลหลังจากปลูกถ่าย ด้วยการถ่ายรูปของบริเวณที่ทำกรปลูกถ่าย, สังเกตการบวมแดงของผิวหนัง และ ตรวจดูสุขภาพของหนูหลังจากการปลูกถ่าย ทำการเก็บตัวอย่างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ฝังลงในใต้ผิวหนังของหนูในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4 และ 8 โดยก่อนการเก็บตัวอย่างต้องทำการวางยาสลบหนูทดลองโดยใช้วิธีการดังที่กล่าวไว้ในข้อที่ 1 และทำการถ่ายภาพชิ้นตัวอย่างหลังการปลูกถ่าย ณ เวลาต่างๆ

(4) นำตัวอย่างที่ได้มาย้อมด้วยเทคนิค Hematoxylin and Erosin (H&E) เพื่อดูผล cell infiltration และวัดขนาดของแต่ละตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลา 1, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ เพื่อวัดขนาดการหดตัวของตัวอย่าง

(5) เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง หนูที่ทำการทดลองถูกทำให้ตายโดยให้มีความทรมานน้อยที่สุดโดยการให้ยาสลบ overdose Barbiturate (Pentobarbital) ฉีดเข้า IP ของหนูทดลองเพื่อทำให้หนูตาย และซากของหนูทดลอง ถูกนำไปทำลายโดยการเผาในเตาเผาซากสัตว์ต่อไป



1. CCH โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน
2. C1000 โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยไครโอปริซิพิเตท
3. H500 โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน ที่ถูกปรับปรุงด้วยพลาสมา
4. P500 โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้น

รูปที่ 3.5 แผนภาพแสดงการฝังโครงเลี้ยงเซลล์บนหลังสัตว์ทดลอง

หมายเหตุ ในงานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติให้มีการทดลองในสัตว์ทดลองจากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ครั้งที่ 8/2550 โดยฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาคผนวก จ)

-การตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยการย้อมสี

ทำการย้อมโดยใช้การย้อมแบบ Hematoxylin and Erosin (H&E) ซึ่งเป็นเทคนิคในการย้อมสีเซลล์โดยทั่วไป โดยติดสีแดงบริเวณที่เป็น ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) สีน้ำเงินที่บริเวณนิวเคลียส และติดสีชมพูบนเทาที่เมตริกซ์ของเนื้อเยื่อ (Young and Heath, 2000)

3.3.3 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม ด้วยการตรวจสอบแบบที (t-test) ที่มีตัวแปรเป็นอิสระต่อกัน ซึ่งคำนวณโดยใช้โปรแกรม Minitab system for Windows (version 14, USA) ที่มีค่า $P < 0.05$ เป็นค่าที่ใช้พิจารณาความมีนัยสำคัญ

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเคมี ตึกอาคารอนุสาสน์ยันตรกรรม ชั้น 5 ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ และ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ชั้น 9 ตึก อ.ป.ร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องสัตว์ทดลอง อาคารสิริ ชั้น 4 ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

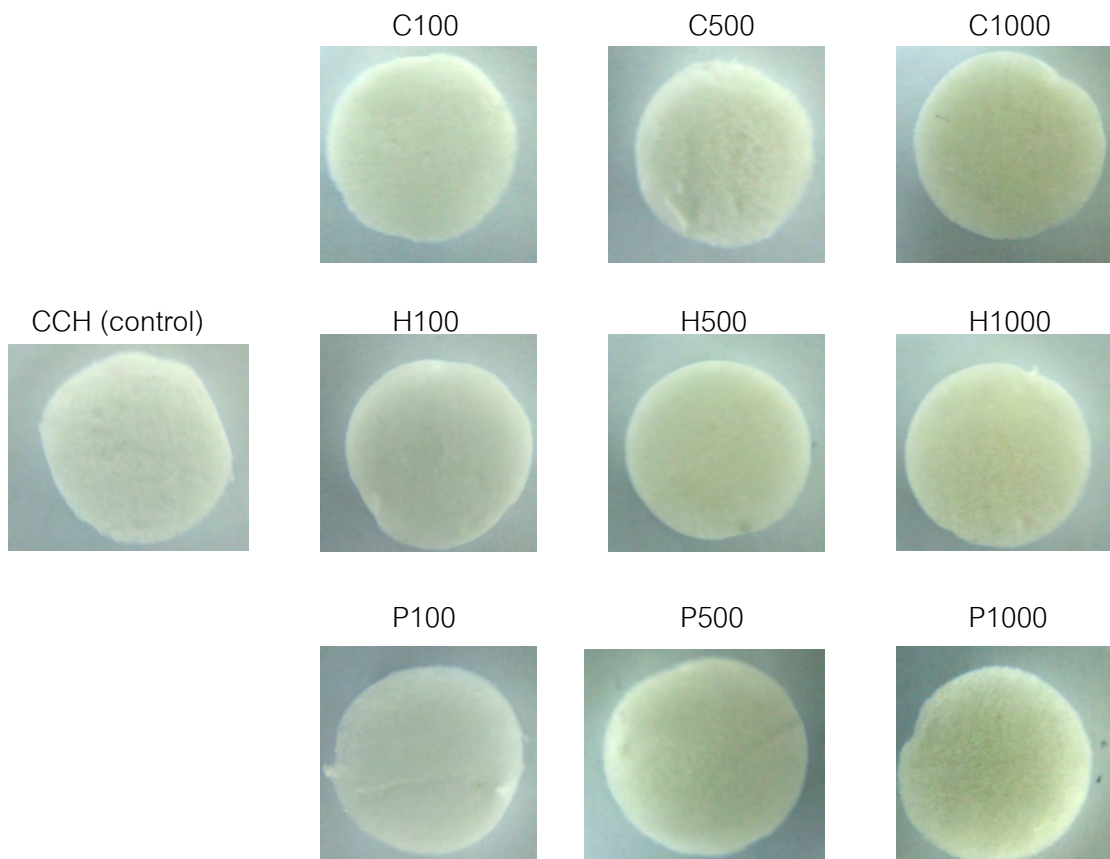
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

4.1.1 ลักษณะสมบัติทางกายภาพ (Physical properties)

ลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้หลังการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนมีสีเหลืองนวล โดยที่ลักษณะของสีโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยการผสมสารปรับปรุงลงในสารละลายที่ใช้ทำโครงเลี้ยงเซลล์มีสีเข้มกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้รับการปรับปรุง ความเข้มของสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนจากผลิตภัณฑ์โครีโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นที่ใช้ปรับปรุง และสีโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของสารปรับปรุงเท่ากันแต่ใช้สารปรับปรุงต่างชนิดกันมีความเข้มของสีใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 รูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการปรับปรุง: กลุ่มควบคุม (CCH) และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยโครีโอปริซิพิเตท (C100, C500, C1000) พลาสมา (H100, H500, H1000) และเกล็ดเลือดเข้มข้น (P100, P500, P1000)

ตาราง 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง ความหนา และเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-โคโตซาน, ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารปรับปรุงในโครงเลี้ยงเซลล์ และขนาดของรูพรุน

รหัสโครงเลี้ยงเซลล์	ความหนา (มิลลิเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ปริมาตรโครงเลี้ยงเซลล์ (มิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	ขนาดรูพรุน (ไมโครเมตร)
CCH	3.41±0.02	13.00±0.00	0.45±0.00	4.70±0.02	90.54±27.84
C100	3.07±0.03	13.00±0.12	0.41±0.02 †	4.83±0.05	86.65±30.40
C500	3.50±0.00	13.50±0.00	0.50±0.00 †	5.45±0.09	116.21±38.44
C1000	4.14±0.10	14.00±0.15	0.64±0.05 †	5.94±0.11	92.99±30.20
H100	3.50±0.00	13.50±0.00	0.50±0.00 †	4.84±0.09	174.16±53.21
H500	3.96±0.09	14.00±0.09	0.61±0.00 †	5.63±0.11	138.84±55.39
H1000	4.00±0.00	14.00±0.00	0.61±0.01 †	5.75±0.10	126.01±54.54
P100	3.50±0.10	14.00±0.09	0.54±0.04 †	4.71±0.04	139.85±51.50
P500	3.86±0.11	14.00±0.00	0.52±0.03 †	5.23±0.09	139.30±50.88
P1000	4.00±0.00	14.00±0.00	0.61±0.00 †	5.86±0.10	95.17±49.19

หมายเหตุ - † แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาตรและขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ไม่ได้รับการปรับปรุง (CCH) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

- เปอร์เซ็นต์สารปรับปรุงคำนวณได้จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์สารปรับปรุง (\% wt/wt)} = \frac{W - W_c}{W} \times 100$$

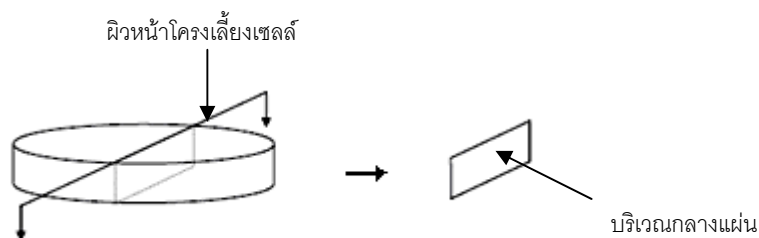
โดยที่ W คือ น้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่เติมสารปรับปรุง

W_c คือ น้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ไม่เติมสารปรับปรุง

จากการพิจารณาน้ำหนักและขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน ตามตารางที่ 4.1 พบว่าน้ำหนักแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมตามปริมาณการเติมสารปรับปรุง โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงต่างชนิดกันแต่มีปริมาณ

โปรตีนทั้งหมดจากสารปรับปรุงเท่ากันจะมีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกันดังเช่นน้ำหนักแห้งของ C100, H100 และ P100 โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงชนิดเดียวกันจะมีความหนาเพิ่มขึ้นตามปริมาณโปรตีนรวมที่ถูกเติมในโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณโปรตีน แต่เมื่อพิจารณาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่ามีขนาดค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของโปรตีนรวมที่เติมในโครงเลี้ยงเซลล์แต่แตกต่างกับขนาดของกลุ่มควบคุม เมื่อพิจารณาปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงมีปริมาตรสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นตามปริมาณสารปรับปรุงดังเห็นได้จากขนาดที่เพิ่มขึ้น ยกเว้นใน C100 เท่านั้นที่โครงเลี้ยงเซลล์มีความหนาน้อยกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อพิจารณาขนาดของรูพรุนที่แสดงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดมีขนาดรูพรุนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาขนาดของรูพรุนเทียบกับปริมาตรพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาตรสูงกว่ามีขนาดของรูพรุนเล็กกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาตรน้อยเมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากสารปรับปรุงชนิดเดียวกัน

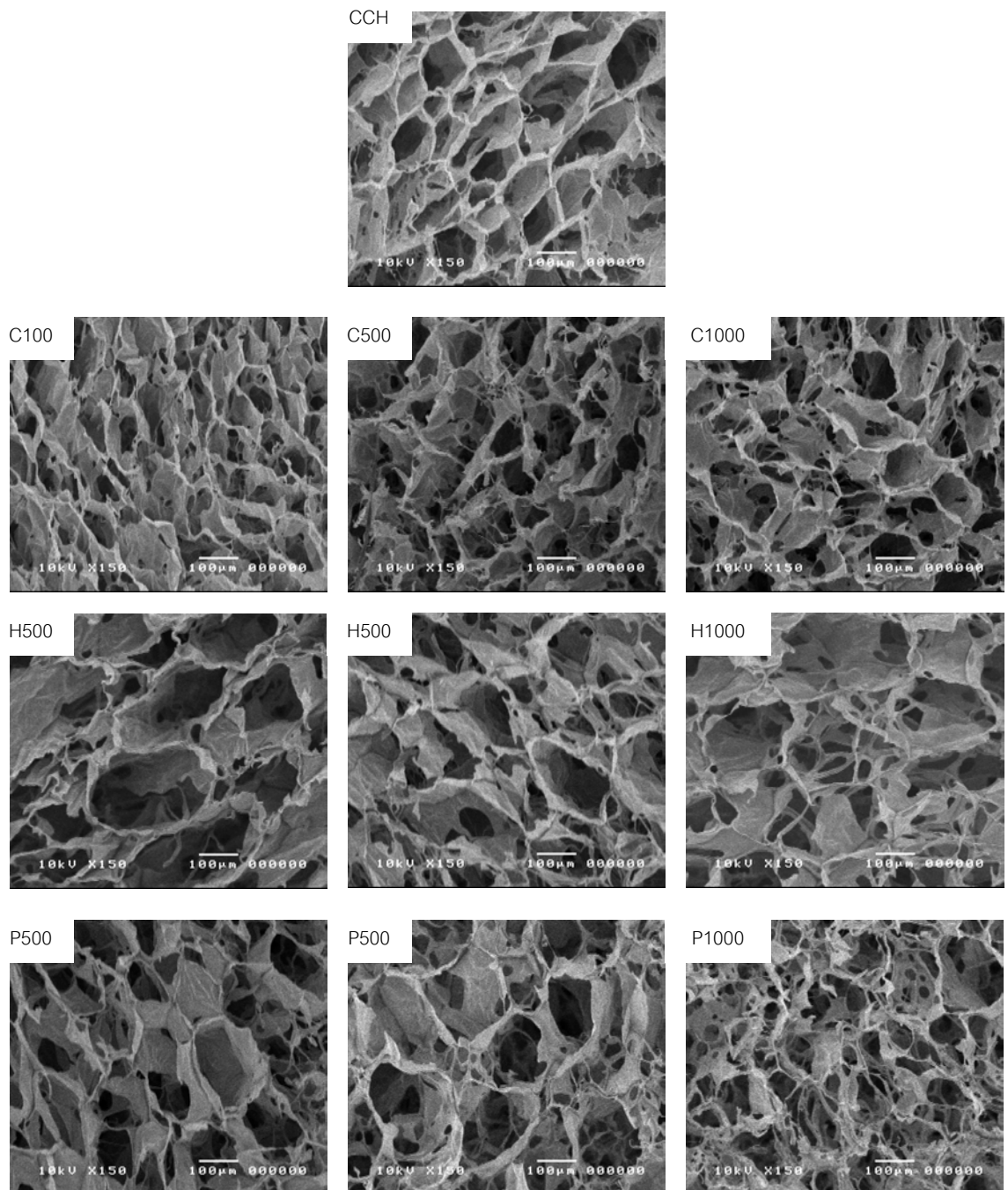
จากภาพถ่ายทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในแนวตั้งฉากกับผิวหน้าของโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4.2) ที่แสดงถึงลักษณะของโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เป็นรูพรุนที่เชื่อมต่อกันดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 ภาพแสดงลักษณะและทิศทางการถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

จากการวิเคราะห์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมมีขนาดของรูพรุนประมาณ 63-127 ไมโครเมตร ส่วนในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่เติมสารปรับปรุงมีลักษณะการเชื่อมโยงและขนาดของรูพรุนแตกต่างกันโดยมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 50-225 ไมโครเมตร จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน ที่เติมสารปรับปรุงมีขนาดรูพรุนเหมาะกับการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ตามที่ได้รายงานไว้ในงานวิจัยของ O'Brien และคณะ (2005) ซึ่งแสดงว่าขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมมีค่าอยู่ในช่วง 100-200 ไมโครเมตร โดยในกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมไครโอโปรตีนพีเตท C100 มีรูพรุนขนาดเล็กประมาณ 56-116 ไมโครเมตรและมีผนัง

กั้นระหว่างรูพรุนต่อเนื่องและหนาแน่นทำให้มีความเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนต่ำ ในขณะที่ C500 และ C1000 มีลักษณะของการเชื่อมต่อของรูพรุนสูงแต่มีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับ C100

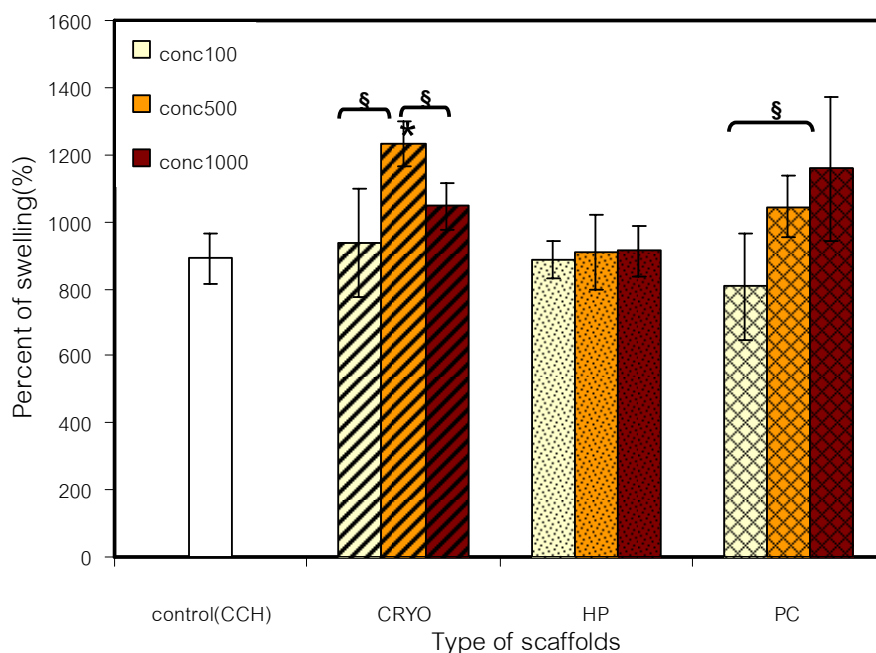


รูปที่ 4.3 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการปรับปรุง: กลุ่มควบคุม (CCH) และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยโครโอพรีซิพิเตท (C100, C500, C1000) พลาสมา (H100, H500, H1000) และเกล็ดเลือดเข้มข้น (P100, P500, P1000)

เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่มีการเติมพลาสติกพบว่า H100 มีรูพรุนขนาด 121-227 ไมโครเมตร และมีผนังกันระหว่างรูพรุนอย่างต่อเนื่อง โดยที่ความต่อเนื่องของผนังกันระหว่างรูพรุนมีความสม่ำเสมอลดลงใน H500 และ H1000 ซึ่งส่งผลให้ความเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนสูงขึ้น ส่วนในกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมเกลือดีดเค็มชั้นพบว่า ลักษณะของรูพรุนคล้ายกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมพลาสติก คือมีขนาด จำนวน และความเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมสูงขึ้นและมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 50-190 ไมโครเมตร จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงผลจากการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ทำให้รูพรุนมีขนาดเล็ก เพิ่มจำนวนมากขึ้นและมีความเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนสูง เนื่องจากโมเลกุลขนาดเล็กของโปรตีนในผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดที่เติมในโครงเลี้ยงเซลล์ไปแทรกกระหว่างพันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่ อย่างคอลลางเจน และไคโตซานเป็นผลให้ความต่อเนื่องระหว่างรูพรุนเพิ่มขึ้น

4.1.2 สมบัติในการบวมน้ำ (Swelling properties)

ลักษณะสมบัติในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์วัดได้จากปริมาณสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ถูกโครงเลี้ยงเซลล์ดูดซับไว้ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงได้ในรูปของเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำ (Percent of swelling) ในรูปที่ 4.4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำประมาณ 900 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์คอลลางเจน-ไคโตซานที่มีการเติมสารปรับปรุงมีค่าเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าอยู่ในช่วง 800-1100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น C500 ที่มีเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำสูงที่สุดคือ 1230 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในการพิจารณาผลของความเข้มข้นโปรตีนรวมในโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละกลุ่ม โครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่เติมไคโรโอปริซิพิเตทมีเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง C500 กับ C100 และ C1000 โดยที่ C500 มีค่าเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำสูงที่สุดและลดลงใน C1000 และ C100 ตามลำดับ ซึ่งความสัมพันธ์กับความต่อเนื่องระหว่างรูพรุนที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.3 แต่เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่เติมพลาสติกพบว่า ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีค่าเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำใกล้เคียงกันประมาณ 884-912 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับความต่อเนื่องระหว่างรูพรุนที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่เติมเกลือดีดเค็มชั้นมีแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนรวม โดย P1000 มีค่าเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำสูงสุด 1,156 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแตกต่างกับ P100 อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.4 เปรอ์เซ็นต์การบวมน้ำโครงเลี้ยงเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (กลุ่มควบคุม) และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่เติมโครโอปริซิพิเตท (CRYO), พลาสมา (HP) และ เกล็ดเลือดเข้มข้น (PC) ที่ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมด 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 (mean \pm SD, n = 6) ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง โดยที่เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ CCH ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และเครื่องหมาย § แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นภายในกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปรับปรุงชนิดเดียวกัน

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำยังขึ้นอยู่กับลักษณะของรูพรุน โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีจำนวนรูพรุนและความต่อเนื่องระหว่างรูพรุนมากสามารถกักน้ำไว้ในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนและความต่อเนื่องระหว่างรูพรุนน้อย โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงที่มีเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำสูงอย่าง C500 และ P1000 มีลักษณะสมบัติที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และจากสมบัติการบวมน้ำที่ไม่แตกต่างกันระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมสารปรับปรุง เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมสารปรับปรุงมีองค์ประกอบหลักเป็นคอลลาเจน-ไคโตซานเช่นเดียวกันจึงมีสมบัติความชอบน้ำ (Hydrophilicity) ใกล้เคียงกัน

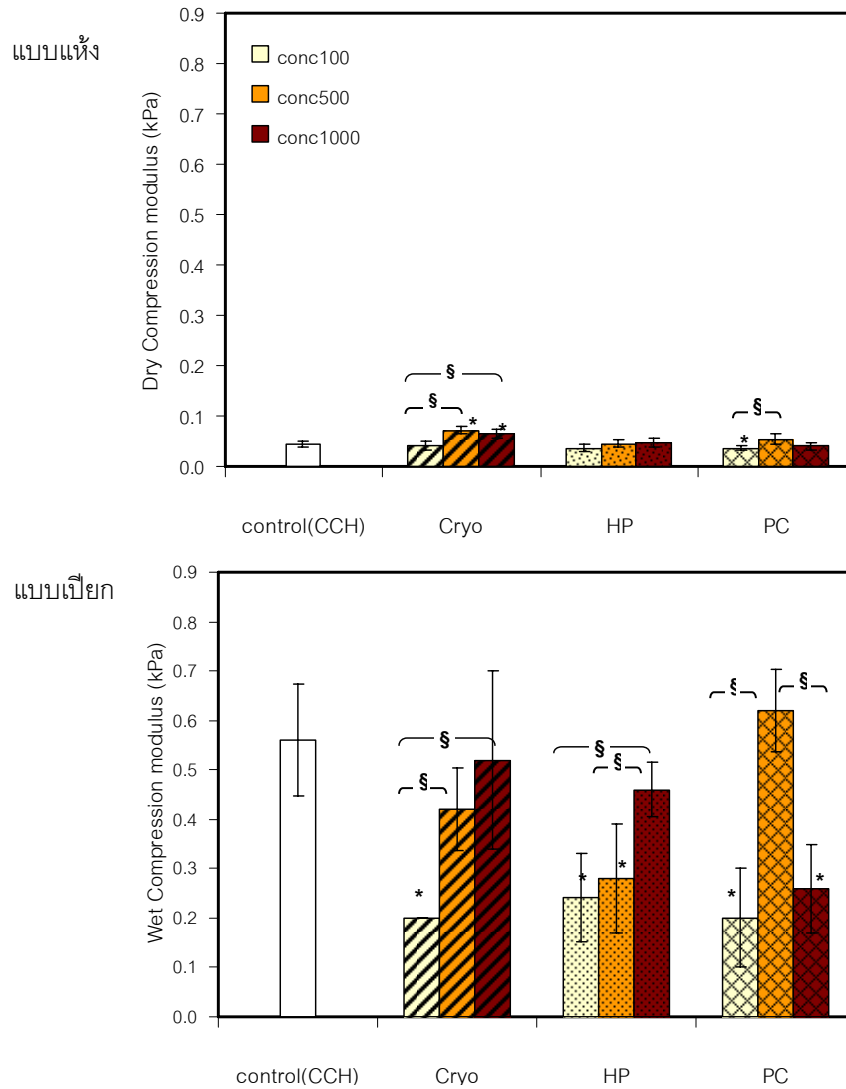
4.1.3 สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์

1) ความต้านทานต่อแรงกด (Compressive modulus)

ค่ามอดูลัสการกดของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นคุณสมบัติสำคัญที่สามารถบอกถึงความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นโปรตีนรวมในโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดดังแสดงได้ในรูปที่ 4.5

เมื่อพิจารณาค่ามอดูลัสการกดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบแห้งพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีการเติมโครโอปริซิพิเตทเท่านั้นที่มีค่ามอดูลัสการกดสูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามอดูลัสการกด ระหว่างความเข้มข้นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโครโอปริซิพิเตทพบว่า C500 และ C1000 มีค่ามอดูลัสการกดสูงกว่าใน C100 ส่วนในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมพลาสมา และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมเกลือเค็ล็ดเข้มข้นมีค่ามอดูลัสการกดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้น โดยที่ใน P100 มีค่ามอดูลัสการกดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมของโครโอปริซิพิเตทมีผลต่อความต้านทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์

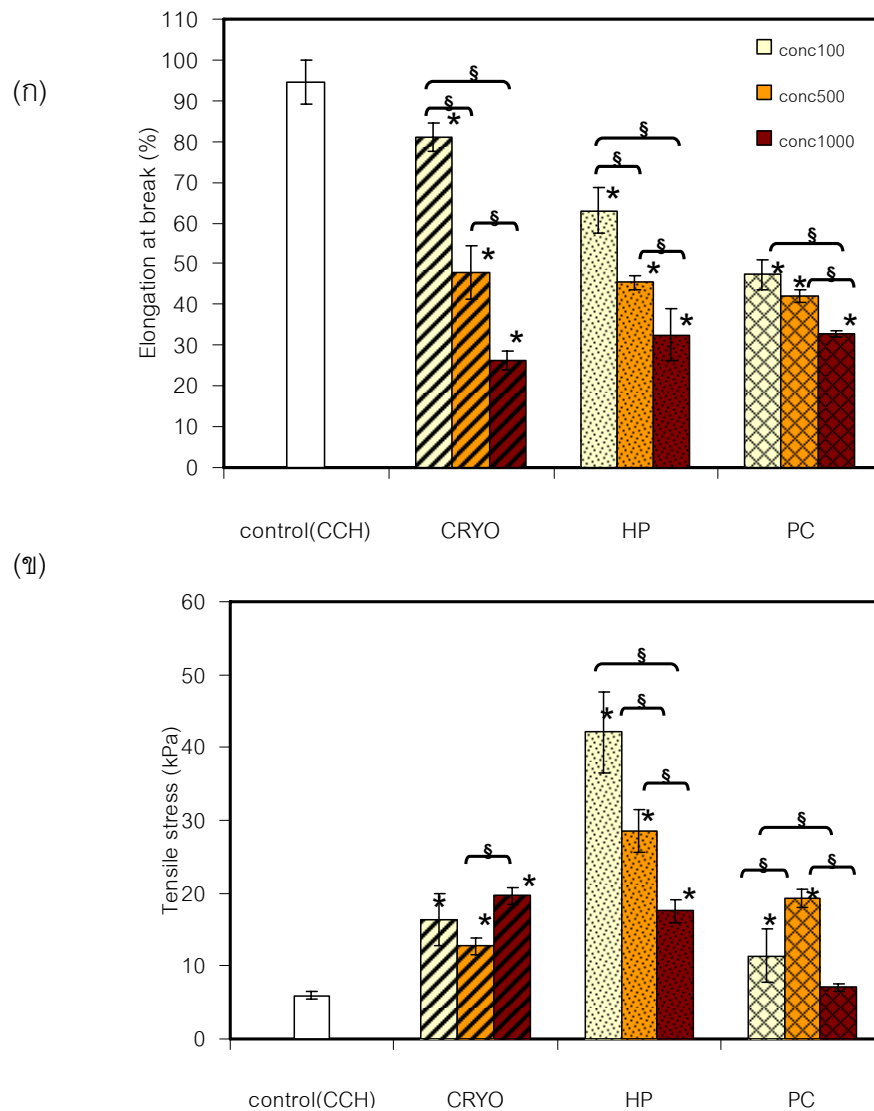
เมื่อพิจารณาความต้านทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบเปียกที่แช่จนอิ่มตัวด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 และไม่มีการกำจัดน้ำออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนนำไปทดสอบการต้านทานแรงกดพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารปรับปรุงมีค่ามอดูลัสการกดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อพิจารณาภายในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโครโอปริซิพิเตทและพลาสมาของมนุษย์ ค่ามอดูลัสการกดสูงขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งแตกต่างกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมเกลือเค็ล็ดเข้มข้นที่มีค่ามอดูลัสการกดสูงสุดที่ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมด 500 มิลลิกรัม/โครงเลี้ยงเซลล์ แต่มีค่าลดลงอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/โครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพ (รูปที่ 4.3) ที่แสดงว่าความต่อเนื่องของรูพรุนที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อความสามารถในการต้านทานแรงกด เนื่องมาจากความเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนที่เพิ่มขึ้นทำผนังกันระหว่างรูพรุนลดลง เป็นผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีโครงสร้างที่ใช้ต้านทานต่อแรงกดน้อยลง จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความต่อเนื่องของรูพรุนสูงมีความสามารถในการต้านทานต่อแรงกดต่ำ



รูปที่ 4.5 ค่ามอดูลัสการกดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคซานแบบแห้ง (ก) และแบบเปียกในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 (ข) (mean \pm SD, n = 6) โดยที่เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ CCH ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และเครื่องหมาย § แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นภายในกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปรับปรุงชนิดเดียวกัน

นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่ามอดูลัสการกดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบแห้งและแบบเปียกพบว่าค่ามอดูลัสการกดของโครงเลี้ยงเซลล์แบบเปียกมีค่าสูงกว่าแบบแห้ง เนื่องจากอนุภาคของน้ำที่แทรกอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์เป็นตัวช่วยเพิ่มแรงต้านทานการกด

2) ความทนทานต่อแรงดึง (Tensile strength)



รูปที่ 4.6 ค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาด (ก) และความต้านทานต่อแรงดึง (ข) ของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่เติมสารปรับปรุง (mean \pm SD, n = 5) โดยที่เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ CCH ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และเครื่องหมาย § แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นภายในกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปรับปรุงชนิดเดียวกัน

ลักษณะการยืดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะร่างกายมีผลอย่างมากในการนำโครงเลี้ยงเซลล์มาประยุกต์ใช้งานจริง เนื่องจากลักษณะสมบัติดังกล่าวบอกรถึงความสามารถในการรับแรงในแนวขนานกับผิวหนังซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการรักษาบาดแผลที่เกิดจากแรงดึงยึดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Yannas และคณะ, 2004 และ Enoch และคณะ, 2005) จากการทดสอบสมบัติดังกล่าว

พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโปรตีนจากผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ทั้งสามชนิดมีระยะการยืดตัว ณ จุดขาด (แสดงตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวก ง) ต่ำกว่าระยะการยืดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเป็น 94.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารปรับปรุงทั้ง 3 กลุ่มคือ ไครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมต่ำมีระยะยืดสูงกว่าดังแสดงจากเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาด (Elongation at break) ในรูปที่ 4.6 ที่แสดงว่าปริมาณโปรตีนรวมในโครงเลี้ยงเซลล์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาด โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์มีระยะการยืดตัวต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนรวมในโครงเลี้ยงเซลล์สูงขึ้นตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงถึงลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการเติมสารปรับปรุง เมื่อพิจารณาความต้านทานต่อแรงดึง (Tensile stress) จนถึงจุดที่โครงเลี้ยงเซลล์เริ่มขาด (รูปที่ 4.6) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารปรับปรุงทั้ง 3 กลุ่ม มีความสามารถในการต้านทานแรงดึงได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นในโครงเลี้ยงเซลล์ P100 แต่เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นโปรตีนรวมในโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละกลุ่มพบว่ามีความโน้มต่างกัน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ C1000 จะมีค่าความต้านทานแรงดึงสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ C500 เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่เติมพลาสมา ความต้านทานแรงดึงของโครงเลี้ยงเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นมากขึ้น ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมเกล็ดเลือดเข้มข้นมีความต้านทานต่อแรงดึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ P500 มีความสามารถในการต้านทานแรงดึงสูงสุด รองลงมาตามลำดับใน P1000 และ P100

4.1.4 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพภายในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* biocompatibility)

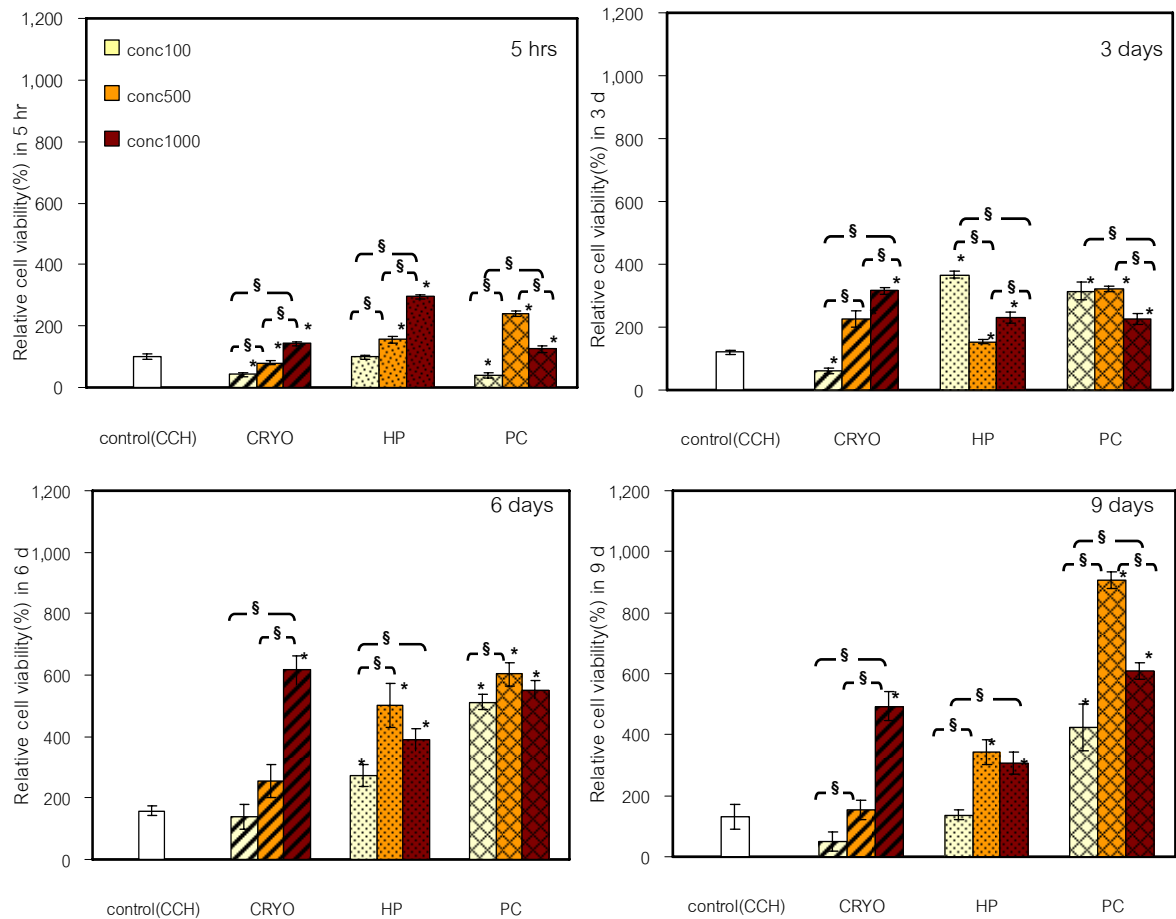
4.1.4.1 โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน และ เจลาติน-โคโตซาน

การทดสอบลักษณะสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่มีต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ภายใต้สภาวะห้องทดลอง (*In vitro*) ศึกษาดูออกเป็น 2 ลักษณะคือ ศึกษาการยึดเกาะ (cell adhesion) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) จากการทดลองเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (Detroit 551 human fibroblast) ด้วยสารอาหารที่ปราศจากซีรัมบนโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุม (CCH) และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยไครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น เพื่อศึกษาถึงผลของสารปรับปรุงที่มีต่อการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเซลล์

จำเป็นต้องใช้สารอาหารมาตรฐานที่มีซีรัม (10% Bovine serum albumin) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งให้เกิดแรงอันตรกิริยาระหว่างเซลล์ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวน (Somner และคณะ, 2000) แต่ในงานวิจัยนี้เลือกสารอาหารที่ปราศจากซีรัมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากความต้องการศึกษาผลของการใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์เพียงอย่างเดียว โดยตัดผลจากซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานออกไป โดยที่ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ประกอบด้วยซีรัมและโมเดกุลโปรตีน เช่น ไฟบริโนเจน, แฟคเตอร์ VIII และ โปรทรอมบิน (McLeod, 2005) จากการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay ที่แสดงในรูปที่ 4.7 พบว่ากลุ่มควบคุมมีจำนวนเซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนในโครงเลี้ยงเซลล์มากขึ้นตามเวลา โดยที่เวลา 3 และ 6 วัน มีจำนวนเซลล์เพิ่มมากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงเป็น 18% และ 50% แต่ที่เวลา 9 วัน การเพิ่มของจำนวนเซลล์น้อยลงเหลือเพียง 30% เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยโคริโอปริซิพิเตท พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ในโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่เติมโคริโอปริซิพิเตท โดยที่การเพิ่มจำนวนเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นที่เวลา 3 และ 6 วัน และลดลงที่เวลา 9 วัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง C100, C500 และ C1000 พบว่าใน C500 และ C1000 มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยที่ C1000 มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนมากที่สุดซึ่งมีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะในกลุ่มควบคุม (5 ชั่วโมง) เป็น 43%, 225% และ 517% และลดลงเหลือ 392% ที่เวลา 5 ชั่วโมง, 3, 6 และ 9 วัน ตามลำดับ แต่ใน C100 มีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา

สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่ปรับปรุงด้วยพลาสมาพบว่าใน H100 มีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และใน H500 และ H1000 มีการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยที่การเพิ่มของจำนวนเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นที่เวลา 3 และ 6 วัน และมีค่าลดลงที่เวลา 6 วัน ใน H100 แต่มีค่าลดลงที่เวลา 9 วันใน H500 และ H1000 โดยที่เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดีที่สุดใน H1000 และเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด ใน H500 ที่เวลา 6 วัน ซึ่งมีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนกลุ่มควบคุม (5 ชั่วโมง) เป็น 204% และ 418% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้น เซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้น เช่นเดียวกับในโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่เติมโคริโอปริซิพิเตท และ พลาสมา โดยที่ใน P100 มีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะสูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และ 6 และมีจำนวนลดลงที่ 9 วัน ในขณะที่เซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน P500 และ P1000 มีแนวโน้มสูงขึ้นจนถึงเวลา 9 วัน และเซลล์สามารถยึด

เกาะและเพิ่มจำนวนได้มากที่สุดใ P500 ซึ่งมีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนกลุ่มควบคุม เป็น 147% และ 836% ที่เวลา 9 วัน



รูปที่ 4.7 Relative cell viability ของเซลล์ Detroit 551 (human fibroblast) บนโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-โคโตซานชนิดต่างๆที่เวลา 5 ชั่วโมง 3, 6 และ 9 วัน ในสารอาหารที่ไม่มีซีรัม โดยที่ เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ CCH ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ § แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นภายในกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปรับปรุง ชนิดเดียวกัน

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์ Detroit 551 สามารถยึดเกาะได้และเพิ่มจำนวนได้ใน โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน โดยจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นแล้วมีค่าลดลงเนื่องจาก โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เป็นที่ยึดเกาะของเซลล์เกิดการย่อยสลาย เนื่องจากเอนไซม์ที่ ผลิตจากเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นตามเวลา และจากผลการทดลองสรุปได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี

การเติมสารปรับปรุงมีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ และเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติมสารปรับปรุง โดย H1000 มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงมากที่สุด และ P500 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงที่สุดที่เวลา 9 วัน นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าความเข้มข้นของสารปรับปรุงแต่ละชนิดมีผลต่อการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่างกัน โดยในกลุ่มโคริโอปริซิพิเตท C1000 มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนมากที่สุด ส่วนในกลุ่มพลาสมา H1000 ให้ผลดีที่สุดในการยึดเกาะของเซลล์ และ H500 ให้ผลดีที่สุดในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และสำหรับในกลุ่มเกล็ดเลือดเข้มข้น P500 ให้ผลดีที่สุดทั้งการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

จากการสรุปโดยรวมเนื่องจากสารปรับปรุงทั้ง 3 ชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเลือดมนุษย์ที่เป็นแหล่งสารอาหารและสารเคมีที่ผลิตได้จากเซลล์ (Cytokines) (ดังที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 หัวข้อ 2.6) ที่ประกอบไปด้วยโกรสแฟคเตอร์ชนิดต่างๆคือ PDGF, EGF และ TGF- β จากเกล็ดเลือดและพลาสมาที่มีส่วนช่วยเร่งให้เซลล์มีการยึดเกาะและเพิ่มจำนวน (Naughton และคณะ, 2003) รวมไปถึงคุณสมบัติของไฟบริโนเจนและไฟโบรเนคตินที่อยู่ในโคริโอปริซิพิเตทและพลาสมาที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาบาดแผล (Qiu และคณะ, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาของ Meana และคณะในปี 1998 ที่ทำการศึกษากการใช้ขุ่นไฟบริลจากโคริโอปริซิพิเตทของมนุษย์ที่ผสมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ในการเลี้ยงเซลล์คราติโนไซด์ซึ่งพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์และโคริโอปริซิพิเตทของมนุษย์มีส่วนช่วยให้เซลล์คราติโนไซด์เพิ่มจำนวนจนกระทั่งเต็มจานเพาะเลี้ยงได้ภายใน 15 วัน และงานวิจัยของ Choi และคณะในปี 2004 ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของเกล็ดเลือดในพลาสมาของแกะในการเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเซลล์กระดูกถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวนในกรณีที่ใช้เกล็ดเลือดเข้มข้นในพลาสมา (PRP: platelet rich plasma) แต่จะมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้เกล็ดเลือดเจือจางในพลาสมา (PPP: platelet poor plasma) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tajima และคณะในปี ค.ศ. 2006 ที่ศึกษาผลของ PRP และ PPP ของหนูที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ไขกระดูก (MSCs :bone marrow stromal cells) ซึ่งพบว่า PRP จะช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไขกระดูกแต่มีผลยับยั้งการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ในขณะที่ PPP มีบทบาทในการส่งเสริมการเปลี่ยนสภาพเซลล์ไปเป็นกระดูก เนื่องมาจากผลของความเข้มข้นของโกรสแฟคเตอร์ TGF- β และ PDGF ที่ได้จากเกล็ดเลือด

จากการพิจารณาความเหมาะสมของความเข้มข้นโปรตีนจากโคริโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ซึ่งใช้ปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน ที่ได้จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงด้วยสารชนิดเดียวกัน พบว่า C1000 มีความเข้มข้นของโปรตีนเหมาะสมที่สุดในโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่ปรับปรุงด้วยโคริโอปริซิพิเตท

เนื่องจากมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด และมีความสามารถในการต้านทานต่อแรงกดแบบเป็ยกและแรงดึงได้สูงที่สุดซึ่งมีค่าประมาณ 0.5 กิโลปาสคาล และ 20 กิโลปาสคาล ในการพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่ปรับปรุงด้วยพลาสมา H500 มีความเข้มข้นโปรตีนเหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้มากที่สุด และมีความสามารถในการต้านทานต่อแรงกดและแรงดึงประมาณ 0.3 กิโลปาสคาล และ 30 กิโลปาสคาล ซึ่งใกล้เคียงกับความสามารถในการต้านทานต่อแรงกดและแรงดึงใน C1000 และโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่ปรับปรุงด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้น P500 มีความเข้มข้นของโปรตีนเหมาะสมที่สุด ซึ่งพิจารณาได้จากความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวน และความสามารถในการต้านทานต่อแรงกดและแรงดึงที่มีค่าสูงที่สุด โดยที่มีค่าความต้านทานต่อแรงกดและแรงดึงประมาณ 0.6 กิโลปาสคาล และ 20 กิโลปาสคาล

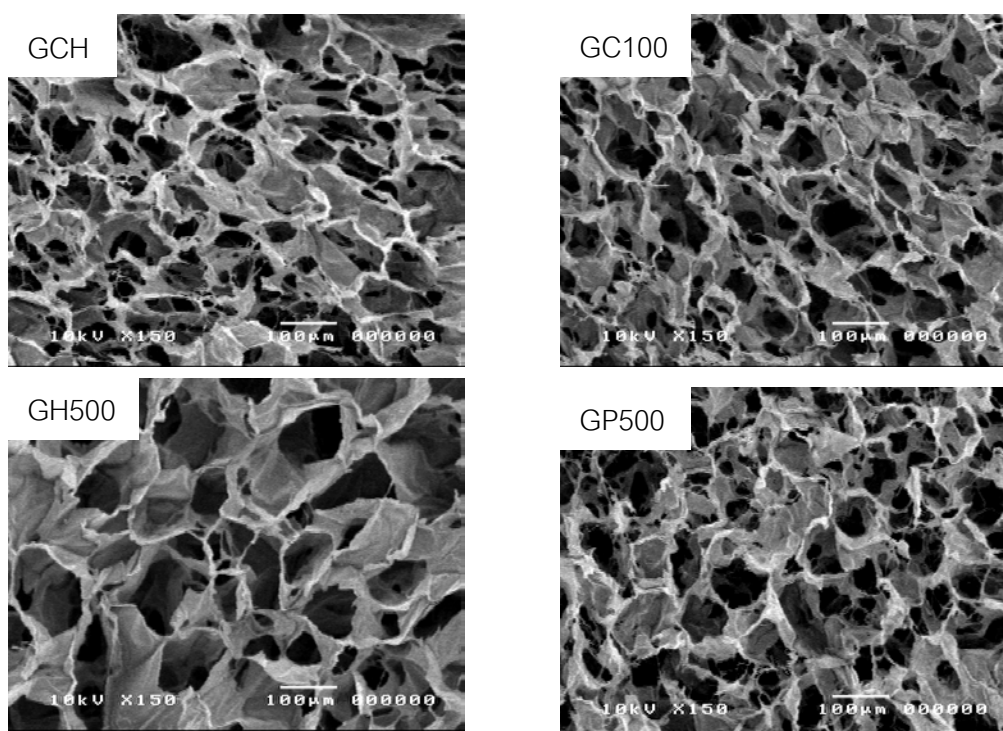
นอกจากการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์โครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นในการปรับปรุงความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานแล้ว ในงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่มีต่อการปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน เนื่องจากเจลาตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมี ปริมาณกรดอะมิโน และลักษณะความเข้ากันได้ทางชีวภาพใกล้เคียงกับคอลลาเจนแต่มีราคาถูกและหาได้ง่ายกว่าคอลลาเจน จึงนำไปสู่การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อลดต้นทุนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ อีกทั้งเจลาตินยังสามารถแสดงลักษณะของประจุบวกและลบที่เหมาะสมกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นลักษณะสมบัติที่ดีในการควบคุมการปลดปล่อย (Control release) สารสำคัญที่มีประจุตรงกันข้าม (Tabata, 1999)

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยโครโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสม (ความเข้มข้นที่เหมาะสมพิจารณาจากการศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน ที่ได้รับการปรับปรุง) สามารถแสดงได้ในตารางที่ 4.2 ซึ่งมีแนวโน้มใกล้เคียงกับลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นของโปรตีนจากสารปรับปรุงเท่ากัน โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่ได้รับการปรับปรุงมีปริมาตรและน้ำหนักแห้งมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่ไม่ได้รับการปรับปรุงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาลักษณะและขนาดของรูพรุนที่แสดงในรูปที่ 4.8 พบว่ารูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานมีความต่อเนื่องระหว่างรูพรุน โดยที่ขนาดของรูพรุนมีค่าอยู่ในช่วง 50-198 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน

ตาราง 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง ความหนา และเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน-ไคโตซาน, ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารปรับปรุงในโครงเลี้ยงเซลล์ และขนาดของรูพรุน

รหัสโครงเลี้ยงเซลล์	ความหนา (มิลลิเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	น้ำหนักแห้งรวม (มิลลิกรัม)	ปริมาตรโครงเลี้ยงเซลล์ (มิลลิเมตร)	ขนาดรูพรุน (ไมโครเมตร)
GCH	3.00±0.00	13.36±0.21	4.84±0.09	0.42±0.02	88.53±31.01
GC1000	3.49±0.02	13.50±0.00	6.27±0.04	0.49±0.00 [†]	90.31±28.85
GH500	4.00±.00	14.00±0.00	5.80±0.10	0.61±0.01 [†]	142.16±56.01
GP500	3.85±0.20	14.00±0.18	5.98±0.10	0.59±0.04 [†]	91.80±31.95

หมายเหตุ [†] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาตรและขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน-ไคโตซาน ที่ได้รับการปรับปรุงเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานที่ไม่ได้รับการปรับปรุง (GCH) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

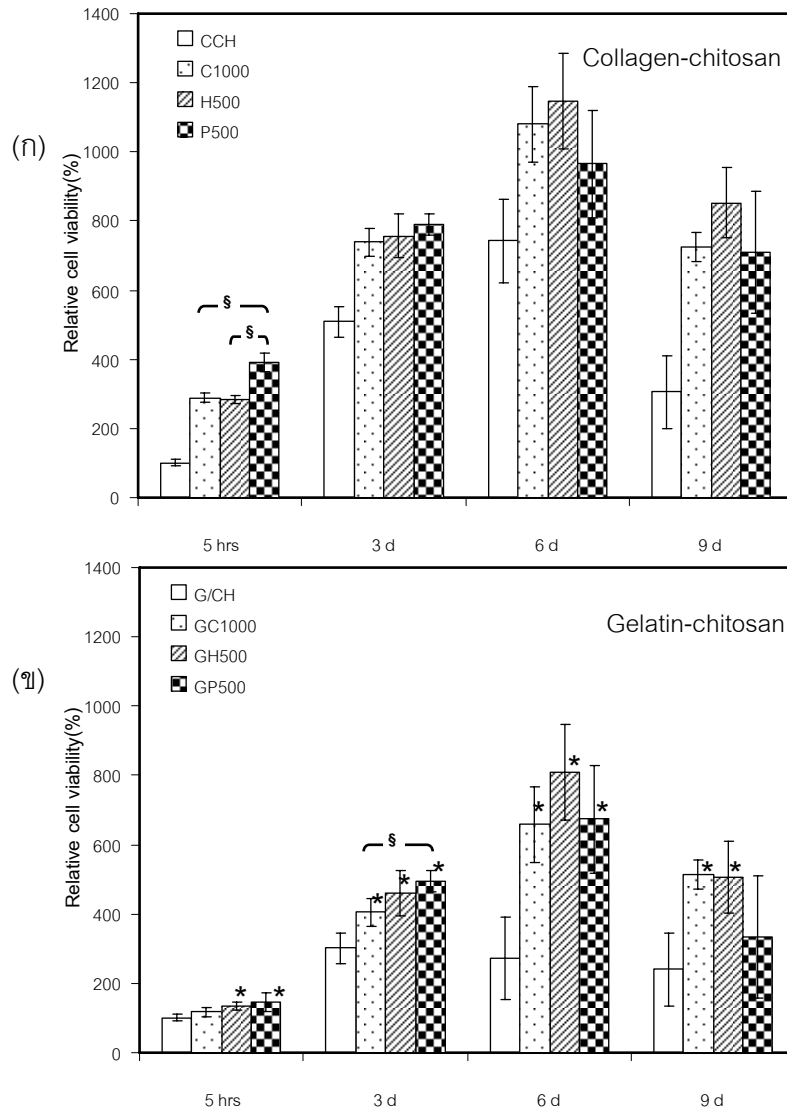


รูปที่ 4.8 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานที่ไม่ได้รับการปรับปรุง (GCH) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยไครโอปริซิพีเตด (GC1000) พลาสมา (GH500) และเกล็ดเลือดเข้มข้น (GP500)

จากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพด้วยการทดลองเลี้ยงเซลล์ L929 ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน (GCH) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนทั้งหมดจากโครโอปรีซีพิเทท 1000 มิลลิกรัม (GC1000), พลาสมา 500 มิลลิกรัม (GH500), และเกล็ดเลือดเข้มข้น 500 มิลลิกรัม (GP500) ที่แสดงผลดังรูปที่ 4.9 โดยที่ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดจากสารปรับปรุงอ้างอิงจากผลสรุปของความเข้มข้นโปรตีนของสารปรับปรุงที่มีต่อการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ Detroit 551 บนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน

จากผลการทดลองเซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ใน GCH โดยจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะเพิ่มจำนวนขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงที่สุดที่เวลา 3 วันและมีค่าลดลงที่เวลา 6 และ 9 วัน และจากการพิจารณาจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากสารปรับปรุงทั้ง 3 ชนิดพบว่ามีความโน้มเอียงเหมือนกันคือ เซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนสูงสุดที่เวลา 6 วันแล้วลดจำนวนลงที่เวลา 9 วัน อันเนื่องมาจากการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ จากการเปรียบเทียบการยึดเกาะพบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงได้ดีที่สุดใน GP500 และสามารถเพิ่มจำนวนได้มากที่สุดที่เวลา 6 ชั่วโมงใน GH500 และรองลงมาใน GP500 และ GC1000 ซึ่งมีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบน GCH ที่เวลา 5 ชั่วโมง เป็น 708%, 573% และ 558% ตามลำดับ ซึ่งผลสรุปดังกล่าวมีความโน้มเอียงเหมือนกับความสามารถในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ L929 บนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่มีความเข้มข้นของโปรตีนจากสารปรับปรุงเท่ากันดังแสดงในรูปที่ 4.9 ซึ่งเห็นได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่เติมสารปรับปรุงมีเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารปรับปรุง โดยที่ P500 มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะมากที่สุดที่เวลา 5 ชั่วโมง และเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนสูงสุดที่เวลา 6 วัน และลดลงที่เวลา 9 วัน เนื่องจากการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้มากที่สุดที่เวลา 6 ชั่วโมง และรองลงมาใน P500 และ C1000 ซึ่งมีค่ามากกว่าในจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบน CCH ที่เวลา 5 ชั่วโมง เป็น 1047%, 980% และ 865% ตามลำดับ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน และเจลาติน-โคโตซานที่เติมสารปรับปรุงสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ปรับปรุง โดยที่เซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่เติมสารปรับปรุงได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่เติมสารปรับปรุง เนื่องมาจากความแข็งแรงของโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน ด้วยลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลคอลลาเจนที่เป็นสายโซ่พอลิเมอร์พันเป็นเกลียวแบบ α helix (Friess และคณะ, 1998) ในขณะที่โครงสร้างของเจลาตินเป็นสายโซ่พอลิเมอร์เส้น

เดี่ยวแบบ random coil (Lee, 2005) ดังเห็นได้จากจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่เวลา 6 วัน ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่มีค่าเพิ่มขึ้น 1047% ในขณะที่ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเพียง 708%



รูปที่ 4.9 Relative cell viability ของ L929 บนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (CCH) และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนทั้งหมดจากโครีโอปริซิพิเตท พลาสมา และ เกล็ดเลือดเข้มข้น (C1000, H500, P500) (ก) โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน (GCH) และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนทั้งหมดจากโครีโอปริซิพิเตท พลาสมาและเกล็ดเลือดเข้มข้น (GC1000, GH500, GP500) (ข) โดยที่เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ CCH ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และเครื่องหมาย § แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชนิดของสารปรับปรุงที่เวลาเดียวกัน

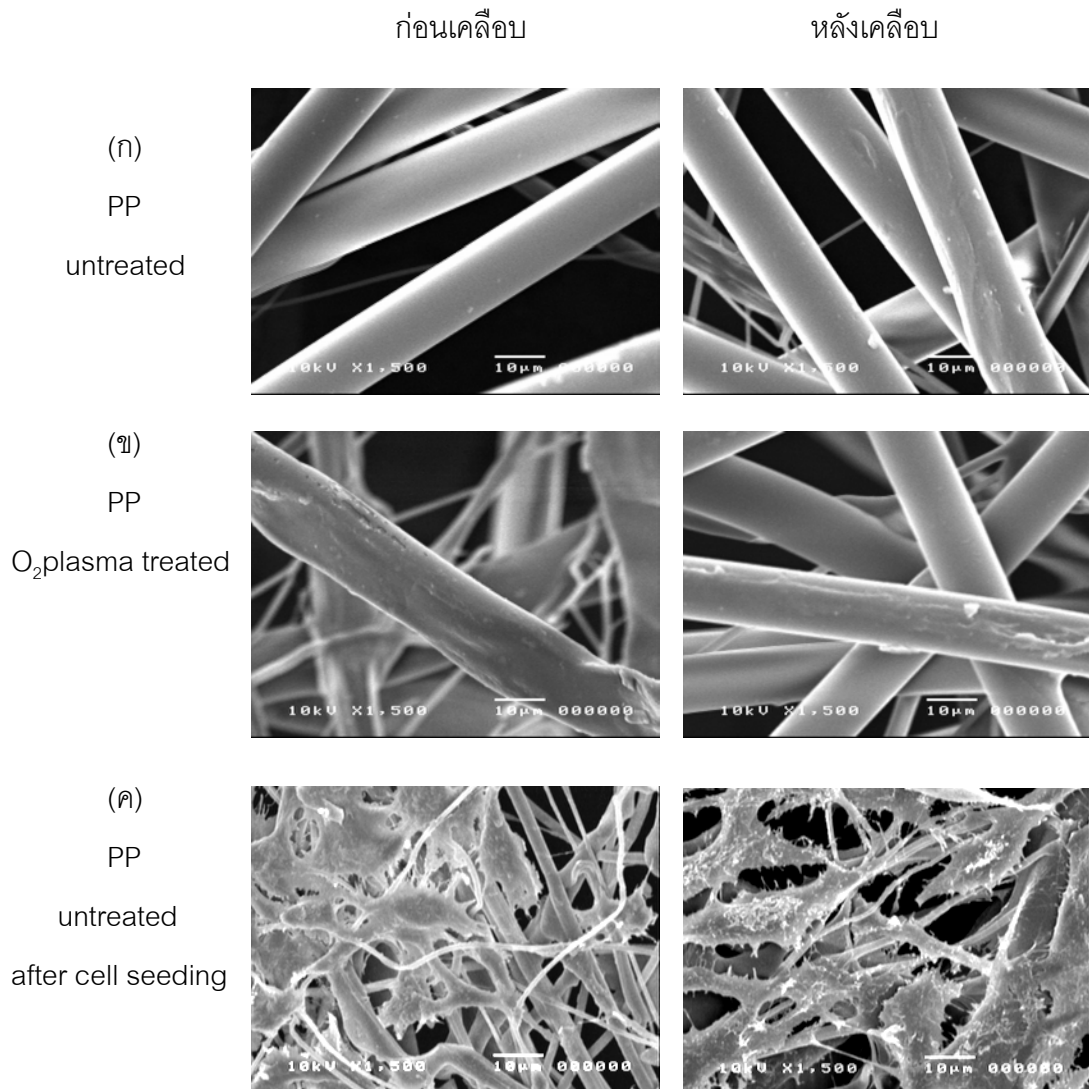
จากสมมุติฐานการใช้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน เพื่อควบคุมการปลดปล่อยโกรสแพคเตอร์จากโครงเลี้ยงเซลล์แทนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน แต่จากผลการทดลองในรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน ทั้งนี้เนื่องจากการควบคุมการปลดปล่อยในเมทริกซ์ใดๆ ขึ้นอยู่กับประจุ (charge) ของเมทริกซ์และโกรสแพคเตอร์ เจลาตินชนิด A ที่ใช้ในการทดลองนี้มีลักษณะประจุโดยรวม (net charge) เป็นบวกในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 (Bet และคณะ, 2002; Young และคณะ, 2005) ซึ่งมีประจุเดียวกับประจุโดยรวมของโมเลกุลโปรตีนจากไฟบริโนเจน (Sato และคณะ, 1980) , PDGF (Fenstermaker และคณะ, 1993), TGF- β (Maire และคณะ, 2004) และแพคเตอร์ VIII (Wang และคณะ, 2003) ในผลิตภัณฑ์จากเลือดของมนุษย์ ส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนไม่สามารถยึดอยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ โมเลกุลโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากเลือดจึงอาจถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงเลี้ยงเซลล์ได้ง่าย และสูญเสียไปกับสารอาหารมาตรฐานที่ใช้เลี้ยงเซลล์ซึ่งถูกเปลี่ยนทุกๆ 3 วัน จึงทำให้ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานไม่สามารถควบคุมการปลดปล่อยโมเลกุลโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ได้ จากลักษณะดังกล่าวอาจทำการปรับปรุงให้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซานมีประสิทธิภาพในการควบคุมการปลดปล่อยด้วยการเตรียมสารละลายเจลาตินชนิด A ให้มีค่า pH มากกว่าค่า pI (Isoelectric point) เพื่อปรับให้ประจุของเจลาตินเป็นลบ (Tabata, 1998) ซึ่งสามารถเกิดพันธะกับประจุบวกของโมเลกุลโปรตีนได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมการปลดปล่อย

4.1.4.2 แผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ (Non woven polypropylene fabric)

จากผลการใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ในโครงเลี้ยงเซลล์ จึงนำไปสู่การศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้บนเส้นใยพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องความเข้ากันได้กับเซลล์ วัสดุเส้นใยพอลิเมอร์สังเคราะห์เป็นหนึ่งในวัสดุที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ไม่เป็นพิษ (non-cytotoxic) มีราคาถูก และหาได้ง่ายอย่างแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ (non woven polypropylene fabric) (Li, 2001; Tyan, 2001) แผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอมีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็กซึ่งจะทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ ที่เหมาะสมในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Li, 2001) แต่เนื่องจากพอลิพรอพิลีนเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีโครงสร้างทาง

เคมีประกอบไปด้วยโมเลกุลของคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้นจึงแสดงลักษณะของความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้เป็นวัสดุทางชีวภาพ (Biomaterial) และความเข้ากันได้กับเซลล์ ในงานวิจัยได้ศึกษาการปรับปรุงพื้นผิวเส้นใยพอลิพรอพิลีนด้วยการเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโตซาน ที่ปรับปรุงด้วยการผสมโปรตีนผลิตภัณฑ์จากเลือดของมนุษย์ ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้

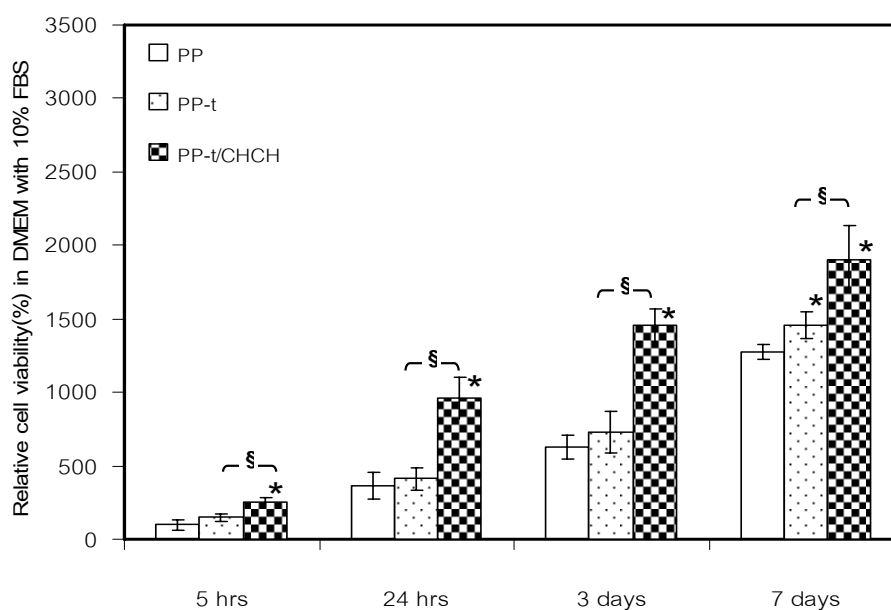
จากคุณสมบัติของความไม่ชอบน้ำของแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ ทำให้การเคลือบด้วยสารละลายบนแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอเป็นไปได้ยาก ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้ได้ทำการปรับปรุงสมบัติความชอบน้ำ (Hydrophilicity) ของแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอด้วยการกระตุ้นพื้นผิวแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอด้วยออกซิเจนพลาสมา (Wei และคณะ, 2006) จากการเปรียบเทียบลักษณะของพื้นผิวของแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วยก๊าซออกซิเจนพลาสมาทั้งก่อนและหลังเคลือบด้วยสารละลายมีลักษณะพื้นผิวของใยขรุขระและไม่สม่ำเสมอแตกต่างจากใยไม่สานทอปกติ (รูป 4.10) ไอนอนและความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการกระตุ้นด้วยพลาสมาทำให้ผิวของเส้นใยที่เฉื่อยเกิดประจุอ่อนๆ จับกับสารละลายคอลลาเจนและโคโตซานได้ แผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมามีสารละลายเคลือบติดอยู่บนเส้นใยมากกว่าแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ไม่ถูกกระตุ้นดังแสดงในรูป 4.10 (ก, ข) และผลที่สามารถยืนยันลักษณะสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปของใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอหลังจากที่กระตุ้นแล้วเคลือบด้วยสารละลายคือความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ L929 (mouse fibroblast) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 บนแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอใน DMEM ที่มีซีรัม 10% การยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์บนแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยก๊าซออกซิเจนพลาสมาทั้งก่อน และหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ในรูป 4.10 (ค) แสดงความสามารถของเซลล์ในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้บนแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ นอกจากนั้นขนาดของเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่มีค่า 2-10 ไมโครเมตร มีขนาดเหมาะสมกับการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Badami และคณะ, 2005; Moroni และคณะ, 2006) และลักษณะความแข็ง (stiffness) ของพื้นผิวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี (Genes และคณะ, 2003)



รูปที่ 4.10 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะพื้นผิวใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ไม่ถูกกระตุ้น (ก) และถูกกระตุ้น (ข) ด้วยออกซิเจนพลาสมา ก่อนและหลังการเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-ไคโตซาน และลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ ก่อนและหลังการเคลือบด้วยสารละลาย (ค)

จากการศึกษาเปรียบเทียบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการระหว่างแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ไม่ได้ปรับปรุงพื้นผิว (PP) และแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่กระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมา (PP-t) และแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่กระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมาแล้วเคลือบด้วยสารละลายผสมระหว่างคอลลาเจน-ไคโตซาน (PP-t/CHCH) ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 (mouse fibroblast) ใน DMEM ที่มีซีรัม 10% ที่เวลาต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปแบบที่

4.11 เซลล์สามารถยึดเกาะได้มากที่สุดบน PP-t/CHCH และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบน PP-t และ PP ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 7 วัน PP-t/CHCH โดยมีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบน PP ที่เวลา 5 ชั่วโมง ถึง 1356% เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอที่กระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมา PP-t/CHCH มีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนสูงกว่าบน PP-t ในทุกช่วงเวลา ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสารละลายที่เคลือบบนแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอส่งผลต่อการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์



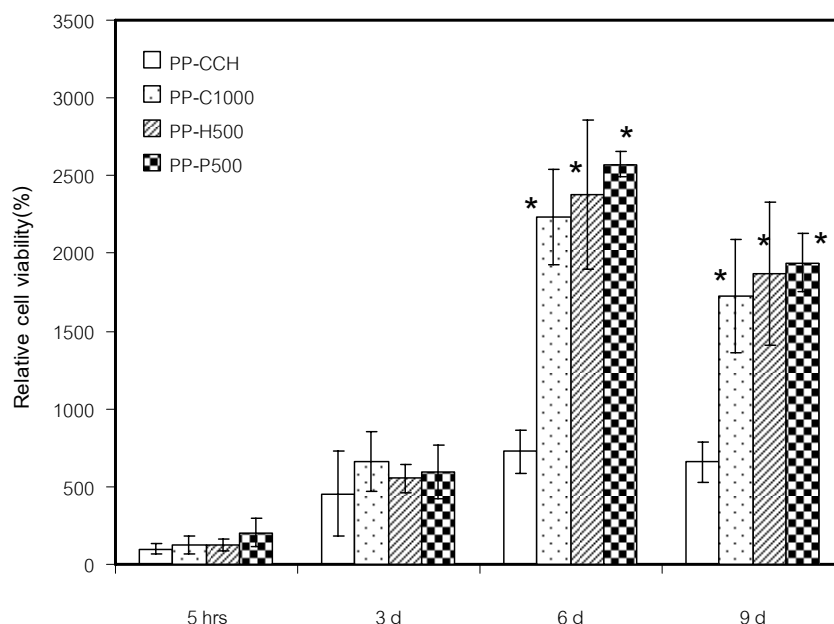
รูปที่ 4.11 Relative cell viability ของ L929 ใน DMEM ที่มีซีรัม 10% บนแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ไม่ถูกกระตุ้น (PP) และถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมา (PP-t) และแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอที่กระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมาแล้วเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโคซาน (PP-t/CHCH) ที่เวลาต่างๆ โดยที่ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ PP ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ และ § แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอที่เวลาเดียวกัน

ดังนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนเซลล์ L929 บนแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ถูกปรับปรุงพื้นผิวด้วยการเคลือบที่มีชั้นตอนต่างกัน เซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอที่กระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมาก่อนการเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโคซานได้มากกว่าการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนแผ่นโพลิพรอพิลีนไม่สานทอที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมา

ลิวโพรพิลีนไม่सानทอที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยพลาสมา จากข้อสรุปดังกล่าวนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพื้นผิวเส้นใยพอลิพรอพิลีนไม่सानทอ โดยการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการกระตุ้นด้วยก๊าซออกซิเจนพลาสมา แล้วจึงเคลือบด้วยสารละลายที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่सानทอ งานวิจัยนี้สนใจการใช้สารละลายผสมระหว่างผสมคอลลาเจน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยผลิตภัณฑ์โครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์มีความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด 1000, 500 และ 500 มิลลิกรัมตามลำดับ มาเป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพการเหนียวนำไปให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่सानทอที่ถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมา โดยที่ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในสารปรับปรุงแต่ละชนิดพิจารณาจากผลความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ Detroit 551 กับโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ถูกปรับปรุง

เมื่อนำแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่सानทอที่ถูกกระตุ้นพื้นผิวด้วยออกซิเจนพลาสมาแล้วเคลือบด้วยสารละลายผสมระหว่างคอลลาเจน-โคโตซาน (PP-CCH) และแผ่นใยที่ถูกกระตุ้นด้วยพลาสมาแล้วเคลือบด้วยสารละลายผสมระหว่างคอลลาเจน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโครโอปริซิพิเตท (PP-C1000) พลาสมา (PP-H500) และ เกล็ดเลือดเข้มข้น (PP-P500) มาทดสอบการเกาะเลี้ยงเซลล์ L929 (mouse fibroblast) ในสารอาหารที่ปราศจากซีรัมที่เวลา 5 ชั่วโมง 3, 6 และ 9 วัน (รูปที่ 4.12) เซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบน PP-CCH ได้เพิ่มมากขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงที่สุดที่เวลา 6 วัน แต่มีลดลงที่เวลา 9 วัน และจากการพิจารณาแผ่นพอลิพรอพิลีนไม่सानทอที่เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโตซานที่ผสมสารปรับปรุงทั้ง 3 ชนิดพบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนขึ้นตามเวลา ซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงใกล้เคียงกับการยึดเกาะบนแผ่น PP-CCH และมีจำนวนสูงขึ้นไปเวลา 3 และ 6 วัน และมีค่าลดลงในวันที่ 9 โดยจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมีค่ามากกว่าการเพิ่มจำนวนใน PP-CCH อย่างชัดเจนซึ่งมีค่าสูงสุดที่เวลา 6 วัน โดยที่ใน PP-C1000, PP-H500 และ PP-P500 มีจำนวนเซลล์เพิ่มจำนวนมากกว่าใน PP-CCH ที่เวลาเดียวกันเป็น 1500%, 1600% และ 1800% ตามลำดับ และที่เวลา 9 วัน จำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนบนแผ่นพอลิพรอพิลีนไม่सानทอที่เคลือบด้วยสารละลายแต่ละชนิดมีค่าลดลงเนื่องจากข้อจำกัดของพื้นที่บนแผ่นพอลิพรอพิลีนไม่सानทอที่มีค่าคงที่และมีลักษณะเป็น 2 มิติซึ่งทำให้เซลล์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นไม่สามารถยึดเกาะบนแผ่นได้ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองความเข้ากันได้ทางชีวภาพในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน ที่พบว่าโครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น สามารถเหนียวนำไปให้เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าในสารละลายคอลลาเจน-โคโตซานที่ไม่เติมสารปรับปรุง และจากข้อสรุปดังกล่าวแสดงให้เห็นถึง

การใช้สารละลายที่ผสมผลิตภัณฑ์จากเลือดในการเพิ่มประสิทธิภาพความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเส้นใยพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ได้รับการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการกระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมา



รูปที่ 4.12 Relative cell viability ของ L929 บนแผ่นพอลิพรอพิลีนไม่สานทอที่กระตุ้นด้วยออกซิเจนพลาสมาแล้วเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโตซาน (PP-CCH) และสารละลายคอลลาเจน-โคโตซานผสมโครโอปริซิพิเตท (PP-C1000), พลาสมา (PP-H500) และ เกล็ดเลือดเข้มข้น (PP-P500) ที่เวลา 5 ชั่วโมง 3, 6 และ 9 วัน ในสารอาหารที่ไม่มีซีรัมโดยที่เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ PP/CCH ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

จากการศึกษาผลของโครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น พบว่าสารปรับปรุงดังกล่าวสามารถใช้เพิ่มประสิทธิภาพความเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิตในระดับห้องปฏิบัติการของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน, เจลาติน-โคโตซานและแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ โดยที่ทั้งโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน และ เจลาติน-โคโตซาน ที่ปรับปรุงด้วยการเติมเกล็ดเลือดเข้มข้นมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะโครงเลี้ยงเซลล์ และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยพลาสมามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเมื่อพิจารณาการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์บนแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ พบว่าแผ่นใยที่เคลือบด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงสุด โดยที่เซลล์ L929 มีการเพิ่มจำนวนสูงที่สุดในแผ่นใยพอลิพรอพิลีนไม่สานทอ และมีการเพิ่มจำนวนรองลงมา

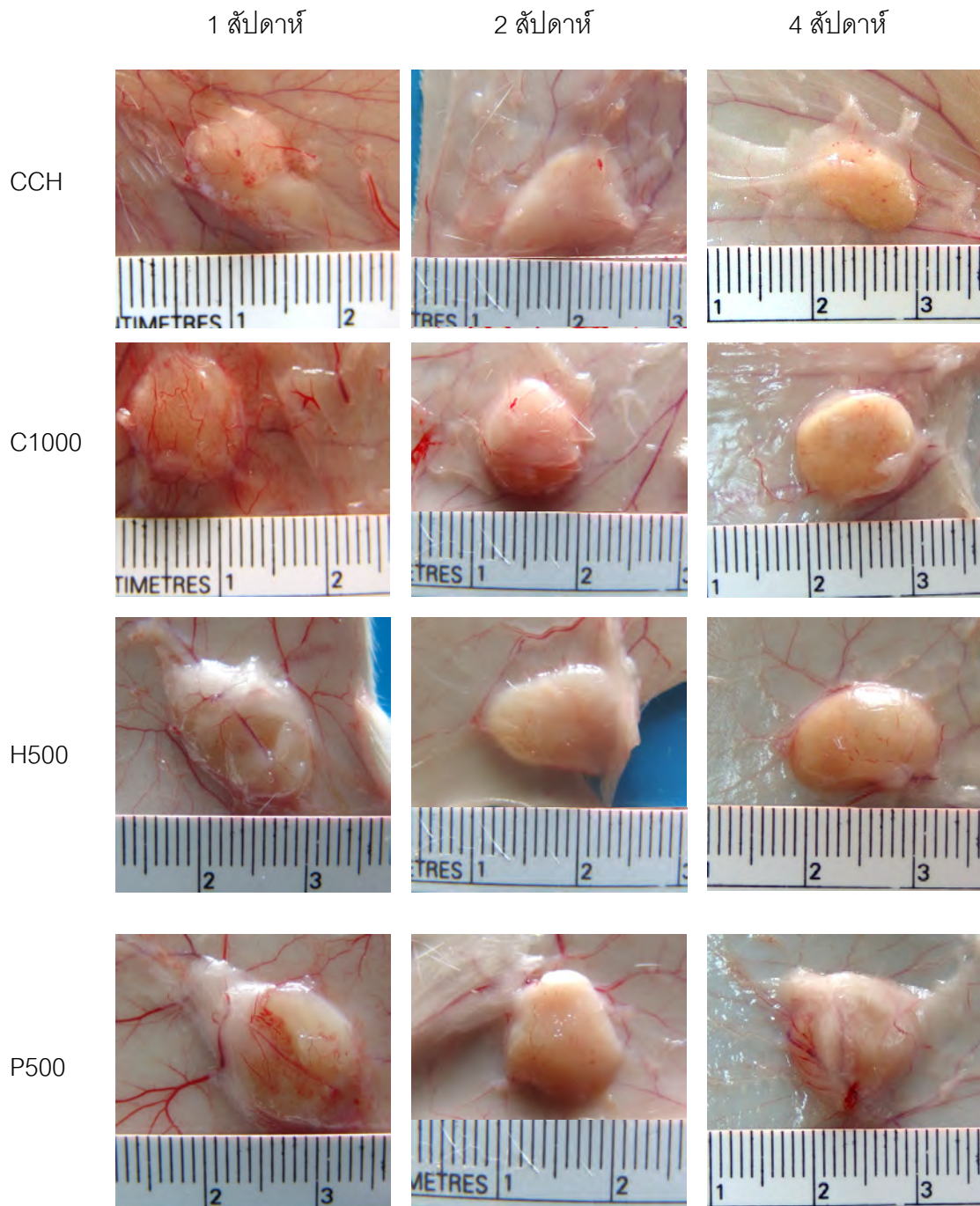
ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน และเจลาติน-โคโตซานตามลำดับ ดังเห็นได้จากกราฟที่แสดงความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนสูงสุดที่เวลา 6 วัน (รูปที่ 4.12)

4.2 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพภายในสัตว์ทดลอง (*In vivo* biocompatibility)

4.2.1 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในหนูทดลองพันธุ์ Wistar rat

จากผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ใต้ผิวหนังของหนูทดลองพันธุ์วิสตา (Wistar rat) เพศเมีย อายุ 3-5 สัปดาห์ โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ CCH เป็นกลุ่มควบคุม และ C1000, H500 และ P500 เป็นตัวแทนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมสารปรับปรุง เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีที่สุดภายในกลุ่มเดียวกันดังเห็นได้จากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ในงานวิจัยนี้ได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์พลาสมาจากเลือดของมนุษย์ปลูกถ่ายลงในหนูทดลอง ซึ่งทำให้เกิดการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของหนู ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการยับยั้ง (Inactivated) IgG ในพลาสมาของมนุษย์เพื่อยับยั้งการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของหนูโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที (Soltis และคณะ, 1978)

รูปที่ 4.13 แสดงภาพถ่ายขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชั้นที่ฝังอยู่บริเวณผิวหนังด้านหลังของหนูตัวเดียวกัน ขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์แนวโน้มลดลงหลังจากเวลา 4 สัปดาห์ และจากภาพถ่ายยังสังเกตเห็นว่าที่เวลา 1 สัปดาห์ กลุ่มควบคุมและ C1000 มีเส้นเลือดฝอยหุ้มบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์อย่างเห็นได้ชัด และที่เวลา 2 สัปดาห์ C1000, H500 และ P500 มีลักษณะนูนซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุมที่มีลักษณะแบนราบติดไปกับผิวหนัง เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์สังเกตเห็นว่ากลุ่มควบคุมมีขนาดเล็กลงอย่างชัดเจน แต่ใน C1000, H500 และ P500 นั้นมีขนาดเล็กลงเช่นเดียวกันแต่ลักษณะนูนขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และจากภาพถ่ายยังสังเกตเห็นผังพืดหุ้มอยู่รอบโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งแสดงถึงการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมในร่างกายตามธรรมชาติ ซึ่งอาจทำให้เกิดการขัดขวางการถ่ายเทสารอาหารที่จำเป็นเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์



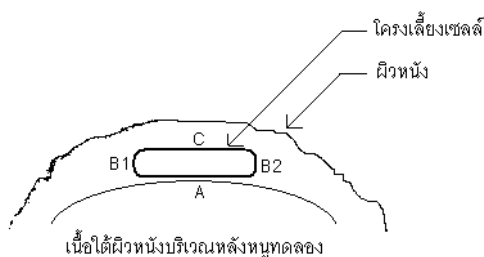
รูปที่ 4.13 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ 4 ชนิด โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (CCH), โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยไครโอปริซิพิเตท (C1000), พลาสมา (H500) และเกล็ดเลือดเข้มข้น (P500) หลังจากการปลูกถ่ายบนหลังหนูพันธุ์วิสตา (wistar rat) ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์

ผลการตรวจสอบชิ้นเนื้อในทางพยาธิวิทยา (Histological) ด้วยการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค Hematoxylin and Eosin (H&E) พบว่านิวเคลียสของเซลล์ถูกย้อมติดเป็นสีน้ำเงิน และไซโตพลาสซึมหรือคอลลาเจนถูกย้อมติดเป็นสีแดง (กัลยา ผลการกุล, 2534) ดังแสดงในภาพถ่ายรูปที่ 4.15-4.18 โดยเมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันที่เวลาต่างกันพบว่าเซลล์จะเริ่มเคลื่อนที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์จากขอบไปสู่ด้านใน จุดสีม่วงเข้มแสดงถึงนิวเคลียสของเซลล์ สีม่วงอ่อนแสดงถึงไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่เป็นคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่มีลักษณะเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ และสีชมพูเข้มแสดงคอลลาเจนเดิมของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ย้อมติด eosin

รูปที่ 4.15 แสดงถึงลักษณะความเปลี่ยนแปลงของกลุ่มควบคุมที่เวลาต่างๆ โดยมีระยะของบริเวณสีม่วงเพิ่มมากขึ้นตามเวลาซึ่งแสดงถึงปริมาณเซลล์ที่ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์และยังคงมองเห็นสีชมพูเข้มที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์เดิมอย่างชัดเจนซึ่งแสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีการถูกย่อยสลายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงด้วยโครีโอปริซิพิเตท, พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น (C1000, H500, P500) (รูป 4.16-4.18) มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงลักษณะของการย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์คล้ายกัน เซลล์สามารถย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 1 สัปดาห์และมีระยะทางเพิ่มขึ้นที่เวลา 2 สัปดาห์ แต่พบเปลี่ยนแปลงของระยะทางการย้ายที่ของเซลล์เพียงเล็กน้อยที่เวลา 4 สัปดาห์ เนื่องจากความไม่ต่อเนื่องของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เกิดช่องว่างขึ้น เป็นผลให้เซลล์ที่อยู่รอบๆไม่สามารถยึดเกาะและย้ายที่เข้ามาภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ดังนั้นภาพถ่าย H&E ที่แสดงลักษณะช่องว่างจึงสามารถยืนยันผลจากภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะนูนขึ้น (รูปที่ 4.13) ช่องว่างดังกล่าวอาจเกิดจากการอักเสบจากการปลูกถ่ายซึ่งมีการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์อย่างไม่ทั่วถึง หรืออาจเกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์จนเกิดน้ำและแรงดันที่ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดช่องว่าง ที่เวลา 8 สัปดาห์พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดมีขนาดลดลงและไม่พบช่องว่างในโครงเลี้ยงเซลล์เนื่องจากแรงบีบรัดจากเนื้อเยื่ออ่อน (fibrous tissue) รอบๆ โครงเลี้ยงเซลล์ จึงทำให้สังเกตเห็นสีชมพูเข้มของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ย่อยสลายอยู่ตรงกลางโครงเลี้ยงเซลล์และมีระยะที่เซลล์ย้ายที่น้อยกว่าที่เวลา 4 สัปดาห์ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม และยังมีอัตราการย่อยสลายเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอีกด้วย

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารปรับปรุงมีปริมาณเซลล์เคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้มากกว่าซึ่งแปรผลได้ในหน่วยของระยะทางที่เซลล์สามารถเคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ดังแสดงใน

ตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.19 ซึ่งแบ่งการเคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 4 ตำแหน่งดังแสดงได้ในรูป 4.14



รูปที่ 4.14 แสดงภาพตำแหน่งการย้ายที่ของเซลล์เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ฝังบนหลังหนุทดลอง โดยที่ A คือ ตำแหน่งที่โครงเลี้ยงเซลล์สัมผัสเนื้อใต้ผิวหนังของหนุ B1, B2 คือ ตำแหน่งโครงเลี้ยงเซลล์บริเวณด้านข้างซ้ายและขวา C คือ ตำแหน่งที่โครงเลี้ยงเซลล์สัมผัสผิวหนังด้านบนของหนุ

จากผลสรุปได้ว่าเซลล์จะสามารถเคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้มากขึ้นตามเวลาที่มากขึ้น และ โครงเลี้ยงเซลล์บริเวณที่ติดกับเนื้อด้านหลังของหนุจะมีปริมาณเซลล์มากกว่าด้านที่ติดกับผิวหนังด้านบนและบริเวณด้านข้างของโครงเลี้ยงเซลล์จะมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ต่างชนิดกันที่เวลาเดียวกันพบว่า เซลล์เคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เดิมสามารถปรับปรุงได้ในระยะทางใกล้เคียงกันและมากกว่ากลุ่มควบคุมคือ มีค่าอยู่ระหว่าง 98-231 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถเห็นผลได้อย่างชัดเจนที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของสารปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเลือดมนุษย์ที่มีองค์ประกอบของโกรสแฟคเตอร์ และ ไฟบริโนเจน ซึ่งเป็นสารเร่งให้มีการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยที่จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลต่อการสร้างเมทริกซ์ใหม่ขึ้นมาแทนที่โครงเลี้ยงเซลล์เดิมที่สลายตัวไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Croveti และคณะในปี 2004 ที่ทำการศึกษาพบว่า PRP และโครโอปริซีฟิเตทของมนุษย์มีผลอย่างมากในการช่วยให้บาดแผลในกลุ่มตัวอย่าง (มนุษย์) สามารถลดขนาดลงได้มากกว่า 50% เนื่องมาจากผลของโกรสแฟคเตอร์ PDGF, TGF- β จากเกล็ดเลือดที่เร่งให้เกิดการย้ายและเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผล (Enochh, 2005) และเมทริกซ์ที่สร้างจากไฟโบรเนคตินที่เปลี่ยนรูปมาจากไฟบริโนเจนในโครโอปริซีฟิเตทและพลาสมา ซึ่งเป็นโครงสร้างให้เซลล์ยึดเกาะและย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ (Valbonesi, 2006) เช่นเดียวกับในรายงานของ Qiu และคณะในปี ค.ศ. 2006 ที่ศึกษาผลของพลาสมาไฟโบรเนคตินที่ได้จากโครโอปริซีฟิเตทของมนุษย์ในการรักษาบาดแผลของหนุที่เป็นโรคเบาหวานพบว่า พลาสมาไฟโบรเนคตินสามารถ

เหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มการย้ายที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และแมคโครฟาจส์ การเกิดหลอดเลือดใหม่ การสร้างคอลลาเจน และการสร้างชั้นหนังกำพร้า

จากการวิเคราะห์ผลของระยะทางที่เซลล์สามารถเคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ (ตารางที่ 4.3) ในกลุ่มควบคุมมีระยะการย้ายที่ของเซลล์คงที่ที่อยู่ในช่วง 23-25 ไมโครเมตร ที่เวลา 2-8 สัปดาห์ ในขณะที่ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงทั้ง 3 ชนิดมีระยะทางการย้ายที่ของเซลล์เพิ่มขึ้นที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์ใกล้เคียงกันในช่วง 87-130 ไมโครเมตร และมีค่าลดลงในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 30-50 ไมโครเมตร เนื่องจากข้อจำกัดในการถ่ายเทสารอาหาร โกรสแพคเตอร์ และออกซิเจนผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ที่หนาเกินไป รวมถึงความหนาของชั้นเนื้อเยื่อผังผืดที่หุ้มอยู่รอบโครงเลี้ยงเซลล์ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารดังกล่าวมาใช้ในการเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ได้ โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ทดสอบมีความหนาประมาณ 340-400 ไมโครเมตร ในขณะที่เซลล์สามารถย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้เพียง 12-160 ไมโครเมตร ข้อจำกัดอีกประการอาจเกิดขึ้นจากความเป็นพิษเนื่องจากความเป็นกรดของกรดอะซิติกที่อาจตกค้างจากขั้นตอนการขึ้นรูปที่ยังคงเหลืออยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ขนาดที่ลดลงของโครงเลี้ยงเซลล์เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายและแรงบีบรัดจากเนื้อเยื่อผังผืดโดยรอบ รวมทั้งการอักเสบที่เกิดขึ้นเนื่องจากการใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดของมนุษย์ปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลองซึ่งมีสายพันธุ์ต่างกัน (Xenotransplantation) ถึงแม้จะมีการยับยั้งหมู่ IgG แล้วก็ตาม และการอักเสบที่เกิดขึ้นอาจเกิดเนื่องจากขั้นตอนการทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อด้วยการใช้แอลกอฮอล์ 70% ที่อาจไม่เพียงพอสำหรับการทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อ เนื่องจากการอักเสบของบาดแผลมีผลอย่างมากในการรักษาบาดแผล เพราะเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนและสร้างเมทริกซ์ใหม่ได้หลังจากผ่านระยะการอักเสบไปแล้ว ดังนั้นถ้าสามารถลดระยะการอักเสบลงก็สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเมทริกซ์ใหม่เร็วขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.1 และเมื่อพิจารณาถึงตำแหน่งของเซลล์ที่กระจายอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่สัปดาห์ที่ 8 พบว่าเซลล์สามารถย้ายที่เข้าไปได้ทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุม แต่มีปริมาณเซลล์ไม่หนาแน่นเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์ที่พบในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุง แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะการย้ายที่ของเซลล์เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงกลับพบว่า เซลล์ไม่สามารถย้ายที่เข้าไปถึงกึ่งกลางของโครงเลี้ยงเซลล์ ดังเห็นได้จากสีแดงของคอลลาเจนที่รวมตัวกันอยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ที่แสดงในรูป 4.16-4.18 และเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ที่ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงทั้ง 3 ชนิด เซลล์สามารถย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมเกล็ดเลือดเข้มข้น (P500) ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโครโอปริซิพิเตทและพลาสมา ซึ่งแสดงได้จากภาพถ่าย H&E ที่แสดงว่า

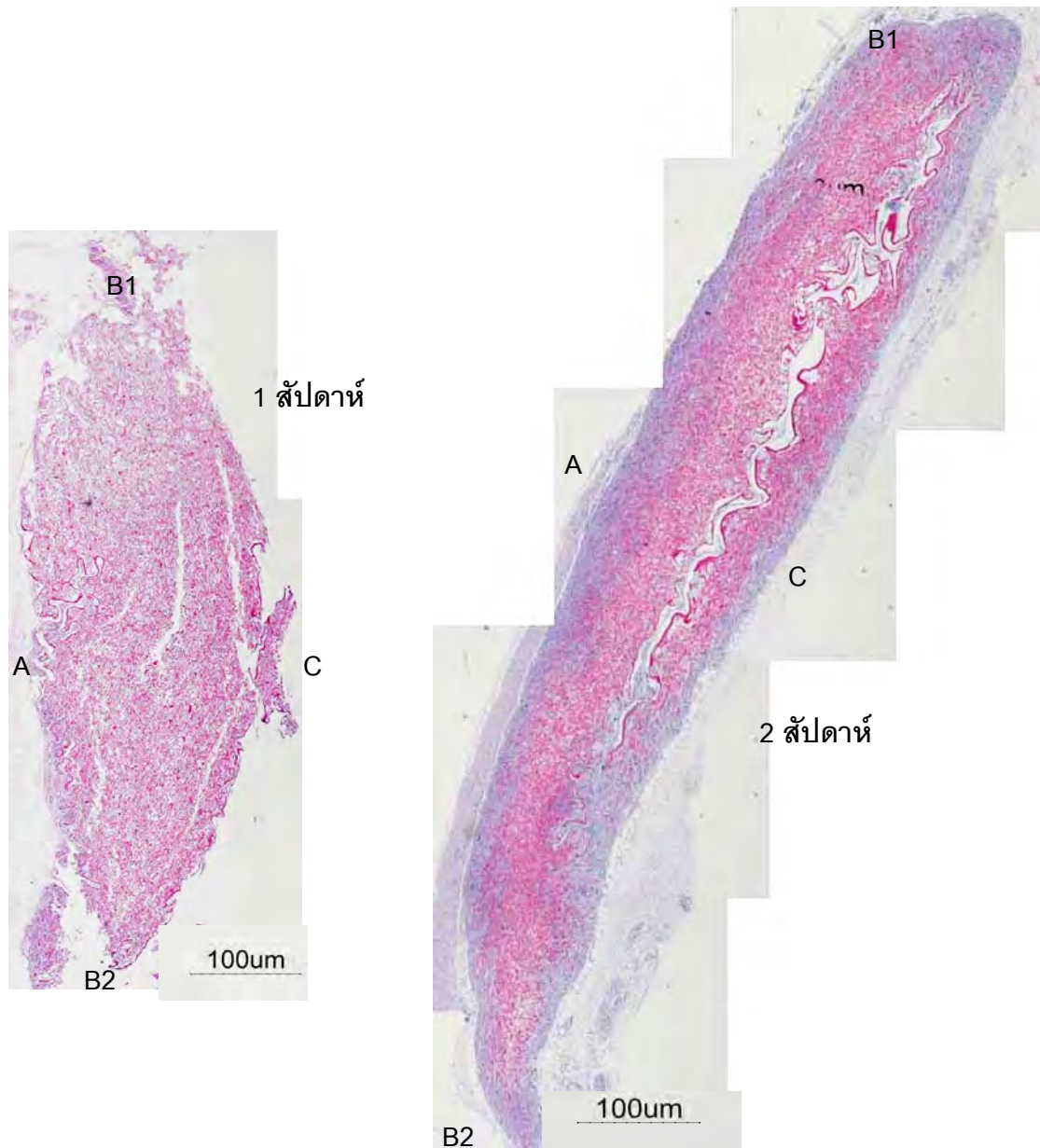
เซลล์สามารถย้ายที่เข้าไปถึงบริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ P500 (รูปที่ 4.18) แต่ไม่สามารถย้ายที่เข้าสู่กึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ C1000 และ H500 จากข้อจำกัดที่กล่าวมาแล้วอาจทำการปรับปรุงด้วยการลดความหนาของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มความสามารถในการถ่ายเทสารอาหาร รวมถึงการใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดของสัตว์ทดลองเองเพื่อลดปัญหาการอักเสบเนื่องจากการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

นอกเหนือจากลักษณะการย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ของเซลล์แล้ว ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการพิจารณาข้อดีของโครงเลี้ยงเซลล์คือ การเกิดเนื้อเยื่อและเส้นเลือดใหม่ขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยที่เนื้อเยื่อใหม่ที่เกิดขึ้นจะเกิดจากการรวมตัวกันของคอลลาเจนไฟบริลซึ่งถูกสร้างโดยเซลล์ จากภาพถ่าย H&E ของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิดที่ฝังในหนูทดลองเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ สามารถสังเกตเห็นเส้นเลือดใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นช่องภายในบรรจุด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงและคอลลาเจนไฟบริลที่มีลักษณะเป็นสีชมพูอ่อนซึ่งแตกต่างกับส่วนของสีแดงเข้มของคอลลาเจนจากโครงเลี้ยงเซลล์ดังแสดงได้ดังรูป 4.20-4.23 เมื่อพิจารณาในกลุ่มควบคุมสามารถสังเกตเห็นเส้นเลือดใหม่จำนวนมากแต่ยังพบลักษณะของคอลลาเจนไฟบริลไม่ชัดเจน เซลล์ยังคงยึดเกาะอยู่บนโครงคอลลาเจนในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงมีปริมาณอยู่มาก และเมื่อพิจารณาลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เดิมสารปรับปรุงทั้งสามชนิด สามารถสังเกตเห็นคอลลาเจนไฟบริลที่สร้างและปลดปล่อยออกมาจากเซลล์อย่างชัดเจน ซึ่งการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟบริลที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นั้นมีลักษณะไม่เป็นระเบียบ (random) และยังสามารถเห็นว่าเซลล์ที่ย้ายที่เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์แทรกตัวอยู่ระหว่างคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่ แต่จำนวนของเส้นเลือดใหม่ยังพบไม่มาก และยังสามารถได้ว่าคอลลาเจนไฟบริลที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ที่เวลา 8 สัปดาห์จะมีลักษณะชัดเจน และมีปริมาณมากกว่าที่เวลา 4 สัปดาห์

ผลของความเข้ากันได้ทางชีวภาพทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง แสดงถึงผลของผลิตภัณฑ์จากเลือดของมนุษย์ที่ใช้ในการปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะ เพิ่มจำนวน และย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ รวมถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อและเส้นเลือดใหม่ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงถึงผลของผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ซึ่งเป็นแหล่งของไซโตไคน์และโกรสแฟคเตอร์ที่เป็นตัวเร่งและควบคุมให้เกิดการรักษาบาดแผลด้วยการเกิดเนื้อเยื่อใหม่จากคอลลาเจนเมทริกซ์ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ที่อยู่ในบริเวณบาดแผล แต่จากข้อแตกต่างของวิธีการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยที่ผ่านมา คือ การผสมผลิตภัณฑ์โครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นจากเลือดมนุษย์ลงในสารละลายที่ใช้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการขึ้นรูปด้วยการทำแห้งด้วย

ความเย็น แล้วจึงผ่านขั้นตอนการเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิ จากกระบวนการดังกล่าวอาจส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนของโกรสแพคเตอร์และไซโตคายนีที่อยู่ในผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์เกิดการเสื่อมสภาพ (Denatured protein) ไปจนไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ แต่จากผลการทดลองยังคงแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงด้วยผลิตภัณฑ์จากเลือดมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการเกิดคอลลาเจนและเส้นเลือดใหม่ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลของหมู่ RGD-peptide ที่เป็นตำแหน่งเริ่มต้นในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์ (Ye และ คณะ, 2000) ซึ่งพบได้ในโมเลกุลของไฟบริโนเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของผลิตภัณฑ์โครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้น (Brecher, 2005) ที่ผสมอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ จึงส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกปรับปรุงด้วยผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ทั้งสามชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการเกิดเนื้อเยื่อใหม่และการหายของบาดแผล

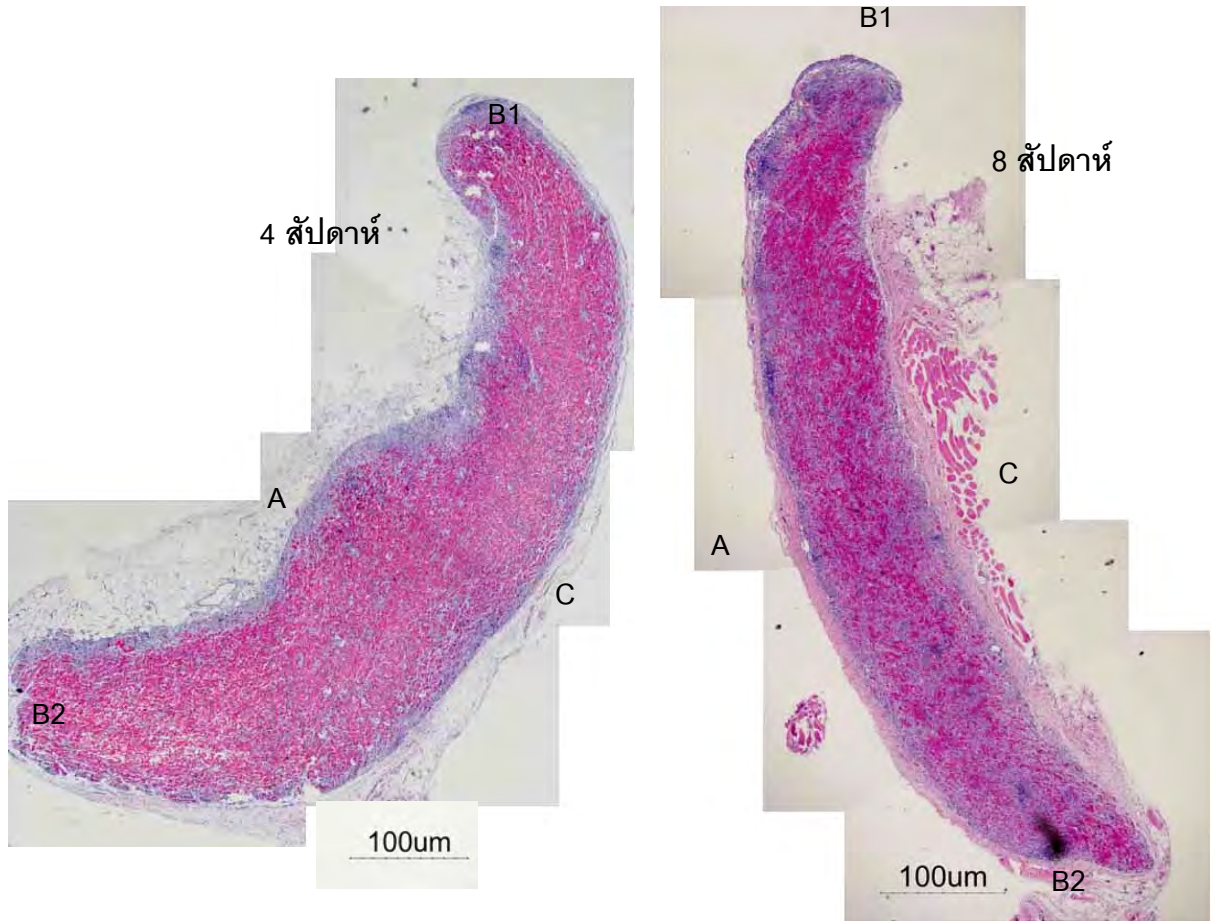
Control



รูปที่ 4.15 ภาพถ่ายโครมเล็งเซลล์กลุ่มควบคุม (CCH) ที่ฝังในหนูพันธุ์วีสตาร์เป็นเวลา 1, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E โดยแสดงของโครมเล็งเซลล์ดังนี้

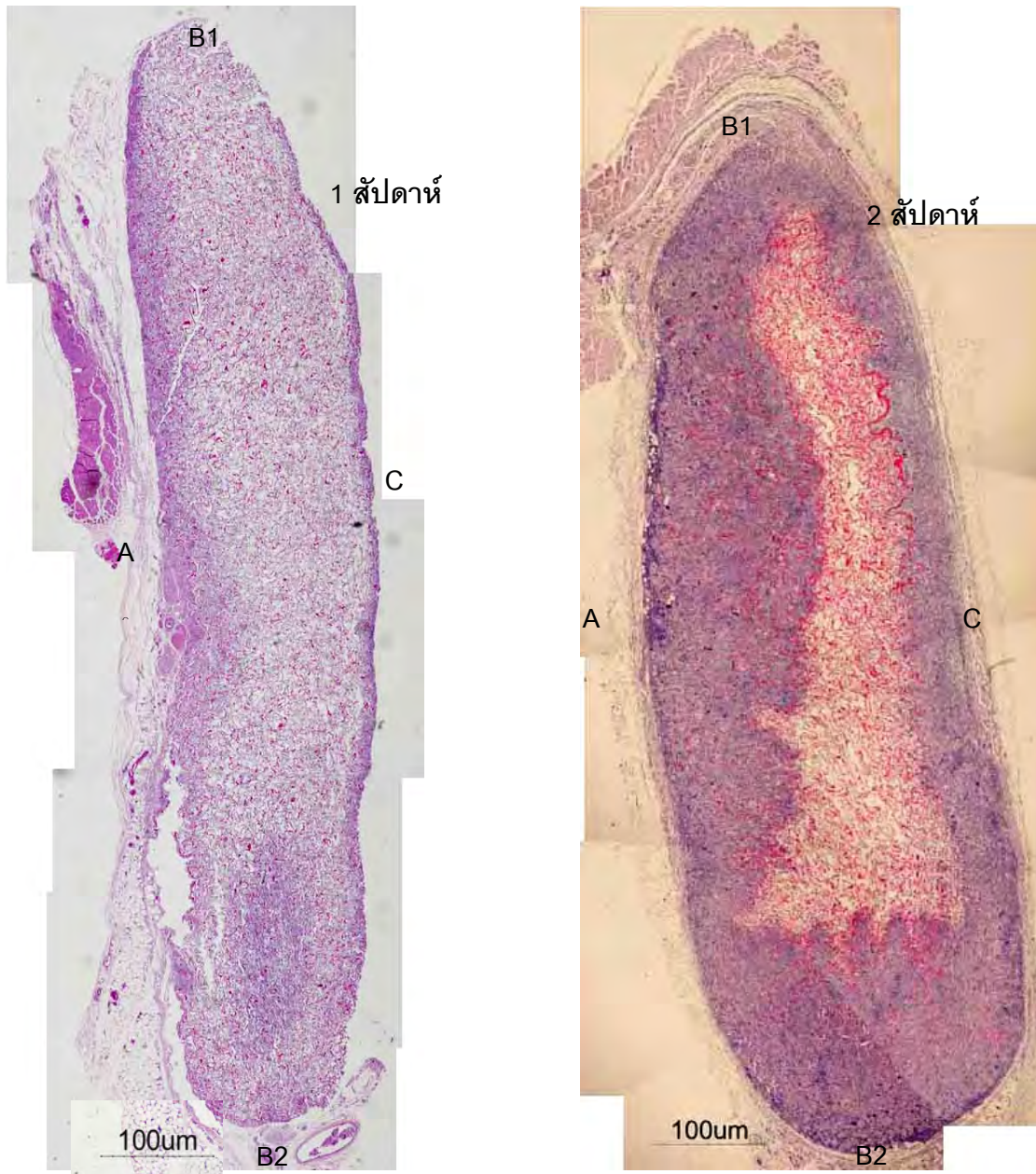
A: สัมผัสเนื้อใต้ผิวหนัง; B1 และ B2: ด้านข้างโครมเล็งเซลล์; C: สัมผัสผิวหนัง

Control



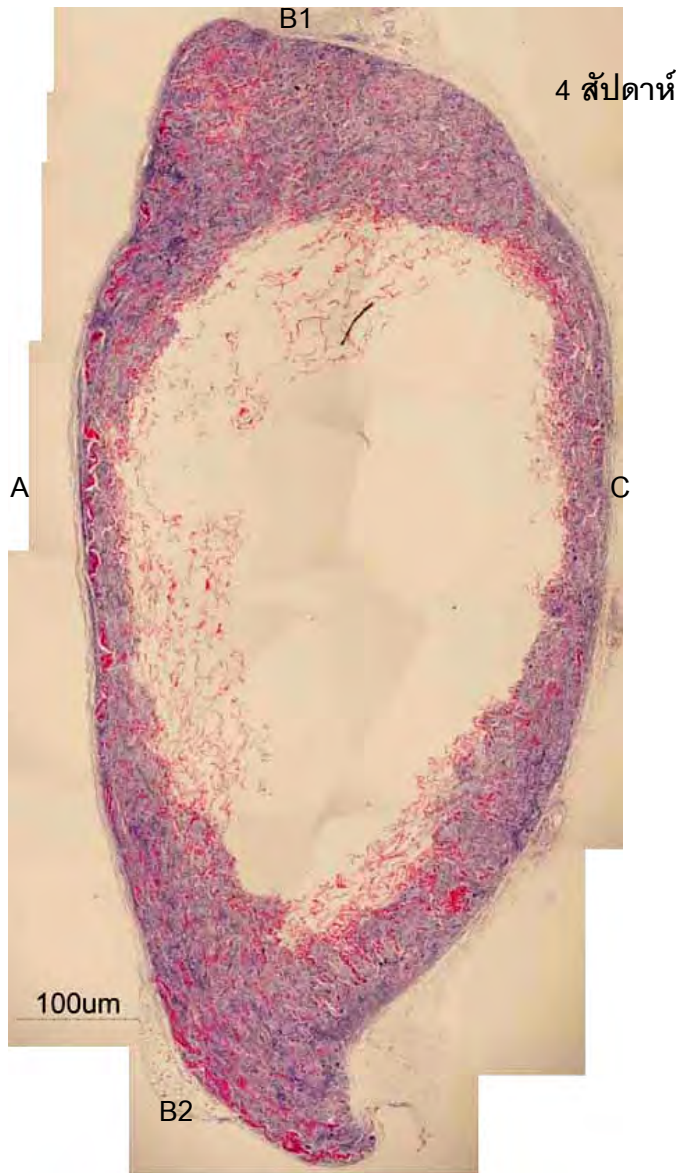
รูปที่ 4.15 (ต่อ)

C1000



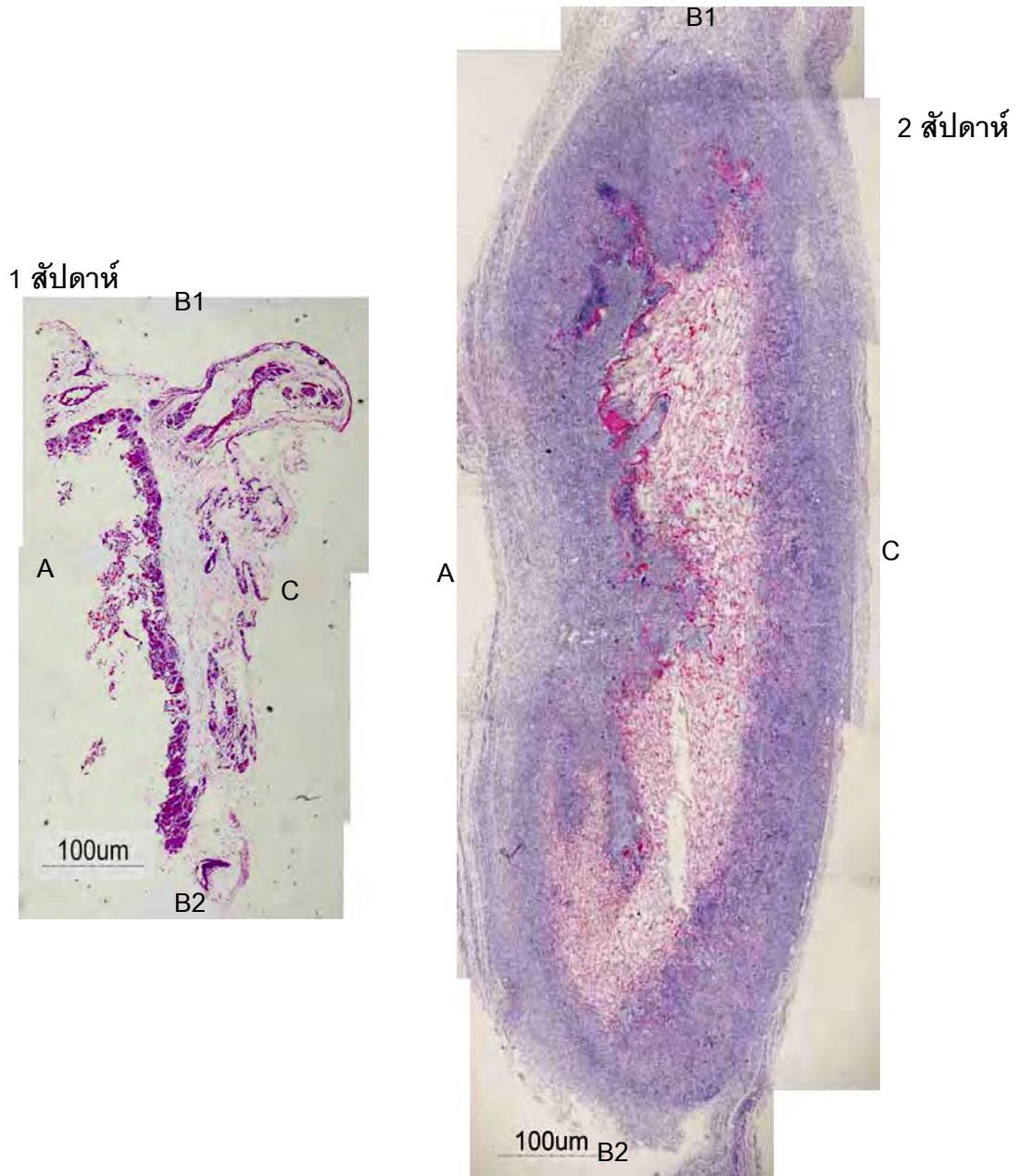
รูปที่ 4.16 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโปรตีนจากโคริโอปริซิพีเตท 1000 มิลลิกรัม (C1000) ที่ฝังในหนูก้อนอุ้งนิตารที่เวลา 1, 2 และ 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E

C1000



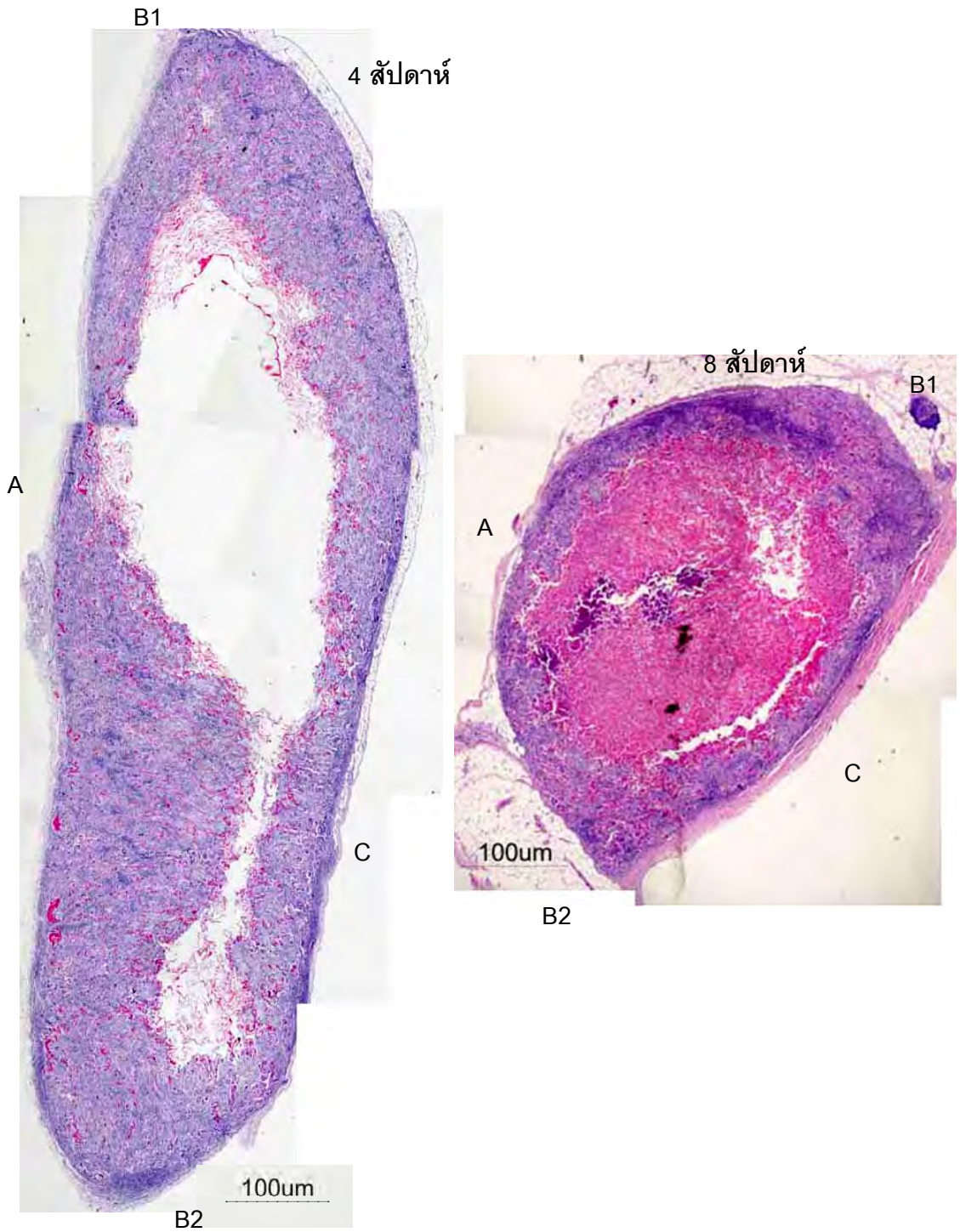
รูปที่ 4.16 (ต่อ)

H500



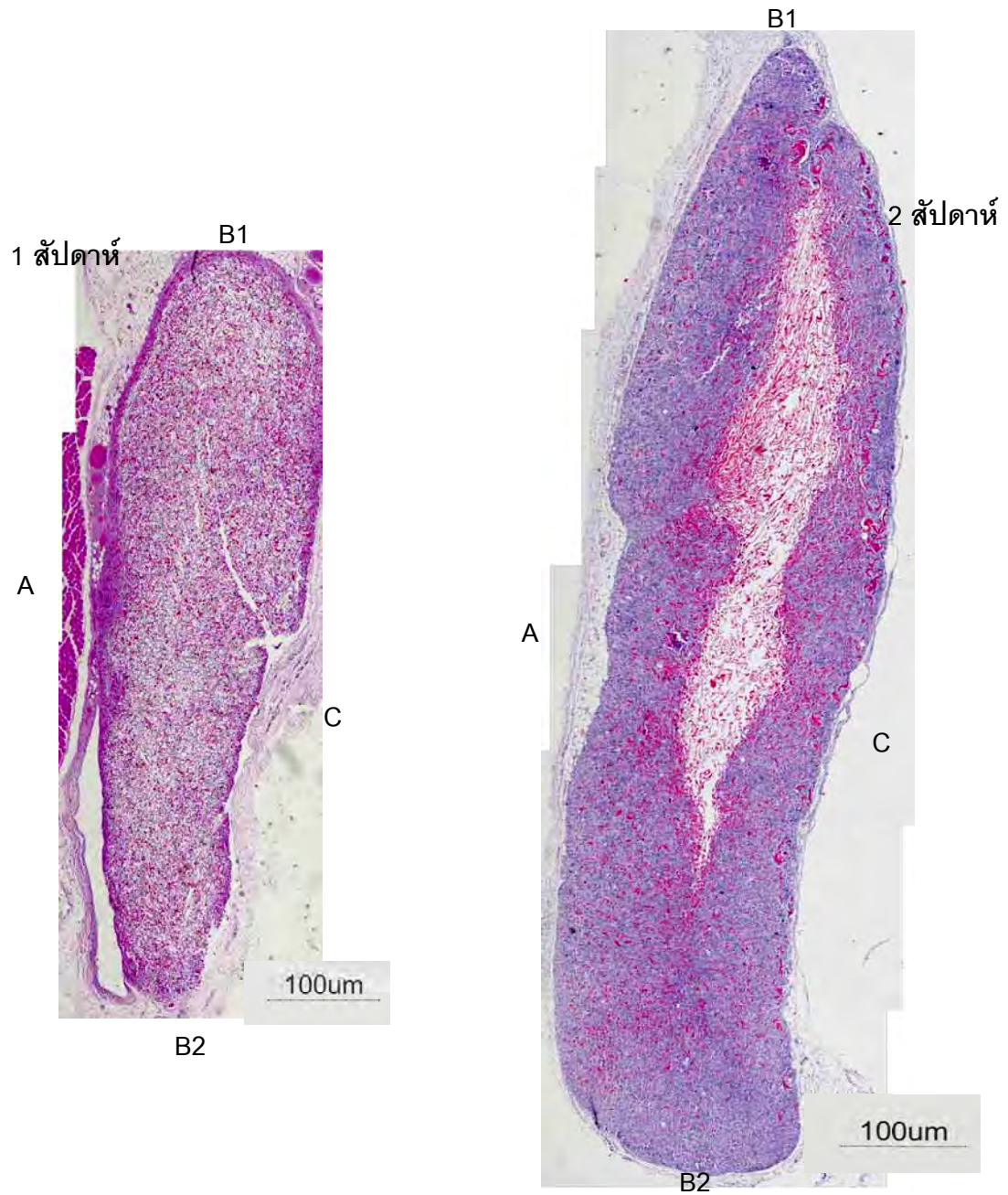
รูปที่ 4.17 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโปรตีนจากพลาสมา 500 มิลลิกรัม (H500) ที่ฝังในหนู พันธุ์วีสตาร์ที่เวลา 1, 2 และ 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E

H500



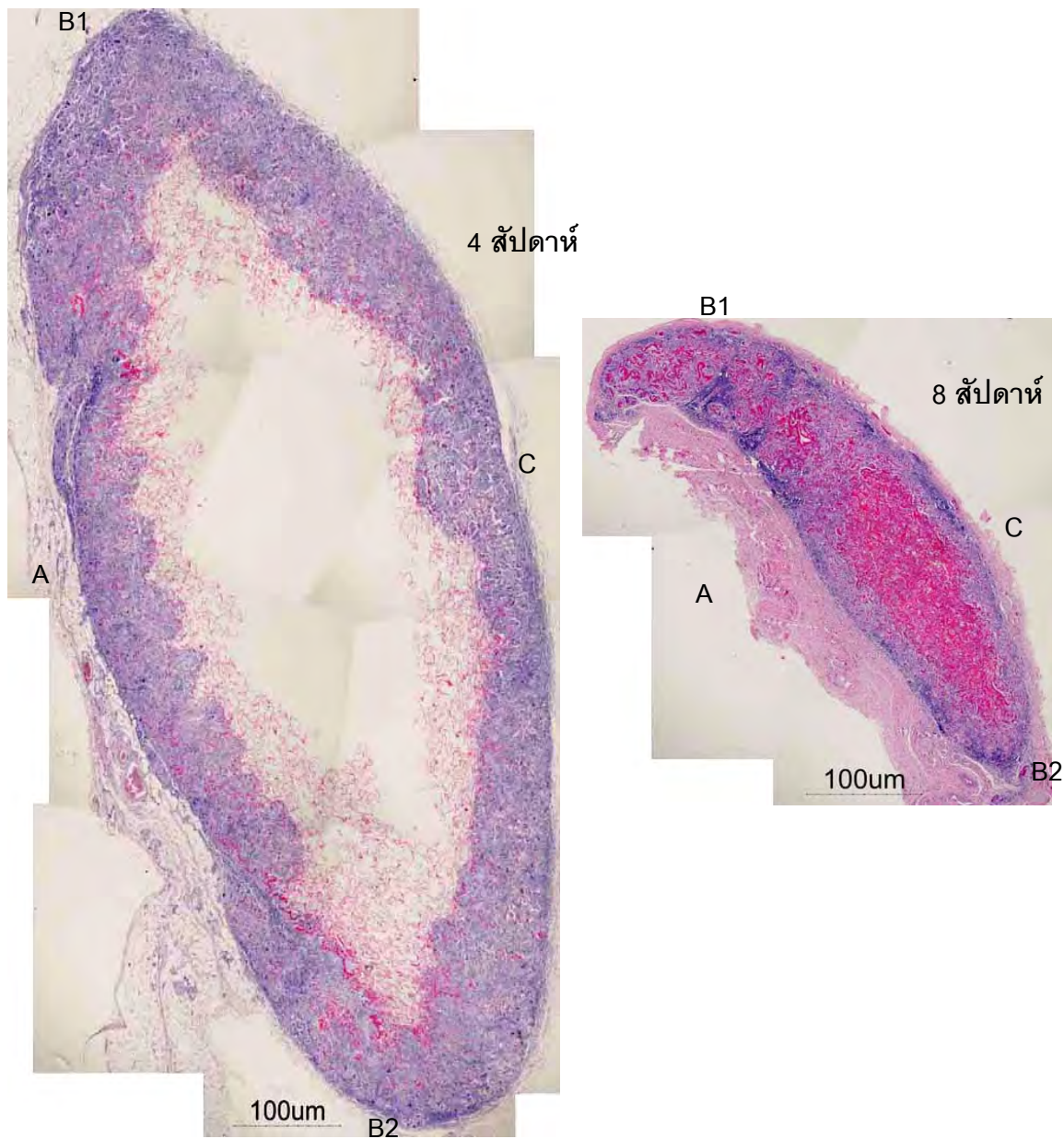
รูปที่ 4.17 (ต่อ)

P500



รูปที่ 4.18 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมโปรตีนจากเกล็ดเลือดเข้มข้น 500 มิลลิกรัม (P500) ที่ฝังในหนูพันธุ์istar ที่เวลา 1, 2 และ 4 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E

P500



รูปที่ 4.18 (ต่อ)

ตารางที่ 4.3 แสดงระยะทางที่เซลล์เคลื่อนเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์จากของเข้าสู่ด้านในมีหน่วยเป็นไมโครเมตร

โครงเลี้ยง เซลล์	เวลา (สัปดาห์)	บริเวณสัมผัสโครงเลี้ยงเซลล์			
		สัมผัสเนื้อใต้ ผิวหนัง:A	บริเวณด้านข้าง		สัมผัสผิวหนัง ด้านใน:C
			ซ้าย:B1	ขวา:B2	
CCH	1	12.08±3.53	5.64±2.14	7.17±1.14	4.76±0.96
	2	25.71±5.99	12.67±3.65	16.67±2.35	15.24±4.65
	4	26.07±6.59	11.50±1.36	12.50±5.00	10.71±2.78
	8	23.53±8.31	10.00±3.35	47.06±9.75	22.68±8.26
C1000	1	27.76±14.06	3.43±1.27	5.71±2.85	7.35±2.24
	2	162.41±65.62	131.58±24.68	231.58±65.52	98.50±40.96
	4	87.21±21.45	195.79±52.42	152.63±50.61	80.45±24.44
	8	50.84±7.14	44.12±9.06	110.00±27.71	22.27±7.75
H500	1	27.03±4.12	6.49±4.52	N/A	N/A
	2	147.62±40.87	180.95±59.76	95.24±27.96	128.57±11.98
	4	114.79±62.25	114.28±20.04	104.29±37.66	74.48±19.49
	8	51.20±9.60	82.22±18.06	69.44±17.12	35.32±10.23
P500	1	14.67±7.77	14.05±2.26	7.03±1.48	7.72±2.43
	2	91.67±16.03	65.56±24.02	143.89±44.28	61.11±13.88
	4	130.16±26.42	162.22±19.40	121.11±25.88	113.49±28.84
	8	30.36±8.40	15.17±14.48	24.55±18.08	33.93±12.68

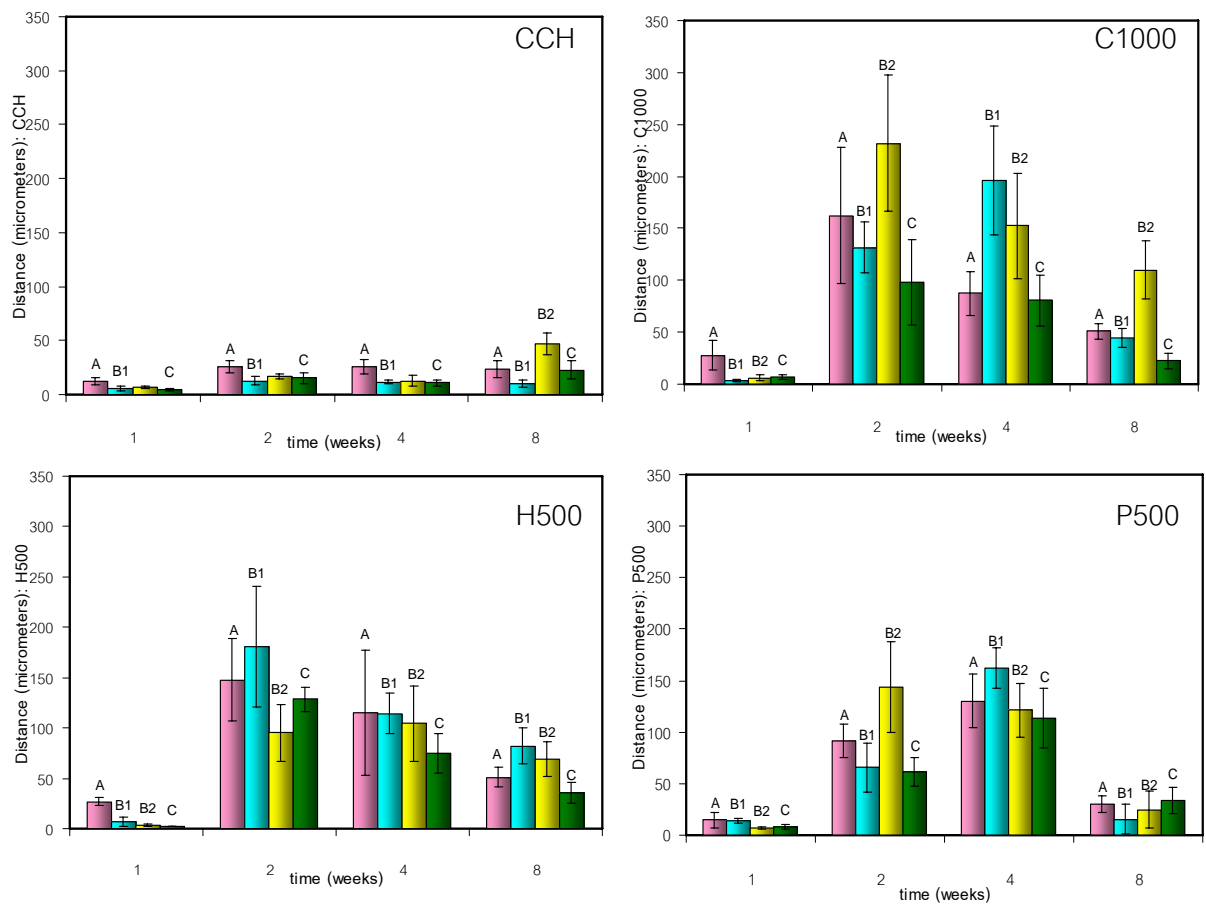
หมายเหตุ N/A ไม่สามารถวัดระยะได้

CCH: โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (กลุ่มควบคุม)

C1000: โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากโครโอปรีซิพิเตท

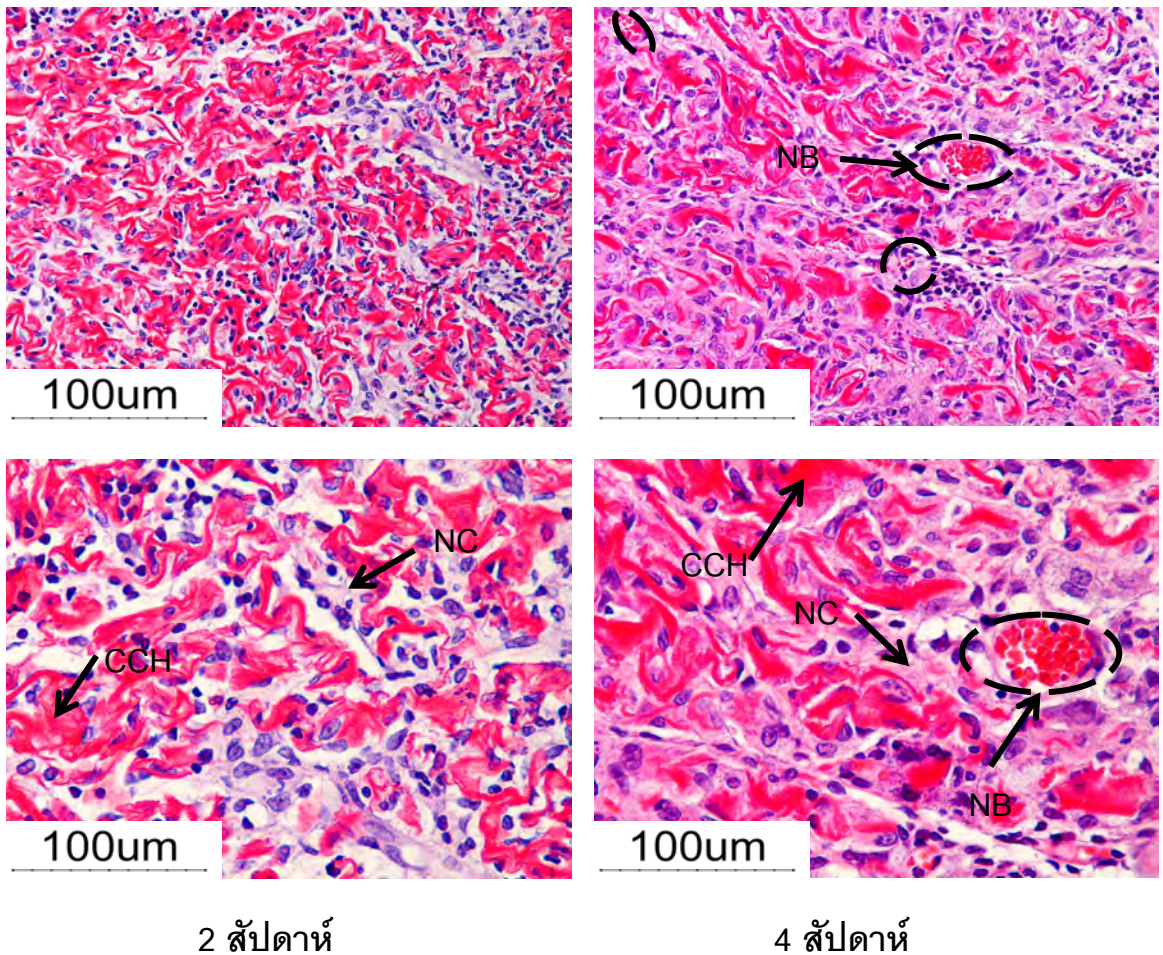
H500: โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากพลาสมา

P500: โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากเกล็ดเลือดเข้มข้น



รูปที่ 4.19 ระยะทางที่เซลล์ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (CCH), โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยโครโอปรีซิพิเตท (C1000), พลาสมา (H500) และเกล็ดเลือดเข้มข้น (P500) ที่ตำแหน่งต่างๆ หน่วยเป็นไมโครเมตร

Control

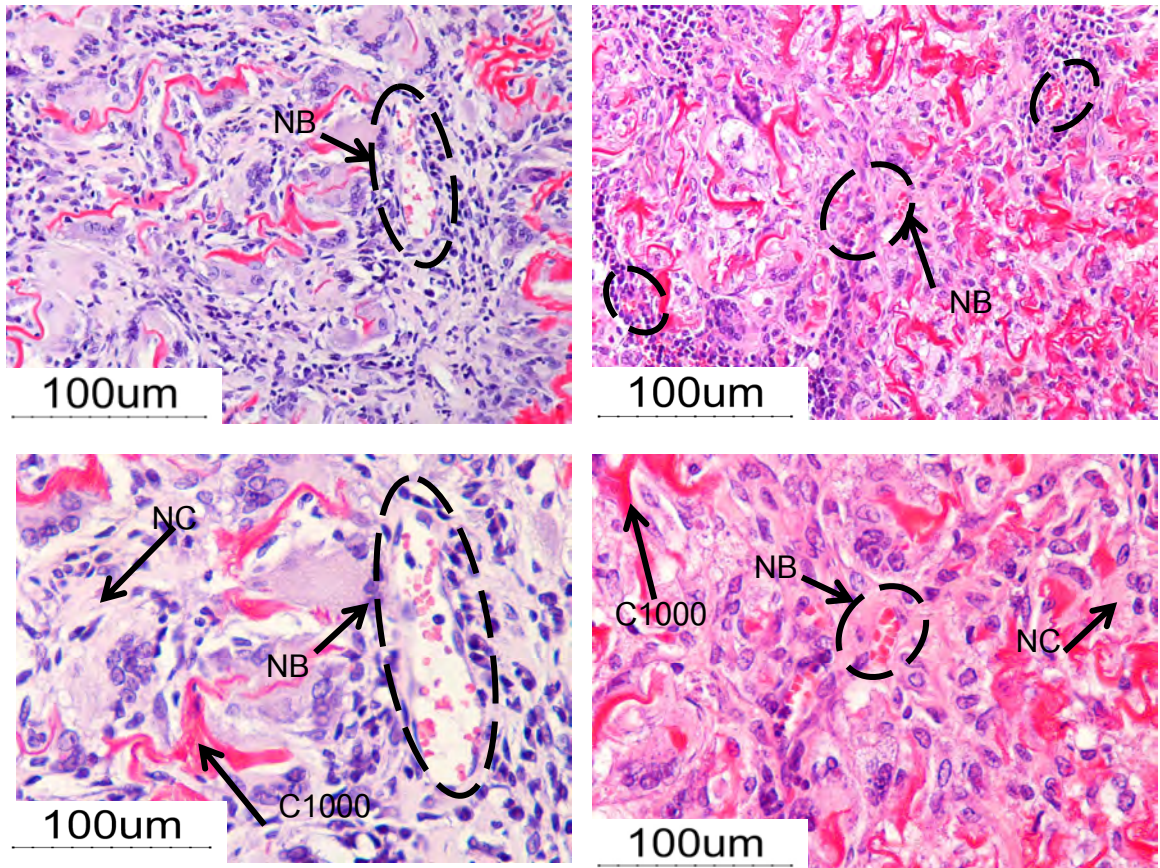


2 สัปดาห์

4 สัปดาห์

รูปที่ 4.20 ภาพถ่ายบางส่วนของกลุ่มควบคุมที่ฝังในหนูทดลองที่เวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า โดยที่ NB คือ เส้นเลือดใหม่ (Neo Blood vessel), NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (Neocollagen) และ CCH คือ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

C1000

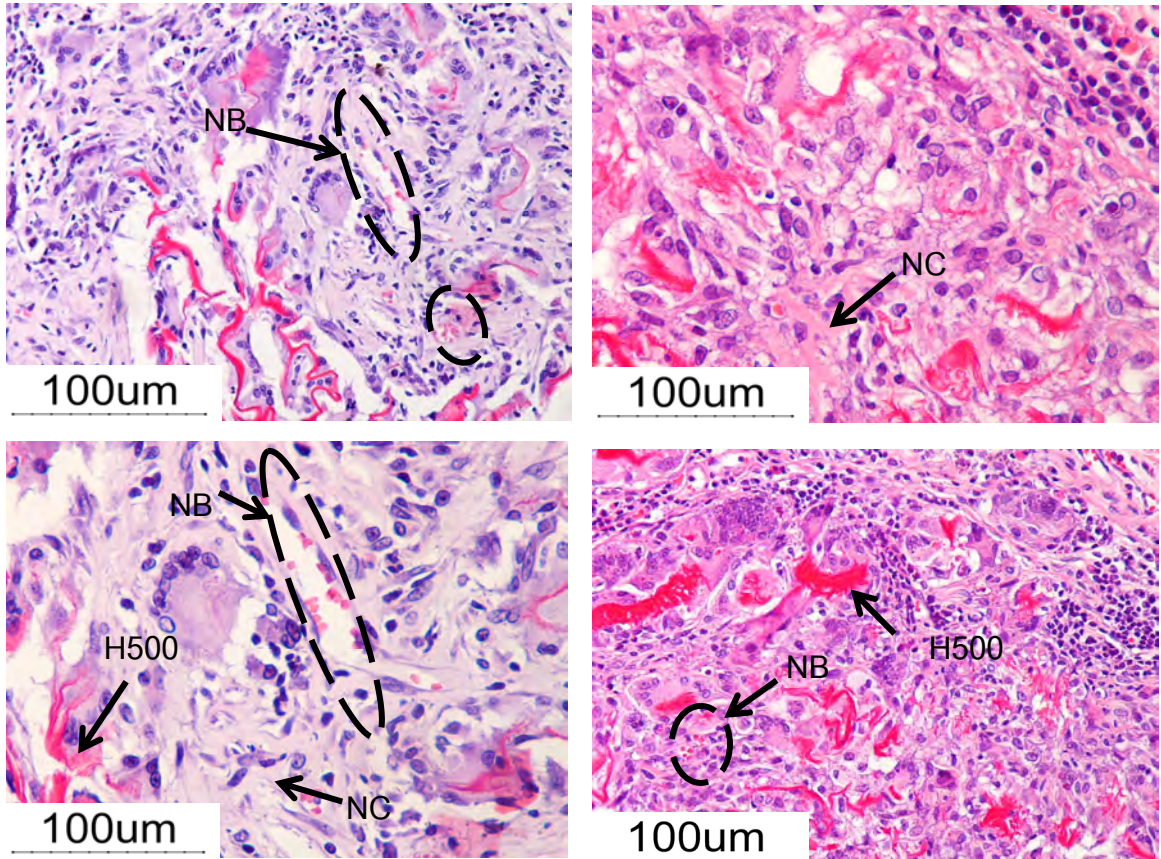


2 สัปดาห์

4 สัปดาห์

รูปที่ 4.21 ภาพถ่ายบางส่วนของC1000 ที่ฝังในหนูทดลองที่เวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า โดยที่ NB คือ เส้นเลือดใหม่, NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (Neocollagen) และ C1000 คือ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโครโอปรีซิพิเตทที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

H500

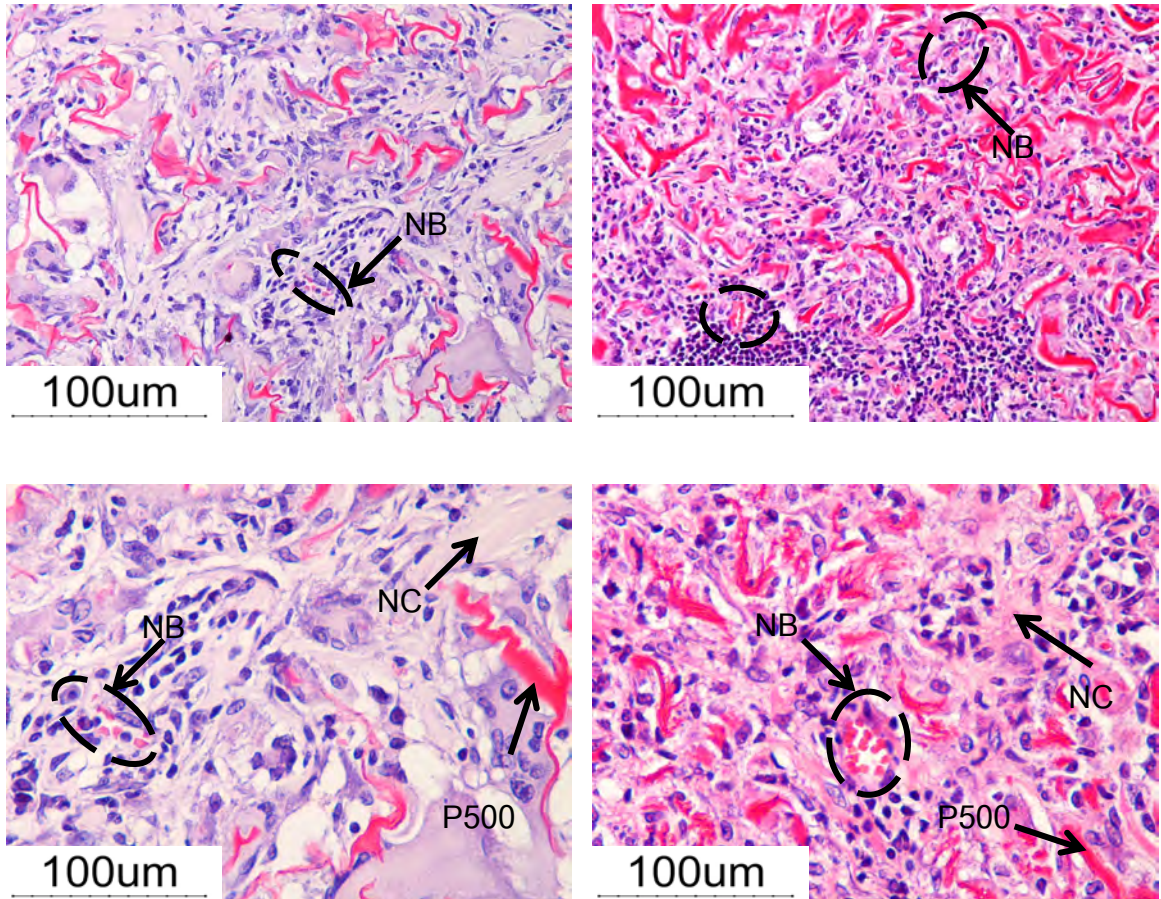


2 สัปดาห์

4 สัปดาห์

รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายบางส่วนของ H500 ที่ฝังในหนูทดลองที่เวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า โดยที่ NB คือ เส้นเลือดใหม่, NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (Neocollagen) และ H500 คือ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยพลาสมาที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

P500



2 สัปดาห์

4 สัปดาห์

รูปที่ 4.23 ภาพถ่ายบางส่วนของ P500 ที่ฝังในหนูทดลองที่เวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า โดยที่ NB คือ เส้นเลือดใหม่, NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (Neocollagen) และ P500 คือ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ปรับปรุงด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้นที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

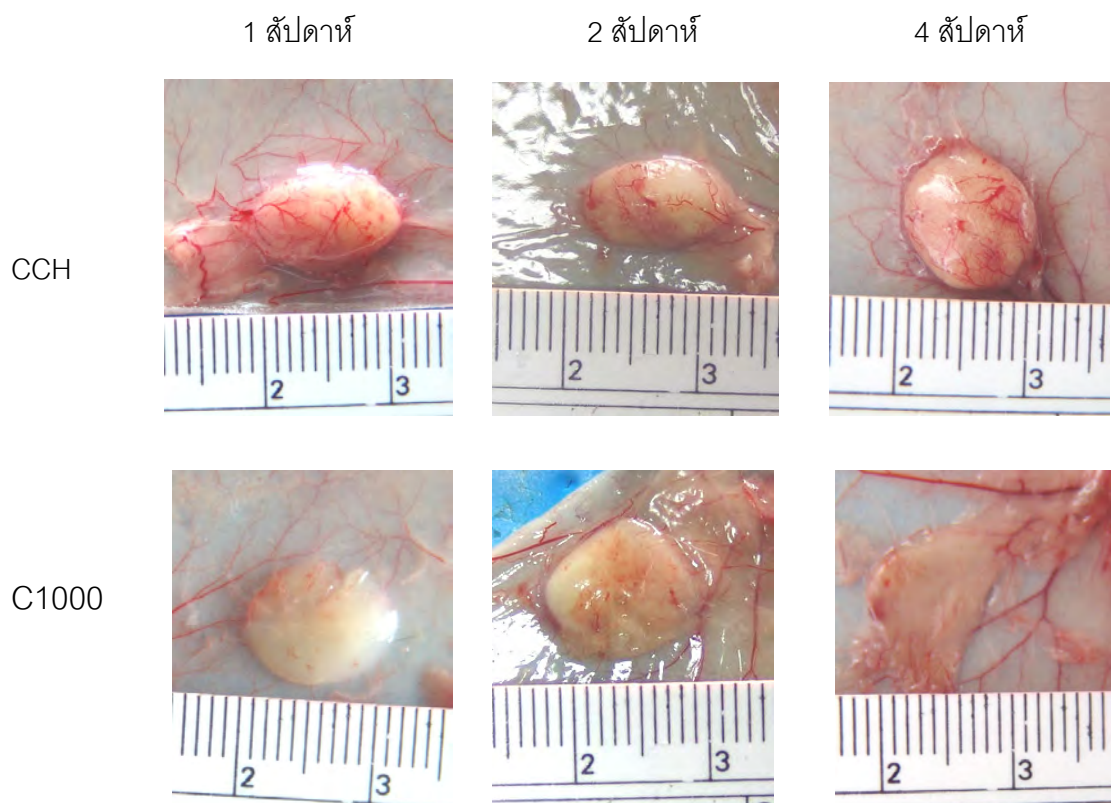
4.4.2 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในหนูทดลองพันธุ์ Nude mice Bulb C/nu

จากข้อจำกัดของการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของหนูทดลองที่มีต่อผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ที่ปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลองซึ่งมีสายพันธุ์ต่างกัน จึงนำไปสู่การหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าวด้วยเลือกใช้สัตว์ทดลองที่ไม่มีระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นด้วยการฝังโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ไม่ได้รับการปรับปรุง (CCH) โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ได้รับการปรับปรุงด้วยผลิตภัณฑ์โครีโอปริซิพิเตท (C1000), พลาสมา (H500) และ เกล็ดเลือดเข้มข้น (P500) ของมนุษย์ ลงบนหนูทดลองพันธุ์ nude mice bulb/C โดยที่ลักษณะการฝังโครงเลี้ยงเซลล์แสดงได้ในรูปที่ 3.5 (ข)

จากภาพถ่ายรูปที่ 4.24 ในหนูทดลองที่ฝัง CCH และ C1000 สามารถสังเกตเห็นเส้นเลือดและพังผืดที่หุ้มอยู่โดยรอบโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อพิจารณาขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ CCH มีขนาดใหญ่ขึ้นที่เวลา 4 สัปดาห์ ในขณะที่ C1000 สามารถสังเกตเห็นขนาดที่ลดลงอย่างชัดเจน และจากผลการทดลองในหนูที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ H500 และ P500 เกิดการอักเสบและเกิดหนองขึ้นบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ไม่เพียงพอจึงอาจปรับเปลี่ยนมาใช้วิธีการฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ หรืออาจเกิดขึ้นเนื่องจากผลของผลิตภัณฑ์พลาสมา และ เกล็ดเลือดเข้มข้น เนื่องจากหนูทดลองพันธุ์ nude mice bulb C เป็นหนูที่ไวต่อการอักเสบและติดเชื้อเนื่องจากไม่มีระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ไม่สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงเลี้ยงเซลล์ H500 และ P500 ได้

จากการตรวจสอบชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค H&E พบว่าเซลล์สามารถย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดได้ จากรูปที่ 4.25 เซลล์สามารถย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ CCH ได้ และสามารถสังเกตเห็นการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ ตั้งแต่สัปดาห์แรก และในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 โครงเลี้ยงเซลล์ถูกย่อยสลายจนถึงกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์แต่ไม่สามารถสังเกตเห็นเซลล์ย้ายที่เข้ามาบริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ได้ เมื่อพิจารณาภาพถ่าย H&E ของ C1000 ในรูปที่ 4.26 พบว่าเซลล์ไม่สามารถย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ และ โครงเลี้ยงเซลล์ยังไม่ถูกย่อยสลายในสัปดาห์แรก ซึ่งสังเกตได้จากสีแดงเข้มที่แสดงถึงคอลลาเจนเดิมของโครงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อพิจารณาที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์พบว่าเซลล์สามารถย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างชัดเจน และที่เวลา 4 สัปดาห์พบว่าเซลล์ไม่สามารถย้ายที่เข้าสู่บริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ซึ่งสังเกตได้จากสีแดงเข้มบริเวณกึ่งกลางโครงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อพิจารณาการเกิดคอลลาเจนและเส้นเลือดใหม่พบว่าที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์สามารถสังเกตเห็นคอลลาเจนไฟบริลและเส้นเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ในโครงเลี้ยงเซลล์บริเวณที่เซลล์ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ดังแสดงได้จากภาพถ่ายกำลังขยายสูงในรูปที่

4.27 และ 4.28 ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับผลการทดลองในหนูพันธุ์วีสตาร์คือสามารถสังเกตเห็นคอลลาเจนที่เกิดขึ้นใหม่ได้ชัดเจนขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองในหนูพันธุ์ nude mice bulb C/nu เป็นเพียงผลการทดลองเบื้องต้นเท่านั้นยังจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ที่มีต่อสัตว์ทดลอง อีกทั้งยังต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ในการทำการทดลองในสัตว์ที่มีขนาดเล็กที่ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันซึ่งไวต่อการติดเชื้อและการอักเสบ



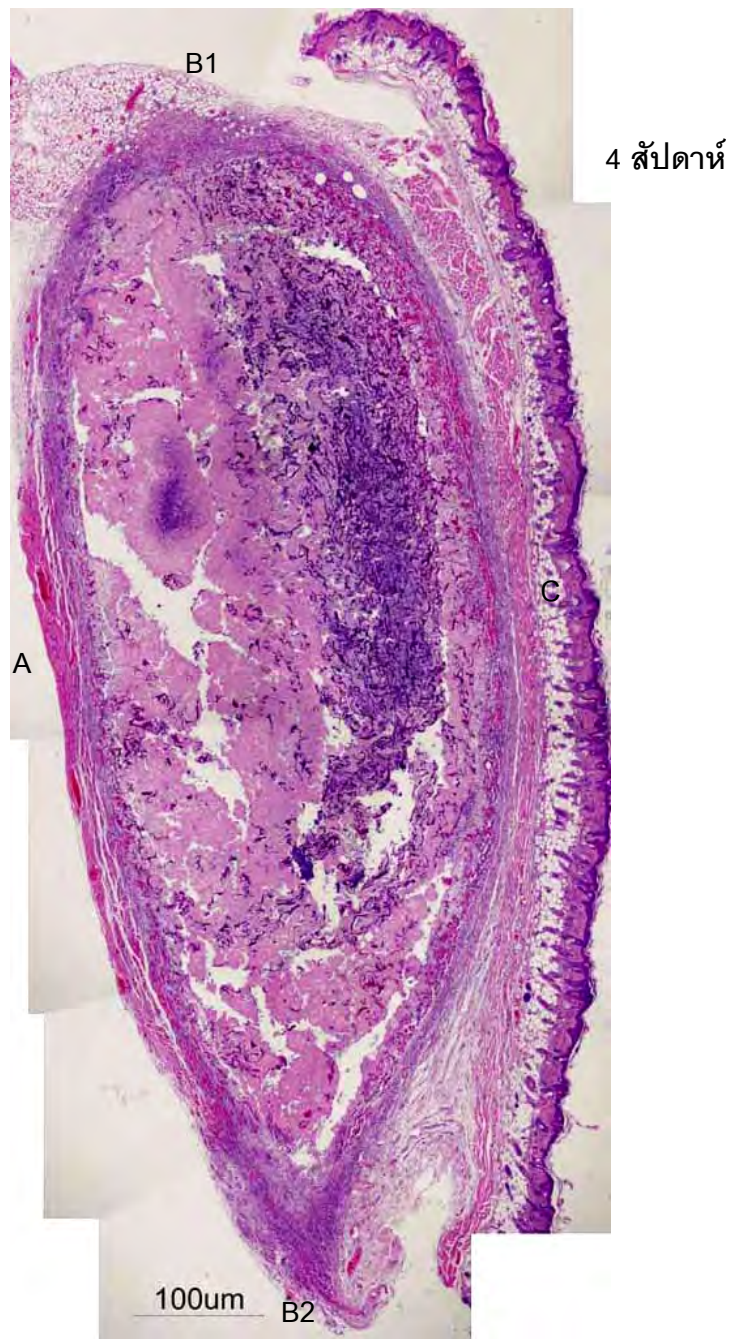
รูปที่ 4.24 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด คือโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (CCH) และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยโครโอปรีซิพิเตท (C1000) หลังจากการปลูกถ่ายบนหลังหนูพันธุ์ nude mice bulb C/nu ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์

CCH (nude mice bulb C)



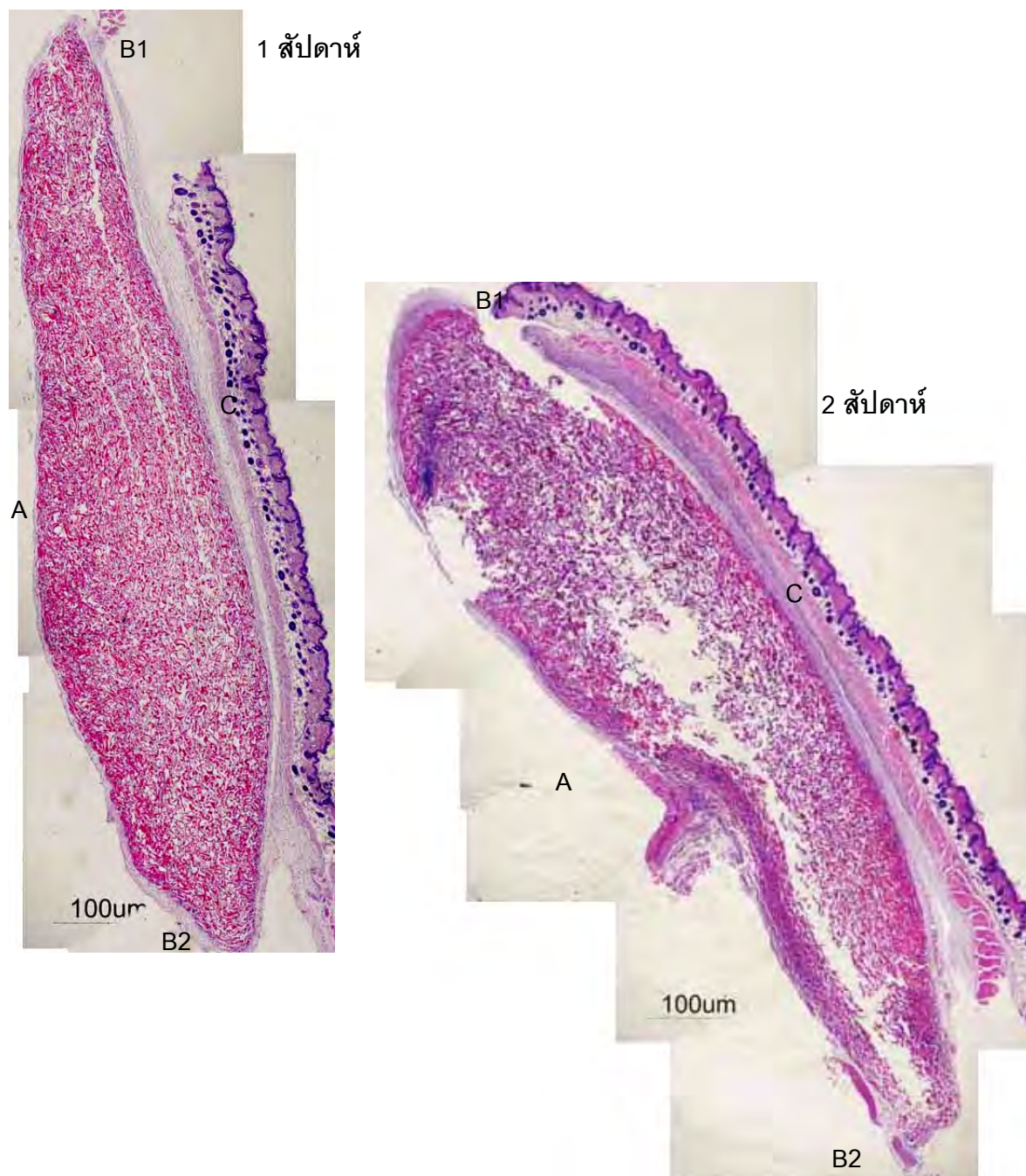
รูปที่ 4.25 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุม (CCH) ที่ฝังในหนูพันธุ์ Nude mice Bulb C/nu ที่เวลา 1, 2, และ 4 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E โดยแสดงของโครงเลี้ยงเซลล์ดังนี้
 A: สัมผัสเนื้อใต้ผิวหนัง; B1 และ B2: ด้านข้างโครงเลี้ยงเซลล์; C: สัมผัสผิวหนัง

CCH (nude mice bulb C)



รูปที่ 4.25 (ต่อ)

C1000 (nude mice bulb C)



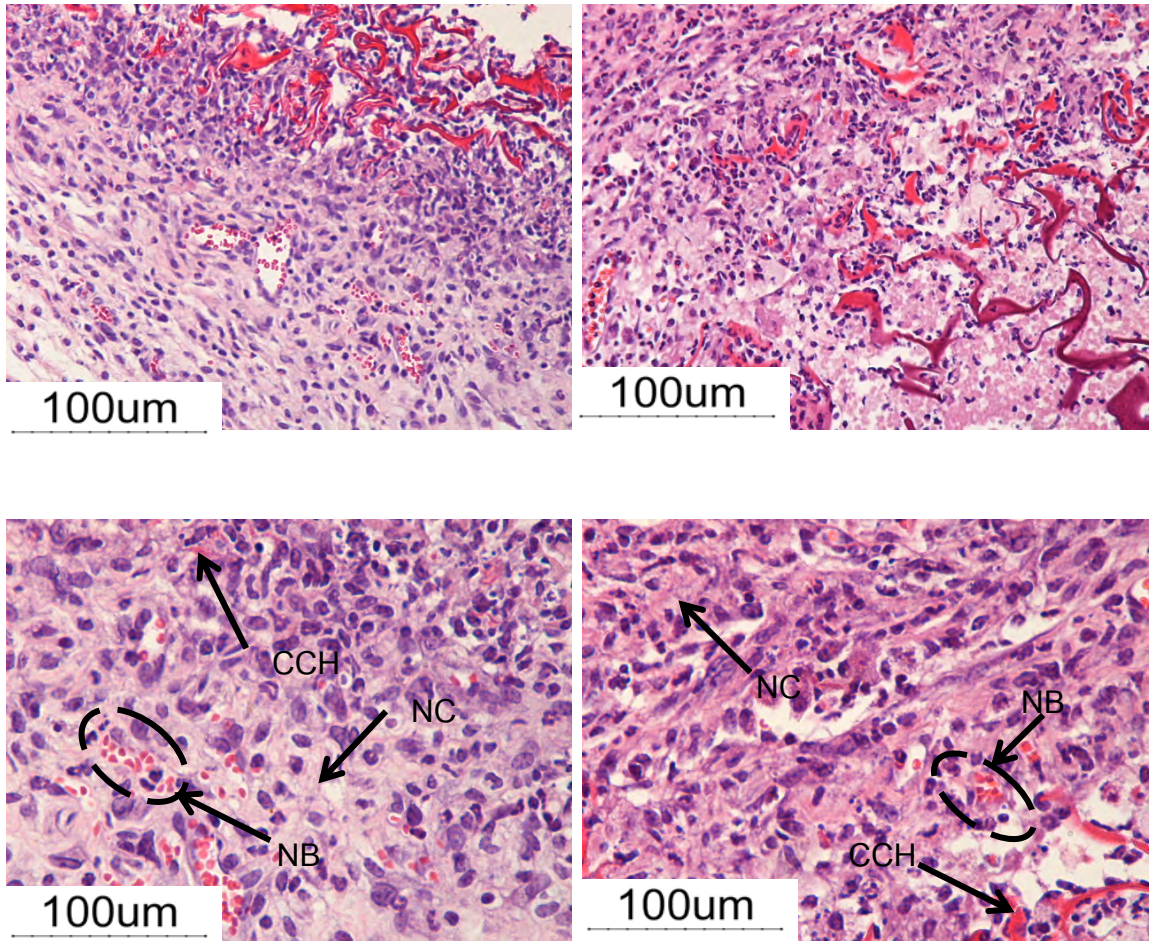
รูปที่ 4.26 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากโคริโอปริซิพิเตท 1000 มิลลิกรัม (C1000) ที่ฝังในหนูพันธุ์ nude mice bulb c/nu ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการย้อม H&E

C1000 (nude mice bulb C)



รูปที่ 4.26 (ต่อ)

CCH (nude mice bulb C)

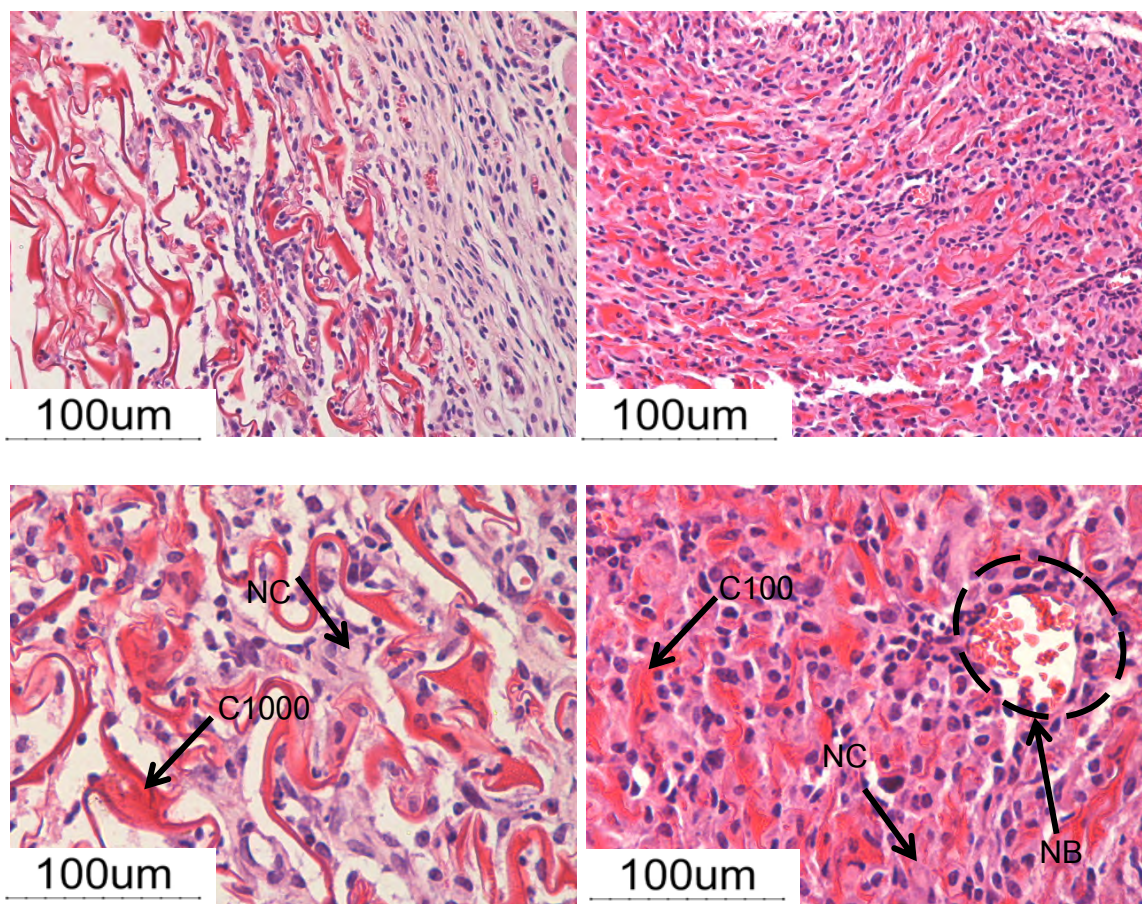


2 สัปดาห์

4 สัปดาห์

รูปที่ 4.27 ภาพถ่ายบางส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไดโตซาน (CCH) ที่ฝังในหนูทดลองพันธุ์ nude mice bulb c/nu ที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า โดยที่ NB คือ เส้นเลือดใหม่, NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (Neocollagen) และ CCH คือ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไดโตซานที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

C1000 (nude mice bulb C)



2 สัปดาห์

4 สัปดาห์

รูปที่ 4.28 ภาพถ่ายบางส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโครโอปริซิพิเตท (C1000) ที่ฝังในหนูทดลองพันธุ์ nude mice bulb c/nu ที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ซึ่งผ่านกระบวนการการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า โดยที่ NB คือ เส้นเลือดใหม่, NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (Neocollagen) และ C1000 คือ โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่ปรับปรุงด้วยโครโอปริซิพิเตทที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาต้นแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากคอลลาเจน-ไคโตซาน และเจลาติน-ไคโตซาน ด้วยการผสมโปรตีนจากผลิตภัณฑ์ไครโอปริซิพิเตท พลาสมาและ เกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนการขึ้นรูป ผลจากการศึกษาสรุปได้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนและชนิดของสารปรับปรุงที่ใช้ปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์มีผลต่อ ลักษณะสมบัติทางกล ขนาด และลักษณะการเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อพิจารณาถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพของทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยเมื่อทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ Detroit 551 ในระดับห้องปฏิบัติการในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่มีความเข้มข้นของโปรตีนจากสารปรับปรุงแต่ละชนิดต่างกัน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ถูกปรับปรุงด้วยไครโอปริซิพิเตท พลาสมาและเกล็ดเลือดเข้มข้น ซึ่งมีความเข้มข้นโปรตีนจากสารปรับปรุงเป็น 1000, 500 และ 500 มิลลิกรัมตามลำดับ (คิดเป็น 20.90%, 16.44% และ 10.04% โดยน้ำหนักของสารปรับปรุงในโครงเลี้ยงเซลล์) มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีที่สุดในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงชนิดเดียวกัน โครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากพลาสมา 1000 มิลลิกรัม มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีที่สุด และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยโปรตีนจากเกล็ดเลือดเข้มข้น 500 มิลลิกรัม มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้มากที่สุด และเมื่อทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ L929 กับโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-ไคโตซาน และ เจลาติน-ไคโตซานที่ได้รับการปรับปรุงสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้รับการปรับปรุง โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้นมีประสิทธิภาพให้เซลล์ L929 ยึดเกาะได้ดีที่สุด และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยการเติมพลาสมา มีประสิทธิภาพให้เซลล์ L929 เพิ่มจำนวนได้มากที่สุด และเมื่อทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในสัตว์ทดลองเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุง 3 ชนิด (C1000, H500, P500) กับกลุ่มควบคุมโดยการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยการย้อม H&E พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารปรับปรุงทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ย้ายที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งยังมีอัตราการย่อยสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์สูงกว่า และยังพบการสร้างเส้นเลือดใหม่และคอลลาเจนไฟบริลที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการ

สร้างเนื้อเยื่อผิวหนังแท้แบบไม่ทำให้เกิดแผลเป็น (scar) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ปรับปรุงด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้น คือโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพและมีโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะสมบัติดังกล่าวดีที่สุด

จากผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์ที่ผสมอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน จึงนำไปสู่การใช้สารละลายระหว่างคอลลาเจน-โคโตซานกับผลิตภัณฑ์โครโอปริซิพิเตท พลาสมา และเกล็ดเลือดเข้มข้นของมนุษย์มาใช้ปรับปรุงพื้นผิวไฮพอลิพรอพิลีนเพื่อปรับปรุงลักษณะความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเส้นใยพอลิเมอร์สังเคราะห์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแผ่นใยที่เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโตซานที่ผสมผลิตภัณฑ์จากเลือดมนุษย์ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ L929 สูงกว่าการเคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน-โคโตซานเพียงอย่างเดียว

จากผลสรุปโดยรวมสามารถบ่งชี้ได้ว่าผลิตภัณฑ์จากเลือดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน, เจลาติน-โคโตซาน และแผ่นใยโพรลีนโพลิดีนไม่สานทอ ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาต้นแบบของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ผลการวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงมีแนวทางปรับปรุงและศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

- การทดลองในสัตว์ทดลอง อาจจะต้องมีการปรับเปลี่ยนใช้สารปรับปรุงจากผลิตภัณฑ์จากเลือดของสัตว์ทดลองเหล่านั้นโดยตรง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสิ่งมีชีวิตที่พบได้จากการเกิดผังผืด
- จากการทดลองพบข้อจำกัดในการถ่ายเทมวลของสารอาหารและออกซิเจนผ่านเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ จึงอาจปรับปรุงด้วยการลดความหนาของโครงเลี้ยงเซลล์จากเดิมที่มีขนาดประมาณ 3-4 มิลลิเมตรเหลือไม่เกิน 1.5 มิลลิเมตร เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว
- เปลี่ยนวิธีการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ให้เป็นการฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์หรือวิธีอื่นๆ ที่ให้ผลดีเทียบเท่า
- จากผลการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่า เส้นใยคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่มียังลักษณะไม่ชัดเจนคือยังไม่รวมกันเป็นเส้นใยขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มระยะเวลาในการทดลองจาก 4 สัปดาห์เป็น 12 สัปดาห์หรือมากกว่าเพื่อให้กระบวนการสร้างคอลลาเจนขึ้นใหม่สมบูรณ์

- ทำการทดลองในสัตว์ทดลองโดยใช้ Wound healing model แทนการฝังใต้ผิวหนัง เพื่อศึกษาผลของสารปรับปรุงดังกล่าวที่ส่งผลต่อการรักษาบาดแผล
- ศึกษาพัฒนาระบบที่มีการปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารปรับปรุงมากกว่า 1 ชนิด เพื่อความเหมาะสมในการรักษาบาดแผลที่มีลักษณะแตกต่างกัน
- ปรับปรุงให้มีการควบคุมการปลดปล่อย (control release) ของสารปรับปรุงในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยการปรับปรุงลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีประจุลบเพื่อที่จะยึดสร้างพันธะกับประจุบวกของโมเลกุลโปรตีนของโกรสแฟคเตอร์
- ทำการทดสอบผลของสารปรับปรุงดังกล่าวกับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น การทดสอบกับ Stem cells
- ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้แผ่นใยพอลิพรอพิลีนที่ได้รับการปรับปรุงความเข้ากันได้ทางชีวภาพเพื่อพัฒนาเป็นวัสดุปลูกแผล

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กัลยา ผลากรกุล. เนื้อเยื่อพื้นฐานของร่างกายและหลักปฏิบัติการด้านพยาธิวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1.

กรุงเทพฯ: สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2534

ชัยณรงค์ รัตนกรีกากุล. หัตถ์มองดู...วัสดุสังเคราะห์...อีกสักครั้ง, ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, 2547

ชาญวิทย์ ตันต์พิพัฒน์.; ธนิต วัชรพุกกั. ตำราศัลยศาสตร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย, 2544

ถนอม บรรณประเสริฐ. Wound Healing: Concept of Artificial skin (Tissue Engineering of

skin), ภาควิชาสัตวศาสตร์ นาสิกวิทยา หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้างใบหน้า". คณะ

แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. เวชศาสตร์ร่วมสมัย (2547): 93-107.

ภาวดี เมธะคานนท์.; อศิรา เฟื่องฟูชาติ. และ ก้องเกียรติ คงสุวรรณ. "Chitin Chitosan Technical

Note". ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. 2546

วิน เขยชมศรี. ปฏิบัติการสรีรวิทยาของสัตว์ เรื่องการตรวจทางโลหิตวิทยาของสัตว์ (Animal

Hematology Procedure), ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2540

สมบุญชัย ศรีสวัสดิ์สุข. Wound bed preparation: a systematic approach to wound

management. เมดิคอลไทม์. (กรกฎาคม 2547)

ภาษาอังกฤษ

Abdul, M. Processes for the preparation of novel *collagen*-based supports for tissue

engineering, and biomaterials obtained. United State Patent. US patent no.

6790454 (September 14th 2004)

Antanavich. Plasma concentrate and method of processing blood for same. United State

Patent.6214338 (April 10th 2001)

Badami, A.S.; Kreke, M.R.; Thomson, M.S.; Riffle, J.S.; and Goldstein, A.S. Effect of fiber

diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on

electrospun poly(lactic acid) substrate. Biomaterials 27 (2006): 596-606

Bell, E. Method and construct for producing graft tissue from an extracellular matrix.

United State Patent. US patent no 6051750 (September 1st 1998)

- Bell, E. Method and construct for producing graft tissue from an extracellular matrix. United State Patent. US patent no 5800537(April 18th 2000)
- Bet, M.R.; Goissis, G.; Vargas, S.; and Selistre-Araujo, H.S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surface with variable negative charge and wettibility. Biomaterials 24 (2003): 131-137
- Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; and Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials 22 (2001): 763-768
- Brecher, E. Mark. Technical manual program unit. 15th ed. Bethesda. MD:AABB Press, 2005
- Brown.; and Liesbeth, E.M. Serum-free media for chondrocytes and methods of use thereof. United State Patent. US patent no 7169610 (January 30th 2007)
- Carter, C.A.; Jolly, D.G.; Worden Sr, C.E.; Hendren, D.G.; and Kane, C.J.M. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. Exerimental and Molecular Pathology 74 (2003): 244-255
- Choi, H.B.; Zhu, J.S.; Kim, Y.B.; Huh, Y.J.; Lee, H.S. and Jung, H.J. Effect of platelet rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cell: an *in vitro* study. International Journal of Oral Maxillofacial Surgery 34 (2005): 420-424
- Cojazzi, G. B.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; and Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials 22 (2001):763-768.
- Davey, J. and Lord, M. Essential cell biology Volume1: cell structure A practical approach. Oxford University Press, 2003
- Enoch, S. and Leaper, J.D. Basic science of wound healing. Surgery 23:2 (2005): 37-42
- Fenstermaker, R.A.; Poptic, E.; Bonfield, T.L.; Knauss T.C.; Corsillo, L.; Piskurich, J.F.; Kaetzel, C.S.; Jentoft, J.E.; Gelfand, C.; DiCorleto, P.E.; and Kaetzel, D.M. A Cationic Region of the Platelet derive growth factor(PDGF) A chain (Arg¹⁵⁹-Lys¹⁶⁰-Lys¹⁶¹) Is Required for Receptor Binding and Mitogenic Activity of the PDGF-AA

- Homodimer. The journal of Biological Chemistry 268 (1993): 10482-10489
- Freyman, T.M.; Llanas I.V.; and Gibson L.J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. Progress in materials science 46 (2001): 243-282
- Friess, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45 (1998): 113-136.
- Gail, K.N. From lab Bench to Market Critical Issues in Tissue Engineering. Advanced Tissue Sciences 961: 372-385 (2002)
- Gelse, K.; Poschl, E. and Aigner, T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews 55 (2003): 1531-1546.
- Genes, N.G.; Rowley, J.A.; Mooney, D.J.; and Bonassar, L.J. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. Archives of Biochemistry and Biophysics 422 (2004): 161-167
- Gentleman, E.; Lay A.N.; Dickerson, D.M.; Nauman, E.A.; Livesay, G.A.; and Dee, K.C. Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. Biomaterial. 24 (2003): 3805-3813
- Graaf, I.A.M.; and Koster, J.H. Cryopreservation of precision-cut tissue slices for application in drug metabolism research, Toxicology in Vitro 17 (2003): 1–17
- Jones, I.; Currie, L. and Martin, R. A guide to biological skin substitutes. British Journal of Plastic Surgery. 55 (2002): 185-193
- Kamsing, P. MEASUREMENT OF PLASMA PROPERTIES FROM A THETA PINCH DEVICE. Master's Thesis Department of Physics Faculty of Science Chulalongkorn University, 2005
- Kang, H.W., Tabata, Y. and Ikada, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 20 (1999): 1339-1344.
- Lee, E.J.; Kim E.K.; Kwon, C.I.; Ahn, J.H.; Lee S-H.; Cho, H.; Kim, J.H.; Seong, C.S.; and Lee, C.M. Effects of the controlled-released TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. Biomaterials 25 (2004):4163–4173
- Lee, S.B.; Jeon, H.W.; Lee, Y.W.; Lee, Y.M.; Song, K.W.; Park, M.H.; Nam, Y.S. and Ahn,

- H.C. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6) β -glucan. Biomaterials 24 (2003): 2503-2511
- Lee, S.B.; Kim, Y.H.; Chong, M.S.; Hong, S.H. and Lee, Y.M. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. Biomaterials 26 (2005): 1961-1968.
- Li D.J.; and Niu, L.F. Cell attachment of polypropylene surface-modified by COOH⁺ ion implantation. Nuclear Instrument and Methods in physics Research Beam Interactions with Materials & Atoms.192 (2002): 393-401
- Lopergolo, L.C.; Catalani, L.H.; Machado, L.D.B.; Rela, P.R. and Lugao, A.B. Development of reinforce hydrogels-I. Radiation induce graft copolymerization of methylmethacrylate on non-woven polypropylene fabric. Radiation Physics and Chemistry 57(2000): 451-454
- Lowry, O.H., et al. The Lowry assay. Biol. Chem. 193 (1951): 265
- Ma, J.; Wang, H.; He, B.; and Chen, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. Biomaterials 22 (2001): 331-336
- Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; and Shen, J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials 25 (2004): 4833-4841
- Maire, M.; Logeart-Avramoglou, D.; Degat, M.C.; and Chuabet, F. Retention of transforming growth factor β 1 using functionalized dextran-based hydrogels. Biomaterials 26 (2005): 1771-1780
- Mao, J.S.; Cui, Y.L.; Wang, X.H.; Sun, Y.; Zhao, H.M.; and Yao, K.Y. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. Biomaterials 25 (2004): 3973-3981
- McLeod, C.Bruce. Therapeutic apheresis: use of human serum albumin, fresh frozen plasma and cryosupernatant plasma in therapeutic plasma exchange. Best Practice & Research Clinical Haematology 19 (2006): 157-167
- Mi, F-L.; Shyu, S-S.; Wu, Y-B.; Lee, S-T.; Shyong, J-Y.; and Huang, R-N. Fabrication and

- characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. Biomaterials 22 (2001): 165-173
- Moroni, L.; Licht, R.; Boer, J.; Wijn, J.R.; and Blitterswijk, C.A. Fiber diameter and texture of electrospun PEOT/PBT scaffolds influence human mesenchymal stem cell proliferation and morphology, and the release of incorporated compounds. Biomaterials 27 (2006): 4911-4922
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65 (1983): 55-63
- Naughton, G.K. From Lab Bench to Market Critical Issues in Tissue Engineering. Analysis New York Academy Of Science 961 (2002): 372-385
- Neuman, R.E. The amino acid composition of gelatins, collagens and elastins from different sources. The department of Biological Chemistry (1949): 289-297.
- O'Brien, F.J.; Harley, B.A.; Yannas, I.V.; and Gibson, L. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterials 26 (2005):433-441.
- Oluyinka O. Olutoye, Eleanor J. Barone, Dorne R. Yager, I. Kelman Cohen, and Robert F. Diegelmann Richmond, Virginia, Collagen Induces Cytokine Release by Fetal Platelets: Implications in Scarless Healing. W.B. Saunders Company.(1997): 22-34
- Pangborn, A.C.; and Athanasiou, A.K. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. Journal of Orthopaedic Research 23 (2005): 1184–1190
- Pek, Y.S.; Spector, M.; Yannas, I.V. and Gibson, L.J. Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. Biomaterials 25 (2004): 473-482
- Qiu, Z.; Kwon, H-A. and Kamiyama, Y. Effect of Plasma Fibronectin on the Healing of Full-Thickness Skin Wound in Streptozotocin-Induce Diabetic rats. Journal of Surgical Research 138 (2007): 64-70
- Ratanavaraporn, J. Physical and Biology properties of collagen/gelatin scaffolds.
Master's Thesis Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering,

Chulalongkorn University, 2005

Redl, H.; Schlog, G.; and Eibl, J. Fibrinogen based tissue adhesive. United State Patent.

US patent no 7091015 (August 15th 2006)

Rothamel, D.; Schwarz, F.; Sager, M.; Herten, M.; Sculean, A.; and Becker, J.

Biodegradation of differently crosslinked collagen membranes: an experimental study in the rat. Clin. Oral Impl. Res. 16 (2005): 369–378

Ruszczak, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. Advanced Drug

Delivery Reviews 55 (2003): 1595-1611

Sarkar, R.; Michael, A.P., Sandra J.S.; Schorlemmer, S.; Huber-Lang, M.; Claes, L.; Kinzl,

L.; and Ignatius, A, Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. Biomaterials 27 (2006): 1817–1823

Sato, H.; Nakanishi, E.; and Nakajima, A. Electrochemical and conformational study of

interactions of fibrinogen with acidic polysaccharides. Int. J. Biol. Macromol. 3 (1981)

Schlegel, K.A.; Donath, K.; Rupprecht, S.; Falk, S.; Zimmermann, R.; Felszeghy, E.; and

Wiltfang, J. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. Biomaterials 25 (2004): 5387-5393

Shafritz, T.A.; Rosenberg, L.C. and Yannas, V.I. Specific effects of glycosaminoglycans

in an analog of extracellular matrix that delays wound contraction and induces regeneration. The Wound Healing Society (1994): 271-276

Somner, A.E.; Black, J.; and Pasvol, G. Multiple human serum components act as

bridging molecules in rosette formation by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Boold -The American Society of Hematology 95 (2000): 674-682

Stephan F. B. Extracellular matrix As a Scaffold for Tissue Engineering in Veterinary

Medicine: Applications to Soft Tissue Healing. Clinical Techniques in Equine Practice (2004): 1534-7516/04

Tabata, Y. and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices. Advanced Drug Delivery

Reviews 31 (1998): 287–301.

Tabata, Y. and Ikada Y. Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released

- from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. Biomaterials 20 (1999): 2169-2175.
- Tajima, N.; Sotome, S.; Marukawa, E.; Omura, K.; and Shinomiya, K. A three-dimensional cell-loading system using autologous plasma loaded into a porous β -tricalcium-phosphate block promotes bone formation at extraskeletal sites in rats. Materials Science and Engineering C. (2006)
- Tangsadthakun, C.; Kanokpanont, S.; Sanchavanakit, N.; Pichyangkura, R.; Bunaprasert, T.; Tabata, Y.; and Damrongsakkul, S. The influence of molecular weight of chitosan on physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. Journal Biomaterials Science. Polymer Edn. 18 (2007): 145-163
- Tyan, Y-C.; Liao, J-D.; Klauser, R.; Wu, I-D.; and Weng, C-C. Assessment and characterization of degradation effect for the varied degrees of ultra-violet radiation on to the collagen-bonded polypropylene non-woven fabric surfaces. Biomaterials 23 (2002): 65-76
- Valbonesi, M. Fibrin glues of human origin. Best Practice & Research Clinical Hematology 19 (2006): 191-203
- Valenta, C.; and Auner, G.B. The use of polymer for dermal and transdermal delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58 (2004): 279-289
- Wang, X.H.; Li, D.P.; Wang, W.J.; Feng, Q.L.; Cui, F.Z.; Xub, Y.X.; Song, X.H.; and Werf, M. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. Biomaterials 24 (2003): 3213-3220
- Wang, W.; Wang Y.J.; Kelner D.N. Coagulation factor VIII: structure and stability. International journal of pharmaceutics 259 (2003): 1-15
- Wei, Q.; Li, Q.; Wang, X.; Huang, F.; and Gao, W. Dynamic water adsorption behaviour of plasma-treated polypropylene nonwovens. Polymer Testing 25 (2006):717-722
- Willaim, H.E. University of Miami School of Medicine, Department of Dermatology. Journal of the American Academy of Dermatology.(1998)
- Worden, C. Enriched platelet wound healant. United State Patent. US patent no 7112342 (September 26th 2006)

- Yannas, V. I. Tissue and Organ Regeneration in Adults. New York: Springer, 2001.
- Ye, Q.; ZuÈnd, G.; Benedikt, P.; Jockenhoewel, S.; Hoerstrup, P.S.; Sakyama, S.; Hubbell, A.J.; and Turin, M. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. European Journal of Cardio-thoracic Surgery 17 (2000) 587-591
- Young, B. and Heath, J.W. Wheater's functional histology a text and colour atlas. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000.
- Young, S.; Wong, M.; Tabata, Y. and Mikos, A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. Journal of Controlled Release 109 (2005): 256-274.
- Zhang, Y.; and Zhang, M. Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates. Journal of Non-Crystalline Solids 282 (2001): 159-164
- Zhu, J.S.; Choi, H.B.; Jung, H.J.; Lee H.S.; Huh, Y.J.; You, M.T.; Lee, J.H.; and Li, J. A comparative histological analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enrich fibrin glue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod (2006)
- www.drugs.com/PDR/Apligraf.html [2005, May]
- <http://thailabonline.com/news3chitin-chitosan.htm>
- <http://www.biohorizons.com/alloderm.htm>
- http://www.ft.vslib.cz/indoczechconference/conference_proceedings/fulltext/Turkey_05.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry, และคณะ, 1951)

การวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้เทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Colorimetric assay) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนซึ่งจะสามารถวัดได้ในช่วงความยาวคลื่น 500-750 นาโนเมตร โดยที่ค่าการดูดกลืนแสงเกิดจากสีน้ำเงินแกมเขียวที่ใช้สามารถตรวจสอบปริมาณหมู่อะมิโนไทโรซีนและทริปโตเฟน

สารเคมี

A: CuSO_4 เข้มข้น 1% w/v

B: Sodium potassium tartrate เข้มข้น 2% w/v

C: Sodium Hydroxide 0.1 M

D: Sodium carbonates เข้มข้น 4% w/v

E: ผสมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร, B 1 มิลลิลิตร, C 49 มิลลิลิตร และ D 49 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

F: Folin Ciocalteu reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1

ขั้นตอนการวิเคราะห์

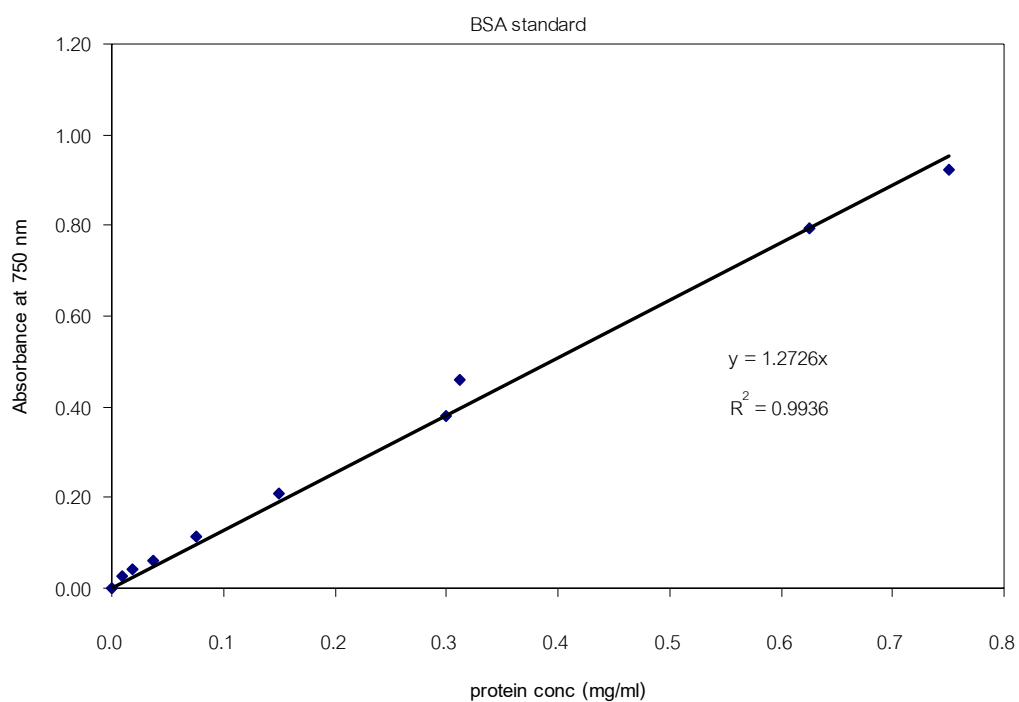
1.เตรียมสารละลายที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน

2.การวัดปริมาณโปรตีน

ผสมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร กับสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรคำนวณความเข้มข้นปริมาณโปรตีนรวมจากกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีนจาก Bovine serum albumin (BSA)

ตาราง ก-1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm จากสารละลายโปรตีน BSA ที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

conc.(mg/ml)	Absorbance (750 nm)				
	#1	#2	#3	avg	SD
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.0094	0.0290	0.0290	0.0180	0.0253	0.0095
0.0188	0.0420	0.0430	0.0380	0.0410	0.0113
0.0375	0.0590	0.0580	0.0690	0.0620	0.0132
0.0750	0.1000	0.1060	0.1400	0.1153	0.0268
0.1500	0.2150	0.2130	0.2020	0.2100	0.0305
0.3000	0.3560	0.3930	0.3910	0.3800	0.0435
0.3125	0.4830	0.4440	0.4530	0.4600	0.0756
0.6250	0.8150	0.7970	0.7720	0.7947	0.0866
0.7500	0.9400	0.9140	0.9140	0.9227	0.0872



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานแสดงปริมาณโปรตีน BSA ที่วัดจากวิธี Lowry

ภาคผนวก ข. MTT assay for cell viability (Mosmann, 1983; Choi และคณะ, 2004)

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ tetrazolium มีสีเหลือง โดยที่ MTT ที่ถูกละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี phenol red จะถูกเปลี่ยนเป็นผลึก formazan สีม่วงที่เนื่องจากการถูกทำลายวงแหวน tetrazolium ด้วยเอนไซม์ dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้แต่สามารถละลายได้โดยใช้ตัวทำละลาย เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) สารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณผลึก formazan ที่ถูกละลายออกมามีค่าแปรผันโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

ขั้นตอนการทดสอบ

- 1) เตรียมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีฟีนอลเรด (phenol red)
- 2) หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4
- 3) เติมสารละลาย MTT จากข้อ 1) ลงในหลุมที่มีเซลล์อยู่
- 4) ทำการ incubate ใน incubator ที่มีสภาวะ CO₂ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
- 5) นำสารละลาย MTT ออกจากหลุมเลี้ยงเซลล์
- 6) เติมสารละลายผสม DMSO ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์แล้วใช้ปิเปตพ่น DMSO ขึ้น-ลงเพื่อละลายผลึก formazan
- 7) นำสารละลายจากข้อ 6) ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค. แสดงค่ากราฟมาตรฐานจำนวนเซลล์

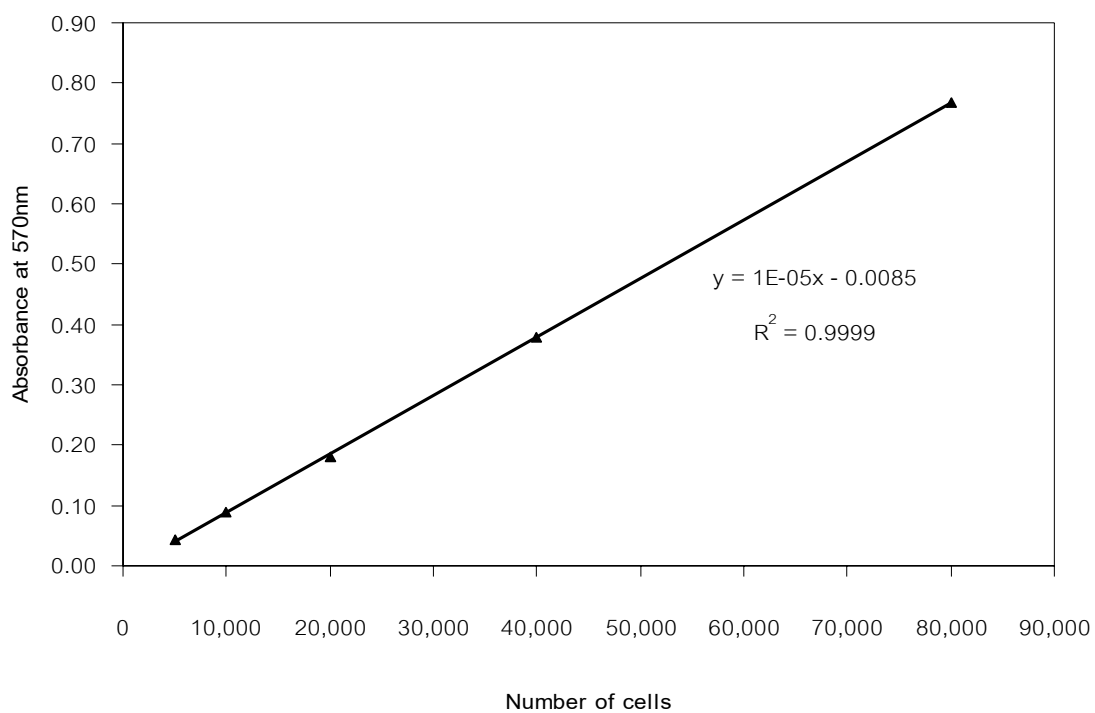
-กราฟมาตรฐานจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ L929 (mouse fibroblast)

ตาราง ค-1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm จาก Mitochondrial activity (MTT) assay

สำหรับกราฟมาตรฐานของเซลล์ L929

Number of cells	Absorbance(570 nm)				
	#1	#2	#3	mean	SD
5,000	0.0530	0.0400	0.0380	0.0437	0.0081
10,000	0.0850	0.0840	0.0980	0.0890	0.0078
20,000	0.1800	0.1880	0.1750	0.1810	0.0066
40,000	0.3960	0.3740	0.3670	0.3790	0.0151
80,000	0.6400	0.6860	0.9810	0.7690	0.1850

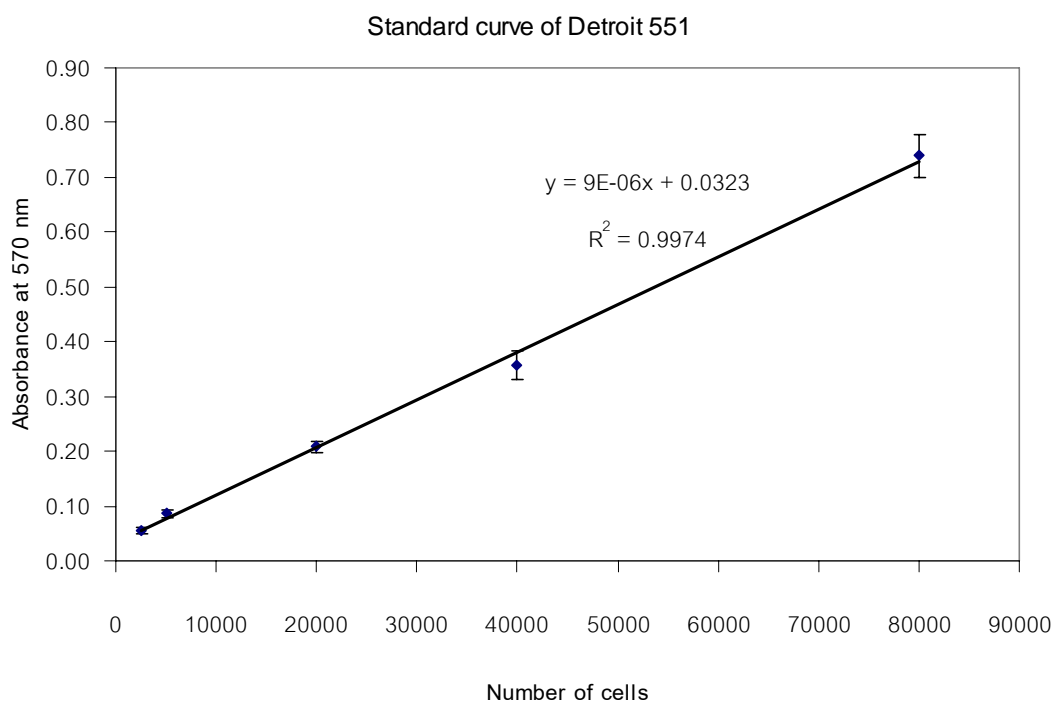
Standard curve of number of L929



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงจำนวนเซลล์ L929 mouse fibroblast

-กราฟมาตรฐานจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ Detroit 551 human dermal fibroblast
 ตาราง ค-2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm จาก mitochondrial activity (MTT) assay
 สำหรับกราฟมาตรฐานของเซลล์ Detroit 551

No.of cell	Absorbance 570 nm					
	#1	#2	#3	#4	avg	SD
2500	0.060	0.049	0.053	0.058	0.055	0.005
5000	0.077	0.091	0.093	0.085	0.087	0.007
20000	0.204	0.224	0.199	0.204	0.208	0.011
40000	0.353	0.392	0.332	0.349	0.357	0.025
80000	0.690	0.786	0.740	0.742	0.740	0.039

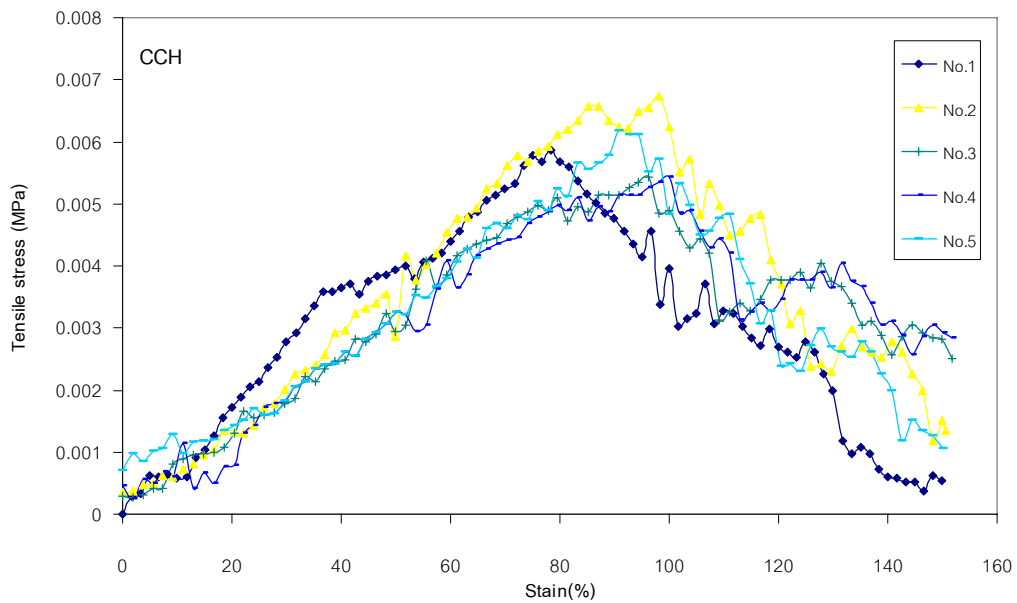


รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานแสดงจำนวนเซลล์ Detroit 551 human dermal fibroblast

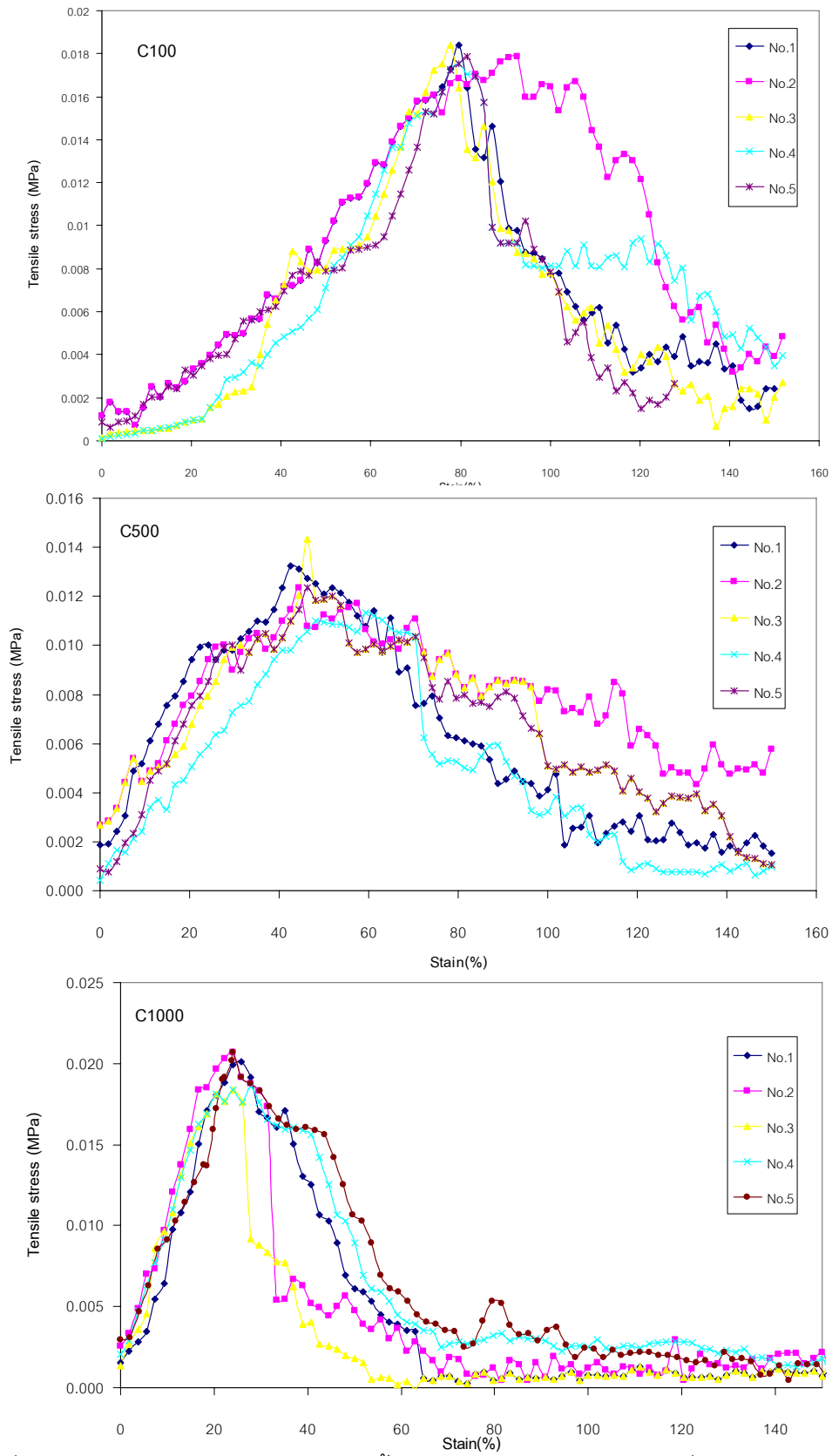
ภาคผนวก ง แสดงข้อมูลจากการทดลองและตัวอย่างการคำนวณ

ง-1 แสดงกราฟ stress-stain

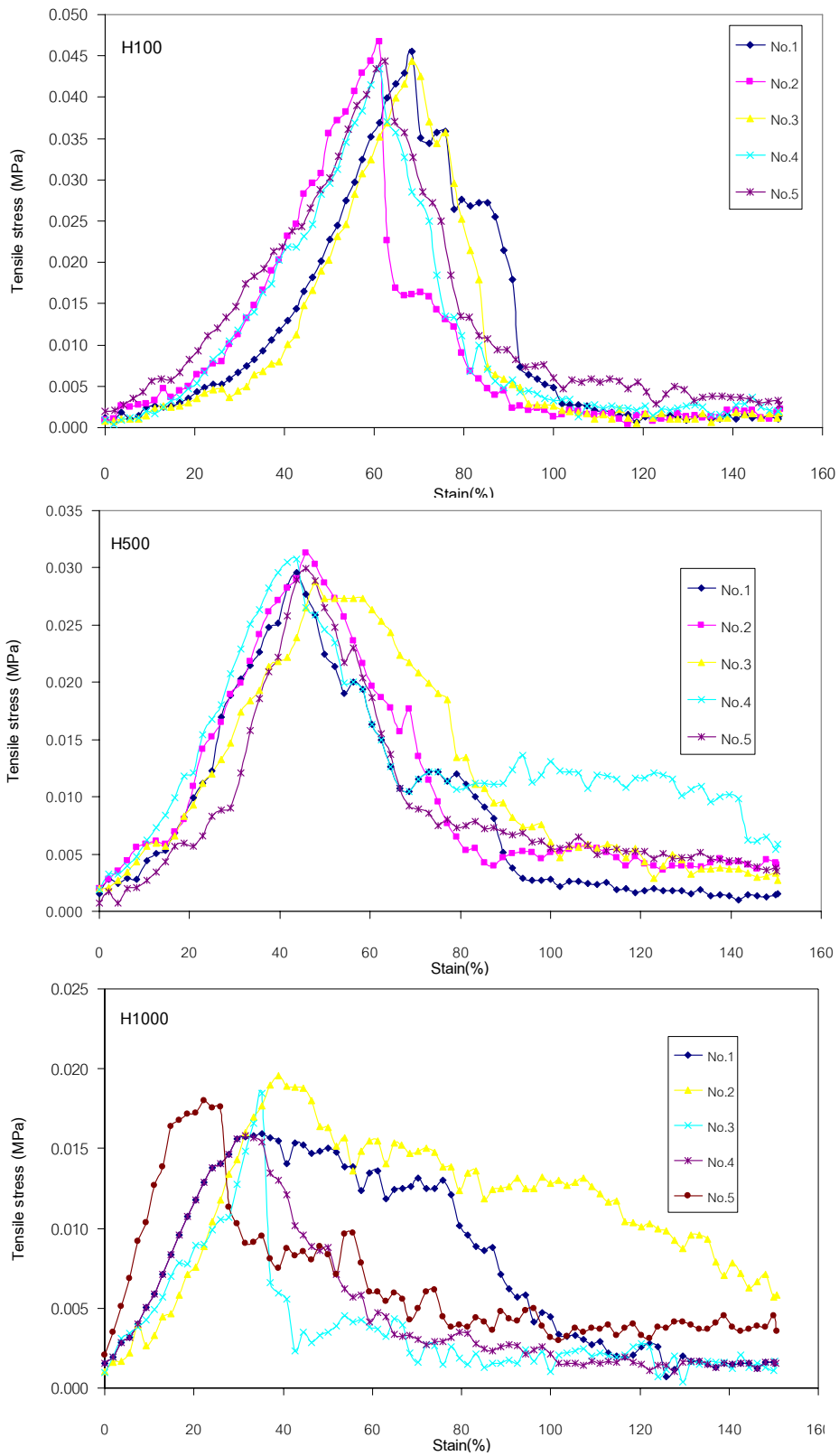
ข้อมูลแสดงระยะยืดจนถึงจุดเริ่มขาดของโครงเลี้ยงเซลล์โดยทำการวัดค่าแรงดึงด้วยเครื่อง universal testing machine (INSTRON No.5567, NY, USA) ที่ constant tensile deformation rate (0.5 มิลลิเมตร/นาที)



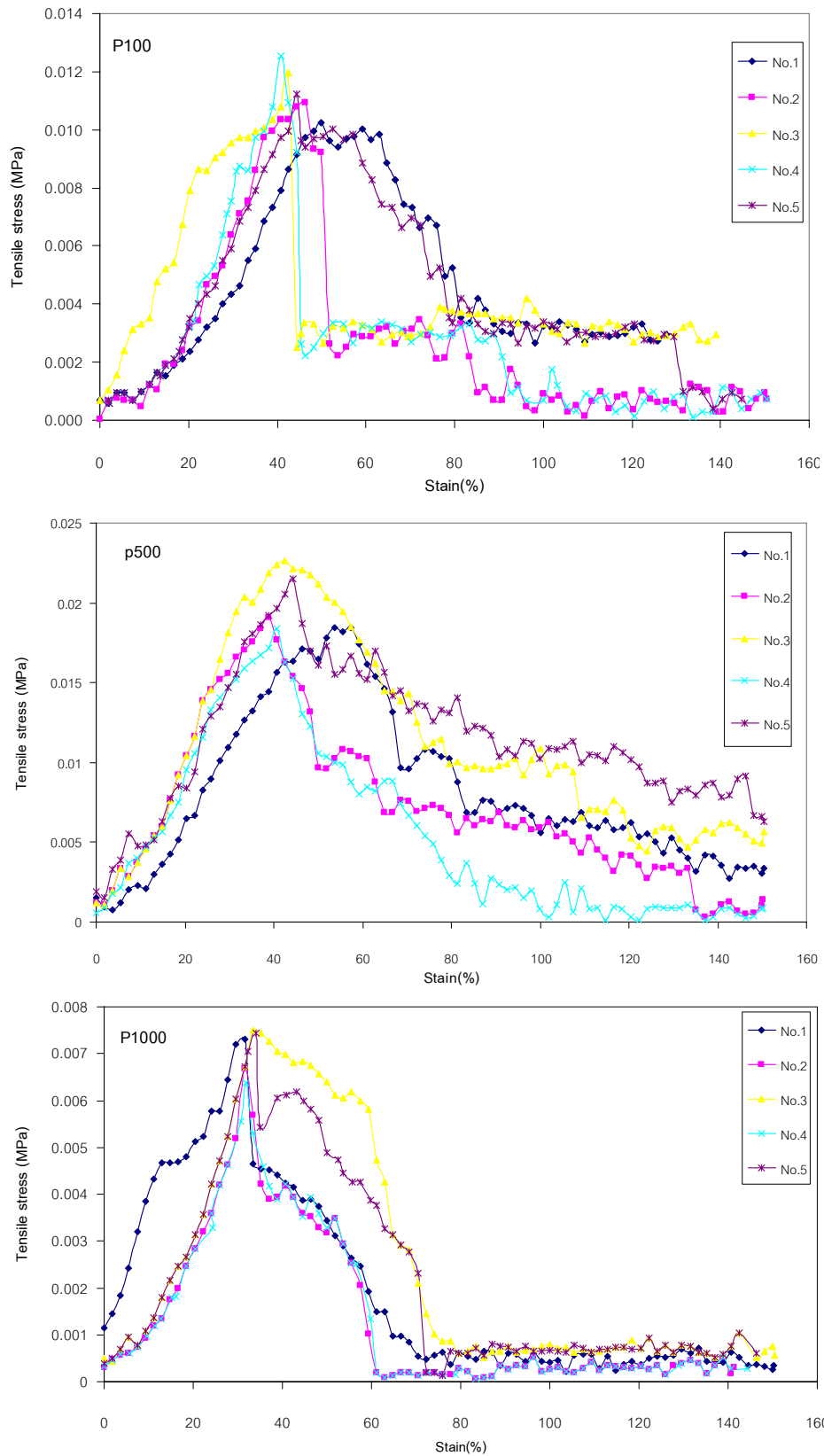
รูปที่ ง-1 กราฟแสดงระยะยืดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (กลุ่มควบคุม)



รูปที่ ง-2 กราฟแสดงระยะยืดของโครงเหล็กคอลลาเจน-ไคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยไครโอปรีซิพีเตท



รูปที่ ง-2 (ต่อ) กราฟแสดงระยะยืดของโครงเหล็กคอลลาเจน-ไคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วยพลาสมา



รูปที่ ง-2 (ต่อ) กราฟแสดงระยะยืดของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซานที่ถูกปรับปรุงด้วย
เกล็ดเลือดเข้มข้น

ตารางที่ ง-1 แสดงค่าตัวอย่าง Tensile stress-strain ของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-โคโตซาน (CCH)

tensile stress (Mpa)	strain%	extension(mm)	tensile stress (Mpa)	strain%	extension(mm)
0.000291	0	0	0.004447	68.52139	3.083462
0.000263	1.854761	0.083464	0.004679	70.369	3.166605
0.000321	3.702378	0.166607	0.004792	72.219	3.249855
0.000409	5.551187	0.249803	0.004871	74.07257	3.333266
0.000419	7.405948	0.333268	0.004972	75.92615	3.416677
0.000818	9.259518	0.416678	0.00489	77.77972	3.500087
0.000896	11.11428	0.500143	0.005099	79.63209	3.583444
0.000962	12.96666	0.5835	0.004724	81.4809	3.666641
0.000978	14.81308	0.666589	0.004956	83.3309	3.749891
0.000999	16.66427	0.749892	0.004864	85.18447	3.833301
0.001081	18.51785	0.833303	0.005144	87.03804	3.916712
0.001309	20.37142	0.916714	0.005137	88.89041	4.000069
0.001662	22.2226	1.000017	0.005142	90.74161	4.083373
0.00156	24.07498	1.083374	0.005255	92.59042	4.166569
0.001599	25.92379	1.166571	0.005345	94.44041	4.249819
0.001631	27.77498	1.249874	0.005432	96.29637	4.333337
0.00179	29.63093	1.333392	0.004841	98.14993	4.416747
0.001873	31.48212	1.416695	0.004893	100.0023	4.500104
0.002227	33.33688	1.50016	0.004569	101.8559	4.583515
0.00214	35.18926	1.583517	0.004299	103.7023	4.666604
0.002343	37.03569	1.666606	0.004441	105.5511	4.749801
0.002472	38.8845	1.749802	0.004211	107.4047	4.833211
0.002493	40.73807	1.833213	0.003133	109.2595	4.916676
0.002818	42.59283	1.916677	0.003262	111.1142	5.000139
0.002776	44.44759	2.000141	0.003397	112.9666	5.083497
0.002893	46.29997	2.083498	0.003273	114.8142	5.166639
0.003242	48.1464	2.166588	0.003455	116.663	5.249835
0.002943	49.99759	2.249892	0.003769	118.5178	5.3333
0.003043	51.85116	2.333302	0.003773	120.3713	5.416711
0.003629	53.70473	2.416713	0.003781	122.2237	5.500068
0.004088	55.5571	2.50007	0.003891	124.0761	5.583425
0.003642	57.40948	2.583427	0.003653	125.9237	5.666568
0.003859	59.25711	2.66657	0.004039	127.7749	5.749871
0.00417	61.10711	2.74982	0.003747	129.6297	5.833335
0.004268	62.96305	2.833337	0.003674	131.4832	5.916746

0.004345	64.81543	2.916694	0.003403	133.3344	6.00005
0.004407	66.6702	3.000159	0.003048	135.188	6.08346

ง-2 ตัวอย่างการคำนวณระยะการยืดตัว ณ จุดขาด

$$\text{Elongation at break (\%)} = \frac{\text{ความยาวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ยืดออกจนถึงจุดขาด} \times 100}{\text{ความยาวของโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น}}$$

จากตัวอย่างข้อมูลในตารางที่ ง-1 ที่แสดงความยาวของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน (CCH) ที่ยืดออกตามค่า Tensile stress ที่เพิ่มขึ้น

ข้อมูลจากตารางที่ ง-1 ระบุว่า

ค่า Tensile stress ณ จุดขาดเท่ากับ 0.005432 เมกกะปาสคาล

ระยะยืด ณ จุดขาดเท่ากับ 4.333337 มิลลิเมตร

โดยที่ความยาวของโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นคือ 45 มิลลิเมตร (ข้อ 3.3.2)

ดังนั้น

$$\text{Elongation at break (\%)} = \frac{4.333337 \times 100}{45} = 96.29\%$$

ภาคผนวก จ ผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

สำเนาเอกสารแสดงในหน้า 139



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 4455, 4493 ต่อ 14

ที่ วจ 82/2550

วันที่ 10 เมษายน พ.ศ. 2550

เรื่อง แจ้งผลพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

เรียน ดร. ไสรดา กนกพานนท์

จากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ครั้งที่ 8/2550 ในวันพฤหัสบดี ที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2550 ได้พิจารณาเอกสารที่แก้ไขในโครงการวิจัย เรื่อง Modification of scaffold by human cryoprecipitate, plasma and platelet concentration for tissue engineering

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. ไสรดา กนกพานนท์

คณะกรรมการมีมติให้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยได้

คณะกรรมการมีความเห็นให้ ผู้วิจัยส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี (ก่อนวันที่ 4 เมษายน 2551)

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

(รศ.นพ.อดิศร ภัทราดุลย์)

รองคณบดีฝ่ายวางแผนและพัฒนา

รักษาราชการแทนรองคณบดีฝ่ายวิจัย

ปฏิบัติราชการแทนคณบดี คณะแพทยศาสตร์

สำเนาเรียน คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

ติดต่อประสาน คุณสุกัญญา, คุณเพ็ญศรี

โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15

REC: No.39/50

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.ส.ดวงฤดี อรุณเลิศศรีศรีมี เกิดที่จังหวัดราชบุรี ในวันที่ 27 พฤษภาคม 2526 จบการศึกษา ระดับชั้นมัธยมปลายในปี พ.ศ.2544 จากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี ในปี พ.ศ.2547 จบการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี เกียรตินิยมอันดับ 1) จาก คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี หลังจากจบการศึกษาในระดับปริญญาบัณฑิตได้เข้ารับการศึกษ ต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ (วิศวกรรมเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ถูกนำเสนอการในการประชุมผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติ The Sixth Asian BioCeramic Symposium 2006 (MTEC, NSTDA, MOST, CU, CHU) ในวันที่ 7-10 พฤษภาคม 2549 ณ Sofitel Central Plaza Bangkok, Thailand

ผลงานที่นำเสนอ

Arunlertratsamee, D.; Ratanavaraporn, J.; Kanokpanont, S.; and Damrongsakkul, S. Non woven polypropylene fabric (PP) and coated PP for *in vitro* mammalian cell culture. The Sixth Asian BioCeramic Symposium 2006. (2006): 295-297