

ผลของวิธีการเชื่อมโยงพันธะที่มีต่อลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากเจลาติน-ไคโตซาน

นายณัฐนาท ไชยถาวร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CROSSLINKING METHODS ON CHARACTERISTIC OF GELATIN-
CHITOSAN SCAFFOLD

Mr Naruenat Chaithaworn

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของวิธีการเชื่อมโยงพันธะที่มีต่อลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยง
เซลล์ที่ทำจากเจลาติน-ไคโตซาน

โดย

นายณัฐนาท ไชยถาวร

สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.โสจรดา กนกพานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย

เป็น

ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.โสจรดา กนกพานนท์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศราวุธ ริมดุสิต)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อาทิวรรณ โชติพิฤกษ์)

..... กรรมการ

(ดร.ณัฐพร พิมพะ)

นฤนาท ไชยถาวร : ผลของวิธีการเชื่อมโยงพันธะที่มีต่อลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์
 ที่ทำจากเจลาติน-ไคโตซาน (EFFECTS OF CROSSLINKING METHODS ON
 CHARACTERISTICS OF GELATIN-CHITOSAN SCAFFOLD) อ. ที่ปรึกษา: อ.ดร.ไศรดา
 กนกพานนท์, 108 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน
 (70:30) สำหรับใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง โครงเลี้ยงเซลล์ถูกขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแข็งและ
 เชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบใช้ความร้อนร่วมกับออสสารละลายกลูตาร์ดีไฮด์ (GA) โดยมีการ
 ศึกษาผลของอุณหภูมิ (4, 25, 37 องศาเซลเซียส), เวลา (6, 12, 24, 48 ชั่วโมง), และความเข้มข้น
 ของสารละลาย GA (0.03, 0.06, 0.085, 0.12% wt/v) ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ การทดสอบลักษณะ
 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และ
 แบบใช้ความร้อนร่วมกับออสสารละลาย GA คือ ใช้ความเข้มข้นของ GA 0.06% โดยปริมาตร อุณหภูมิ
 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด และใช้ความเข้มข้นของ GA 0.0047% โดยปริมาตร
 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด ตามลำดับ ทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยง
 พันธะแบบแช่และแบบใช้ความร้อนร่วมกับออสสารละลาย GA มีขนาดรูพรุน 95-105 และ 85-95
 ไมครอน ความทนแรงกด 0.4-0.5 กิโลปาสคาล และ 0.25-0.35 กิโลปาสคาล ค่าครึ่งชีวิตของการย่อย
 สลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส 32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายนอกร่างกายประมาณ 8-9 วัน และ 7-8 วัน
 ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีอื่นๆ ได้แก่ การเชื่อมโยงพันธะ
 ด้วยความร้อน และการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย dimethyl laminopropyl
 carbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่
 ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะ
 แบบใช้สารเคมีมีระดับการเชื่อมโยงพันธะ ความทนแรงกด การสูญเสียน้ำหนักและการหดตัวสูงกว่า
 โครงเลี้ยงเซลล์แบบ DHT โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบออส GA มีลักษณะสมบัติใกล้เคียงกับ
 โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ EDC/NHS แต่โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีการสูญเสียน้ำหนัก
 และการหดตัวที่ค่อนข้างสูง โครงเลี้ยงเซลล์แบบออส GA ผ่านการทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยง
 เซลล์ด้วยวิธี elution test ตามมาตรฐาน ISO 10993

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี....

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา..... วิศวกรรมเคมี....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา..... 2550.....

4870336221: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: GELATIN/ CHITOSAN/ DEHYDROTHERMAL TREATMENT/ GLUTARALDEHYDE/ 1-ETHYL-3-(3-DIMETHYLAMINOPROPYL) CARBODIIMIDE HYDROCHLORIDE/ BIOMATERIALS

NARUENAT CHAITHAWORN: EFFECTS OF CROSSLINKING METHODS ON CHARACTERISTICS OF GELATIN-CHITOSAN SCAFFOLD. THESIS ADVISOR: SORADA KANOKPANONT, Ph.D., 108 pp.

The current studies investigated the effects of crosslink methods on characteristics of gelatin-chitosan scaffolds (0.5 and 0.8% wt/wt total solids) for soft tissue engineering applications. The freeze-dried scaffolds were crosslinked by immersion under glutaraldehyde solution (GA) (GAS) or vacuum heat treatment followed by GA vapor treatment (DGAV). The crosslink processes were done at variable temperatures (4, 25, 37°C), time of crosslink (6, 12, 24, 48 h), and concentration of GA solution (0.03, 0.06, 0.085, 0.12% wt/v). Physico-chemical properties of these scaffolds were evaluated. The optimum conditions for GAS process, and DGAV process were 0.06%GA concentration, at 4°C for 24 hours and 0.0047%GA concentration at 4°C for 24 hours respectively. Pore size of these scaffolds were in the range of 95-105 and 85-95 microns, compressive moduli were 0.4-0.5 and 0.25-0.35 kPa, and their half lives in collagenase (32 U/ml) 8-9 and 7-8 days respectively. In comparison to the scaffolds crosslinked using other methods, such as, dehydrothermal crosslinking (DHT) and DHT followed by immersion under dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide solution (DEDIC). Pore sizes of all scaffolds had no significant differences. However the scaffolds from chemical crosslink processes showed higher degree of crosslinking, compressive moduli, weight loses and shrinkages than those of the DHT. Characteristics of the scaffolds from DGAV method led to more weight loses and shrinkages similar to those from DEDIC method. The DGAV scaffolds were tested on cytotoxicity (indirect method) and the samples were found to be nontoxic according to ISO 10993 (1998).

Department.....Chemical Engineering.....	Student's signature.....
Field of study.....Chemical Engineering.....	Advisor's signature.....
Academic year.....2007.....	

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ดร. ไศรดา กนกพานนท์ และ รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล เป็นอย่างสูง สำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ห้องปฏิบัติการ iTissue Lab คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการแนะนำให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณมากๆ สำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

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 โครงสร้างเซลล์ (scaffold).....	5
2.2 เจลาติน.....	5
2.3 ไคโตซาน.....	9
2.4 คอลลาเจน.....	13
2.5 ไกลโคซามิโนไกลแคน.....	17
2.6 การเชื่อมโยงพันธะ (crosslinking).....	19
2.6.1 การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีทางกายภาพ.....	19
2.6.2 การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีทางเคมี.....	21
2.6.3 การเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Enzyme).....	27
2.7 การทดสอบผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์.....	29
2.7.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test).....	30
2.7.2 การทดสอบสภาวะที่ไวต่อสิ่งกระตุ้น (sensitization test).....	31
2.7.3 การทดสอบการโต้ตอบใต้ผิวหนัง (intracutaneous reactivity).....	31

2.7.4 การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง (subchronic toxicity).....	32
2.7.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อยีน (genotoxicity).....	33
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	34
2.9 เอกสารสิทธิ (patents).....	36
3. อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย.....	39
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	40
3.2 วัตถุประสงค์และสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	41
3.3 วิธีการทดลอง.....	43
3.3.1 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์.....	43
3.3.2 การเชื่อมโยงพันธะ.....	43
3.3.3 การทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	45
3.3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	48
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	49
4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	50
4.1 ผลของการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ สารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (GA).....	51
4.1.1 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ.....	51
4.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย GA ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ โครงเลี้ยงเซลล์.....	59
4.2 การเปรียบเทียบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ ด้วยวิธีต่างๆ.....	64
4.3 ผลของการนำสารละลาย GA มาใช้ใหม่ในการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยง เซลล์แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA.....	76
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	78
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	80
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	81
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	86

ภาคผนวก ก.....	87
ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์.....	87
ภาคผนวก ข	92
การหาค่าความทนต่อแรงกด.....	92
ภาคผนวก ค	97
การหาระดับการเชื่อมโยงพันธะจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ.....	97
ภาคผนวก ง	101
การการทดสอบจำนวนเซลล์สัมผัสในห้องปฏิบัติการ.....	101
ภาคผนวก จ	101
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	103
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	108

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 สมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B.....	7
2.2 องค์ประกอบในเจลาติน.....	8
2.3 ส่วนประกอบของคอลลาเจนชนิดต่างๆ.....	17
2.4 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีววิทยาที่จัดอยู่ในกลุ่มของ surface device	30
2.5 ระดับการรอดชีวิตของเซลล์.....	31
3.1 รหัสสูตรต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน.....	45
4.1 ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w และ 0.8% w/w.....	74
4.2 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ (ต่อ).....	54
4.3 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	60
4.4 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 และร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	65
4.5 ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w และ 0.8% w/w.....	71
4.6 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะข้ามในสารละลายเดิม ของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV.....	74
ก.1 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ.....	87
ก.2 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ (ต่อ).....	88

ตาราง	หน้า
ก.3 ขนาดรูปทรง, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	89
ก.4 ขนาดรูปทรง, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 และร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	90
ก.5 ขนาดรูปทรง, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม ของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV.....	91
ข-1 ตัวอย่าง compression stress-strain ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบ ใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	93
ค-1 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV (0.06% v/v) ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ.....	98
ค-2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV (0.06% v/v) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	99
ค-3 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w และ 0.8% w/w.....	99
ค-4 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w และ 0.8% w/w....	100
จ.1 ระดับการรอดชีวิตของเซลล์.....	103

สารบัญญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 ขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin.....	6
2.2 โครงสร้างของเจลาติน.....	7
2.3 โครงสร้างโมเลกุลของโคโตซาน.....	10
2.4 โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซานในระดับนาโนที่ได้มาจากกระบวนการ deacetylation....	13
2.5 โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	14
2.6 โครงสร้างแบบ triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	14
2.7 กระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1.....	16
2.8 หน่วยซ้ำของ chondroitin-6-sulfate	18
2.9 การเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมโยงพันธะโดยการใช้ UV irradiation	20
2.10 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนกับ GA.....	21
2.11 โครงสร้างของโคโตซานที่ถูกเชื่อมโยงพันธะด้วย GA.....	22
2.12 โครงสร้างของคอลลาเจนกับโคโตซานเชื่อมโยงพันธะกับ GA	23
2.13 โครงสร้างของเซลลูโลสเมื่อเชื่อมโยงพันธะกับ GA.....	24
2.14 โครงสร้างของ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC).....	24
2.15 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนกับ EDC และ NHS.....	25
2.16 การเชื่อมโยงพันธะโควาเลนต์ระหว่าง chondroitin sulfate กับคอลลาเจน โดยใช้ EDC และ NHS.....	26
2.17 ปฏิกริยาระหว่าง γ -carboxamine group ของกลูตามีน (ตัวให้) กับหมู่อะมิโนของ primary amine ในคอลลาเจน (ตัวรับ).....	28
2.18 ปฏิกริยาของ transglutaminase.....	28
3.1 แผนผังการขึ้นรูปและการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์.....	40
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำ GA	45
4.1 ขั้นตอนการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ.....	50
4.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ.....	51
4.3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้น GA 0.06% v/v) ที่ 4, 25, และ 37 องศาเซลเซียส.....	53

ภาพประกอบ	หน้า
4.4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอของสารละลาย GA ที่ 4, 25, และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง.....	54
4.5 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ.....	55
4.6 ร้อยละน้ำหนักที่หายไปและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ.....	56
4.7 ระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV (0.06% v/v).....	57
4.8 ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน (70:30) ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5 % โดยน้ำหนัก ที่เชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารละลาย GA.....	58
4.9 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน (70:30) ปริมาณของแข็ง ทั้งหมด 0.5 % โดยน้ำหนักที่เชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารละลาย GA.....	58
4.10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่าน การเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA และแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA (240 ไมโครลิตร GA/127 มิลลิกรัมโครงเลี้ยงเซลล์) ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.085, 0.12% GA wt/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาชนะปิด ขนาด 1272 ลูกบาศก์เซนติเมตร.....	61
4.11 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ.....	62
4.12 ร้อยละน้ำหนักที่หายไปและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ.....	62
4.13 ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ.....	63
4.14 ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ.....	63
4.15 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ.....	64

ภาพประกอบ

หน้า

4.16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน-โคโคซาน 70:30 ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆที่มีรายงาน ในต่างประเทศเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้.....	66
4.17 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC.....	67
4.18 ร้อยละน้ำหนักที่หายไปและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC	68
4.19 ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโครงเลี้ยงเซลล์ DHT, GAS, DGAV, และ DEDC.....	70
4.20 ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC.....	70
4.21 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC.....	71
4.22 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโคซาน (70:30) ปริมาณของแข็ง ทั้งหมด 0.5% และ 0.8 % โดยน้ำหนัก.....	73
4.23 จำนวนเซลล์สัมผัสกับโครงเลี้ยงเซลล์ DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็ง ทั้งหมด 0.5%w/w และ 0.8%w/w โดยเพาะเซลล์จำนวน 20,000 เซลล์.....	75
4.24 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม.....	77
4.25 ร้อยละน้ำหนักที่หายไปและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม.....	77
4.26 ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม.....	78
4.27 ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำ ในสารละลายเดิม.....	78
4.28 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม.....	79
ข.1 กราฟแสดงค่า Young Modulus ซึ่งหาได้จากค่าความชันระหว่าง stress กับ strain ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบให้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	92
ค.1 กราฟแสดงสมการที่ใช้ในการหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจากความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเข้มข้น ของ β -alanine กับค่าการดูดกลืนแสง.....	98

ภาพประกอบ

หน้า

ค.1 กราฟแสดงสมการที่ใช้ในการหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจากความสัมพันธ์ระหว่าง

ค่าความเข้มข้นของ β -alanine กับค่าการดูดกลืนแสง.....93

ง.1 กราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 mouse fibroblast (n = 4).....102

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ผิวหนังแบ่งได้เป็น 2 ชั้นคือ ผิวหนังกำพร้า (epidermis) และผิวหนังแท้ (dermis) เมื่อมีการสูญเสียผิวหนังกำพร้าร่างกายสามารถที่จะสร้างผิวหนังส่วนนั้นขึ้นมาใหม่ได้ แต่เมื่อมีการสูญเสียผิวหนังแท้ ร่างกายจะไม่สามารถสร้างผิวหนังส่วนนั้นขึ้นมาใหม่ได้ จึงเกิดปัญหาในการรักษาบาดแผลเนื่องจากจะทำให้เกิดแผลเป็นขึ้น (scar) กับบริเวณที่สูญเสียผิวหนังไป จึงได้มีการศึกษาและวิจัยผิวหนังที่จะมาทดแทนผิวหนังส่วนที่สูญเสียไป เช่น การใช้ผิวหนังจากต่างเผ่าพันธุ์ (xenografts), การใช้ผิวหนังจากเผ่าพันธุ์เดียวกัน (allografts) และการใช้ผิวหนังของตัวเองจากผิวหนังส่วนอื่นมาแทนผิวหนังส่วนที่สูญเสียไป (autografts) แต่พบว่าการรักษาบาดแผลด้วยวิธีเหล่านี้ยังไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากปัญหาความสามารถที่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกัน (antibody) ในร่างกาย และเนื้อเยื่อที่มาทดแทนไม่สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลได้ รวมทั้งข้อจำกัดในปริมาณของผิวหนังทดแทนที่จะนำมาใช้ได้ [Jones, I. และคณะ, 2002] ด้วยสาเหตุนี้การวิจัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงได้มีการเปลี่ยนแปลงแนวทางใหม่ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่โดยเปลี่ยนมาใช้โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) โดยสร้างเลียนแบบแหล่งที่อยู่ของเซลล์ ซึ่งจะเหนี่ยวนำเซลล์ให้เคลื่อนที่เข้ามาอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์เกิดการแพร่จำนวนเซลล์และให้เซลล์เจริญเติบโตอยู่ภายใน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ต้องมีความเข้ากันกับเซลล์ได้และมีโครงสร้างที่เหมาะสม [Ma, L. และคณะ, 2003]

โครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้สร้างขึ้นมาจากพอลิเมอร์ที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อบริเวณนั้น (biocompatibility) ร่างกายสามารถย่อยสลายได้โดยไม่เกิดอันตราย รวมทั้งมีอายุการใช้งานนานพอที่จะทำให้สารชีวโมเลกุลต่างๆที่รวมอยู่กันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยคุณสมบัติดังกล่าวนี้มักพบอยู่ในพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด และที่นิยมนำมาใช้ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์กันมาก คือ คอลลาเจน เนื่องจากมีความเข้ากันกับเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดบาดแผลได้, มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพที่ดี และให้ความปลอดภัยกับร่างกายสูง เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดอื่น แต่มีปัญหายุ่งยากประการในการนำ คอลลาเจน มาใช้งาน เนื่องจาก คอลลาเจน มีราคาแพง มีอายุการใช้งานสั้น เก็บรักษายาก รวมถึงมีอัตราการย่อยสลายที่เร็วเกินไป และสมบัติเชิงกลที่ต่ำ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่จะนำ คอลลาเจน มาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว [Lee, CH. และคณะ, 2001] เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้ในงาน

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ ต้องมีอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์กับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อที่สอดคล้องกัน จึงมักมีการนำวัสดุชนิดอื่นผสมเพิ่มเติมลงไป เช่น ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน ได้นำไคโตซานผสมเพิ่มเติมลงไป ซึ่งไคโตซานมีคุณสมบัติในการห้ามเลือดที่ดี และเร่งการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ดังนั้นจึงมีการนำคอลลาเจน และไคโตซานมาผสมกันเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ [Tangsadthakun, C. และคณะ, 2005]

เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน ซึ่งเกิดจากการเสียสภาพของ คอลลาเจน โดยขบวนการ acidic และ alkaline gelatin โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย รวมทั้งมีราคาต่ำกว่าคอลลาเจนมาก ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้กับร่างกายมนุษย์ [Young, S. และคณะ, 2005] ในการทำวิจัยนี้ได้นำเจลาตินมาผสมรวมกับไคโตซาน โดยมีการควบคุมอัตราการย่อยสลายด้วยวิธีการเชื่อมโยงพันธะทั้งแบบวิธีการให้ความร้อนในตู้อบสูญญากาศ (dehydrothermal treatment, DHT) การใช้สารเคมี glutaraldehyde (GA) และ 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) การเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนเป็นการเชื่อมโยงพันธะระหว่างโซ่ของโมเลกุลจากปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) ด้วยการสร้างพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่เอมีนกับหมู่คาร์บอกซิลิกและมีการขับโมเลกุลของน้ำออกมา [Pieper, J.S. และคณะ, 2000] การเชื่อมโยงพันธะของ GA เกิดจากหมู่แอลดีไฮด์ของ GA เชื่อมโยงพันธะกับหมู่อะมิโน ของเจลาติน โดยวิธีนี้ GA จะเข้าไปแทรกอยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ [Ruiz, M. และคณะ, 2002] ส่วนการเชื่อมโยงพันธะของ EDC เกิดจากหมู่เอมีนของ EDC เชื่อมโยงพันธะกับหมู่คาร์บอกซิลิกของเจลาติน โดยที่ EDC จะเข้าไปเคลือบผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ มีรายงานว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA มีความเป็นเนื้อเดียวกันมาก เนื่องจากมีการกระจายตัวของพันธะอย่างเป็นระเบียบในโมเลกุลซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีสมบัติทางกลที่ดีขึ้น นอกจากนี้ GA ยังได้รับรองคุณภาพจากองค์การอาหารและยาจากประเทศสหรัฐอเมริกา แต่ EDC ยังไม่ได้รับรองคุณภาพจากองค์การอาหารและยา แต่มีความเป็นพิษต่ำ เนื่องจากสารที่ได้หลังจากการเชื่อมโยงพันธะคือ อนุพันธ์ของยูเรีย ซึ่งกำจัดออกได้ง่ายด้วยการล้างน้ำ [Goissis, G. และคณะ 1998]

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน ได้แก่ การใช้ความร้อน (DHT), การแช่ในสารละลาย GA, การใช้ความร้อนร่วมกับอบไคโตซาน และ การใช้ความร้อนร่วมกับ EDC รวมทั้งการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสมบัติสำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านแต่ละกระบวนการเชื่อมโยงพันธะ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังที่ขึ้นรูปจากเจลาตินผสมกับไคโตซาน ให้มีความเหมาะสมในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ด้วยวิธีการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน หรือ dehydrothermal treatment (DHT) และการใช้สารเคมี ได้แก่ การใช้กลูตารัลดีไฮด์(GA) และการใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (EDC) โดยศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ, ทางเคมี และทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินไคโตซาน

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

- ได้ทราบถึงปัจจัยที่มีผลกับการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบอบไอ GA
- ได้เข้าใจถึงวิธีการเชื่อมโยงพันธะที่ต่างกันมีผลต่อการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์
- ได้พัฒนาวิธีการเชื่อมโยงพันธะด้วยไอของ GA เพื่อลดสารพิษที่ตกค้างหลังการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA และผ่านการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยผ่านมาตรฐาน ISO 10993

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.4.1) ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เจลาตินผสมกับไคโตซาน 0.5 % โดยน้ำหนักในอัตราส่วน 7:3 ด้วยวิธีการทำให้แข็งอย่างรวดเร็วที่ -40 องศาเซลเซียส ในแม่แบบแล้วทำการระเหิดน้ำออกด้วยเครื่องทำแห้งแข็ง (freeze-dryer)
- 1.4.2) ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 1.4.1 แต่ใช้เจลาตินผสมกับไคโตซาน 0.8% โดยน้ำหนัก
- 1.4.3) ทำการเชื่อมโยงพันธะกับโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนี้
 - เชื่อมโยงพันธะโดยการใช้ใช้ความร้อน
 - เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA
 - เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอในสารละลาย GA
 - เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่ในสารละลาย EDC
- 1.4.4) ศึกษาลักษณะสมบัติในด้านต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้น ทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ ลักษณะพื้นผิวโดยรวม ขนาดของรูพรุน การดูดน้ำ ความทนทานต่อแรงกด ระดับการเชื่อมโยงพันธะ รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA

- 1.4.5) ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ การย่อยสลายทางชีววิทยา (biodegradability) และการรอดชีวิตของเซลล์ L929 ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ
- 1.4.6) ทำการทดสอบมาตรฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ เพื่อที่จะนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในมนุษย์

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างเซลล์ (scaffold)

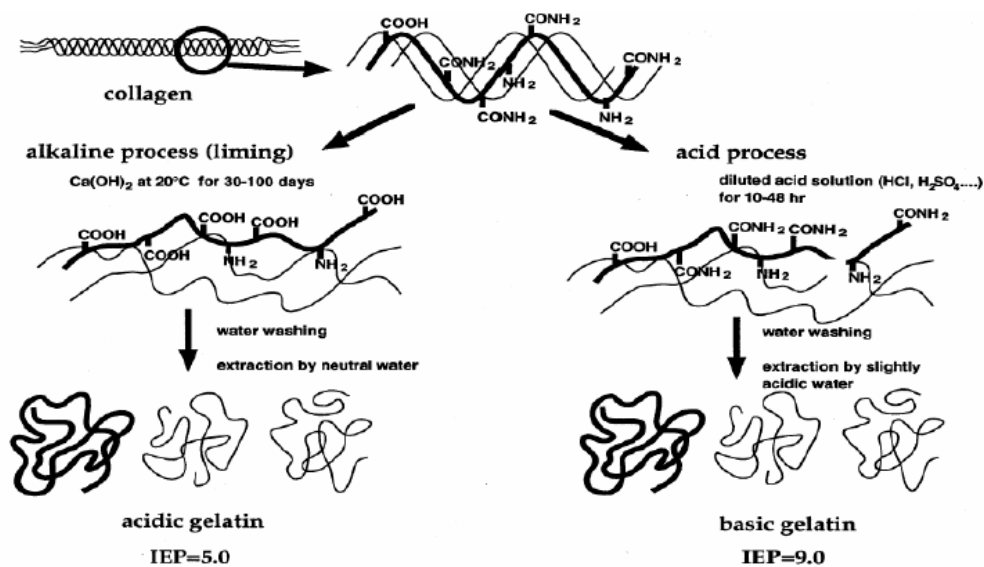
ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อโครงร่างเซลล์ถูกใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆในร่างกาย เมื่อเนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านั้นได้รับความเสียหาย โดยที่โครงร่างเซลล์ถูกสร้างขึ้นให้มีลักษณะคล้ายกับที่อยู่ของเซลล์ (extracellular matrix, ECM) ซึ่งทำหน้าที่ดึงดูดให้เซลล์บริเวณรอบๆ เคลื่อนที่เข้ามาอยู่ในโครงร่างเซลล์ จากนั้นเซลล์จะทำการแบ่งตัวและแพร่จำนวนเซลล์ รวมทั้งหลั่งสารต่างๆทำให้เกิดการเคลื่อนตัวเข้ามาของเซลล์เพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และพัฒนากลายเป็นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ สุดท้ายโครงร่างเซลล์ก็จะถูกย่อยสลายหมดไปเอง [Ma, PX.2004]

โครงร่างเซลล์ที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มักสร้างขึ้นโดยเลียนแบบสภาวะของ ECM โดยส่วนใหญ่จะสร้างขึ้นมาจาก คอลลาเจน เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในร่างกาย (ประมาณ 30% ของโปรตีนที่มีอยู่ในร่างกาย), มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability), มีความสามารถเข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี (biocompatibility) และไม่เป็นพิษ (non-toxic) กับเซลล์ [Ma, L. และคณะ, 2003] แต่มีปัญหายุ่งยากประการในการนำคอลลาเจนมาใช้ งาน เนื่องจากมีราคาแพง เก็บรักษา ยาก รวมถึงมีอัตราการย่อยสลายที่เร็ว และสมบัติทางกลที่ต่ำ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่จะนำ คอลลาเจน มาสร้างเป็นโครงร่างเซลล์เพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงมีการออกแบบและปรับปรุงคุณสมบัติต่างๆของโครงร่างเซลล์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้งาน [Lee, CH. และคณะ, 2001] เนื่องจากโครงร่างเซลล์ที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต้องมีอัตราการย่อยสลายของโครงร่างเซลล์กับอัตราการสร้างเนื้อเยื่อที่สอดคล้องกัน จึงมักมีการนำวัสดุชนิดอื่นผสมเพิ่มเติมลงไป เช่น ในโครงร่างเซลล์คอลลาเจน ได้นำไฮโดรอกซีอะพาทิตเพิ่มเติมลงไป ซึ่งไฮโดรอกซีอะพาทิตมีคุณสมบัติในการห้ามเลือดที่ดี และเร่งการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ดังนั้นจึงมีการนำคอลลาเจน และไฮโดรอกซีอะพาทิตมาผสมกันเป็นโครงร่างเซลล์ [Tangsadthakun, C. และคณะ, 2005]

2.2 เจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติชนิดหนึ่งที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน ซึ่งสกัดมาจากคอลลาเจน โดยขบวนการ acidic และ alkaline process แล้วจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์, เพิ่มความเข้มข้น, ผ่านขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อโรค และการทำให้แห้ง จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมา 2 ชนิดคือ basic gelatin หรือ เจลาตินชนิด A และ acidic gelatin หรือ เจลาตินชนิด B ซึ่งขั้นตอนการสกัด เจลาตินทั้งสองชนิดนี้ แสดงดังรูปที่ 2.1 โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรมและทางการ

แพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพและมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของ ยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ [Young, S. และคณะ, 2005]



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin
(ที่มา: Tabata, Y., 1998; 31: 287-301.)

เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ [Tabata, Y. 1998]

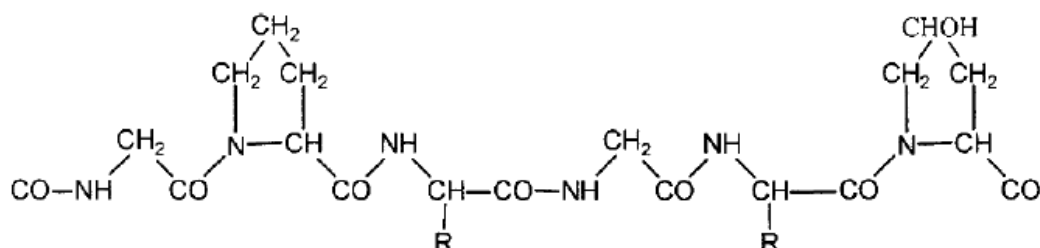
1. Basic gelatin (Type A gelatin): ได้มาจาก acid process แสดงดังรูปที่ 2.1 มีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนและเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด
2. Acidic gelatin (Type B gelatin): ได้มาจาก alkaline process ดังรูปที่ 2.1 เป็นขบวนการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมต์ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุลบ และมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส

สมบัติของเจลาติน Type A และ B สรุปดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 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 2.2



R = glycine-X-Y triplet

X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเจลาติน
(ที่มา: Lee, SB., 2005; 24: 2503-2511.)

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด และมีปริมาณของกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ที่มากเช่นเดียวกับคอลลาเจนและเนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโน methionine, tyrosine และ cystine ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophilic จึงทำให้เจลาตินละลายน้ำได้ดี [Neuman, RE. 1949] ซึ่งสามารถสรุปปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ใน เจลาตินดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบในเจลาติน

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%

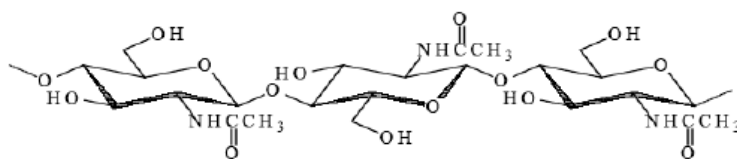
ความสำคัญของเจลาตินถูกใช้เป็นอย่างมาก ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อดังที่พบได้จากงานวิจัยของ Tabata ในปี 1999 ที่ศึกษาการใช้เจลาตินเป็นวัสดุทดแทนผิวหนังที่มีสมบัติในการควบคุมการส่งผ่าน (control release) โกรสแฟคเตอร์ bFGF (basic fibroblast growth factor) โดยในการทดลองทำการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจลจากเจลาติน แล้วเชื่อมโยงพันธะด้วยกอลลูตารัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากนั้นจึงนำแผ่นไฮโดรเจลที่ได้แช่ใน

สารละลายไกลซีน (glycine) เพื่อกำจัดหมู่แอลดีไฮด์ออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง จากนั้นทำการเติม bFGF จากผลการทดลองใช้ไฮโดรเจล ในการควบคุมการส่งผ่าน bFGF (basic fibroblast growth factor) พบว่า bFGF ที่อยู่ใน basic gelatin จะถูกส่งผ่านได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่ bFGF ที่อยู่ใน acidic gelatin จะถูกส่งผ่านได้น้อย และไฮโดรเจลที่มีค่าการดูดซับน้ำสูงกว่า จะสลายตัวได้เร็วกว่าไฮโดรเจลที่มีค่าการดูดซับน้ำที่ต่ำกว่า ซึ่งแสดงถึง ผลการให้เจลาตินในการควบคุมการส่งผ่านโกรสแฟคเตอร์ในโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานด้านวิศวกรรม เนื้อเยื่อ

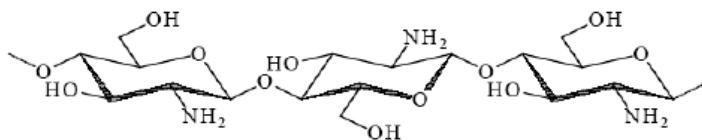
ในงานวิจัยของ Kang และคณะ ในปี 1999 ที่ศึกษาวิธีการเตรียมวัสดุรูพรุน โดยการเตรียม ไฮโดรเจลที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจากเจลาตินที่มีการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ หลังจากการล้างไฮโดรเจลด้วยไกลซีนและน้ำ แล้วจึงนำไฮโดรเจลไปแช่แข็งเพื่อทำแห้งที่จุดเยือกแข็ง ต่อไป โดยที่ทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการแช่แข็ง 3 อุณหภูมิ คือ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส (ไนโตรเจนเหลว) โครงสร้างของรูพรุนที่ได้จากการทำแห้งมีลักษณะแตกต่างกันตามอุณหภูมิแช่แข็ง โดยที่แผ่นไฮโดรเจลที่ถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว จะมีโครงสร้างที่เป็น 2 มิติ (two-dimension) ในขณะที่ แผ่นไฮโดรเจลที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะมีโครงสร้างเป็น 3 มิติ รูพรุนจะมีความ ต่อเนื่องกันมากขึ้น โดยมีขนาดรูพรุนประมาณ 250 ไมโครเมตร ซึ่งเมื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศา เซลเซียส แผ่นจะมีโครงสร้างเป็น 2 มิติและมีขนาดรูพรุนประมาณ 85 ไมโครเมตร

2.3 ไคโตซาน

ไคโตซานคือ อนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่อะซิติกของน้ำตาล 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] และไม่สามารถ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทั้งหมดและน้ำที่มีค่า pH เป็นกลางหรือด่าง แต่สามารถละลายใน กรดอ่อน ไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine อยู่ใน สายพอลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (หรือเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation) มีผลต่อ สมบัติและการทำงานของไคโตซาน นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายไค โตซานซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีสายยาวและสารละลายมีความ หนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นต้น ดังนั้นการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์จะต้อง พิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation และน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งโครงสร้างของไคตินและไคโตซาน แสดงดังรูปที่ 2.3



โครงสร้างของไคติน



โครงสร้างไคโตซาน

รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของไคโตซาน

ไคตินและไคโตซานนั้นเป็นวัสดุเชิงประกอบที่มีความเหนียวฉีกขาดยาก และสามารถรับแรงได้สูงและไม่เปลี่ยนรูปร่างได้ง่าย ถ้าหากพิจารณาในเชิงโครงสร้างไคตินจะจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างผลึกเหลวแบบคลอเลสเทอริก (cholesteric liquid crystal structure) โดยมีโปรตีนและแคลเซียมคาร์บอเนตแทรกทำให้วัสดุชนิดนี้ทนแรงได้ทุกทิศทาง ไคตินและไคโตซานมีความเป็นวัสดุพิเศษคือ ตัววัสดุสามารถทำหน้าที่ทางเคมีหรือทางชีวภาพบางอย่างได้ด้วยตัวเอง ตัวอย่างเช่น เป็นแผ่นโพลาร์เมมเบรน (polar membrane) ซึ่งสามารถใช้ในการแยกแอลกอฮอล์(เจือจาง)โดยกระบวนการเพอร์วาพอเรชัน (pervaporation) เป็นต้น

สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคติน-ไคโตซาน (ภาวดี เมธะคานนท์, 2545)

การละลาย (Solubility)

ไคตินไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ต่างเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) เข้มข้น กรดซัลฟูริก (กรดกำมะถัน) 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 กรดอะซีติกและกรดฟอร์มิกเป็นกรดที่นิยมใช้ในการละลายไคโตซาน กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริกกรดเปออร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก สามารถละลายไคโตซานได้

เช่นกัน แต่ภายใต้การคนที่อุณหภูมิสูงปานกลางอย่างไรก็ตามในบางครั้งอาจมีตะกอนขาวคล้ายฝุ่นเกิดขึ้นสารละลายไคโตซานมีความเหนียวใส มีพฤติกรรมแบบนอน-นิวตันเนียน (non-newtonian) ในสารละลาย หมู่อะมิโนของไคโตซานจะแตกตัวโดยมีค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pKa) ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุพอลิเมอร์โดย pKa ของไคโตซานมีค่าอยู่ในช่วง 6.2 – 6.8

น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

ไคตินในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากกว่า 1×10^5 ในขณะที่ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 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 แต่ชนิดของกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายพอลิเมอร์จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เช่นความหนืดของไคโตซานในกรดอะซีติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่า 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 นอกจากนี้ยังพบว่า หมู่อะมิโนไคโตซานมีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่อะซีติลในไคติน ดังนั้นไคโตซานที่มี degree of deacetylation สูงจะมีอัตราการดูดซับหรือความสามารถในการจับกับ

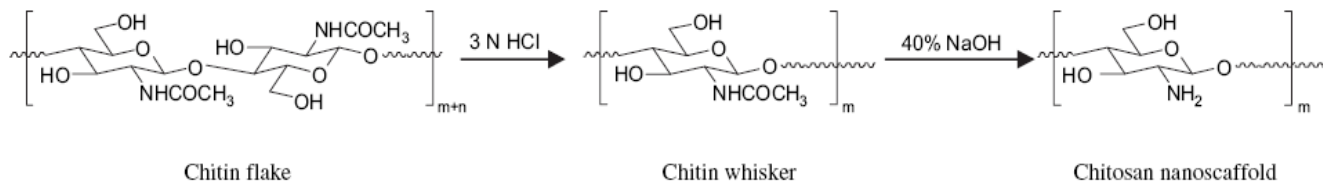
ไอออนของโลหะสูง ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะของไคโตซานยังขึ้นอยู่กับอีกหลายปัจจัย เช่น ความเป็นผลึก และความสามารถในการบวมตัวของไคโตซาน

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

จากงานวิจัยของ Tangsadthakun และคณะ ในปี 2006 ที่ได้ทำการศึกษเกี่ยวกับอิทธิพลของมวลโมเลกุลของไคโตซานต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลลาเจนและไคโตซาน ด้วยการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยความเย็นแล้วเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อน (dehydrothermal crosslinking) ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนของคอลลลาเจนต่อไคโตซาน 5 แบบคือ 100/0; 90/10; 70/30; 50/50; 30/70; 10/90 และ 0/100 และทำการเปลี่ยนค่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (Mw: weight-averaged molecular weight) 4 ค่าคือ XLMW (49 kDa), LMW (180 kDa), MMW (460 kDa), HMW (1,450 kDa) จากการทดสอบพบว่าในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไคโตซานมวลโมเลกุลสูง (HMW) ที่มีอัตราส่วนของไคโตซาน 30 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าโมดูลัสเพิ่มขึ้น และมีประสิทธิภาพมากในการนำไปทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell adhesion and proliferation) ด้วยเซลล์ผิวหนังของหนูและมนุษย์ โดยทำการทดสอบด้วยการจำลองสภาวะของสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ด้วยจำนวนเซลล์ 20,000 เซลล์ต่อหนึ่งโครงเลี้ยงเซลล์

งานวิจัยของ Mao และคณะในปี 2003 ได้ศึกษาถึงการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน ด้วยการใช้เทคนิคการทำแห้งที่จุดเยือกแข็ง (Freeze drying technique) โครงเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว (monolayer) และแบบ 2 ชั้น (bilayer) ถูกเตรียมแตกต่างกันที่อุณหภูมิแช่แข็งโดยโครงเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว ซึ่งถูกแช่แข็งในตู้แช่ที่อุณหภูมิต่างกันคือ -20 องศาเซลเซียส, -40 องศาเซลเซียส และ -60 องศาเซลเซียส ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์แบบ 2 ชั้น ถูกแช่โดยตรงด้วย lyophilizing plate ที่มีอุณหภูมิ -56 องศาเซลเซียส แล้วทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางกลและทางชีวภาพ จากการศึกษพบว่า การจัดเรียงตัวของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 2 ชั้น ประกอบด้วยชั้นที่เบาว่าซึ่งกับสัมผัสอากาศและชั้นที่หนาแน่นกว่าซึ่งสัมผัสกับกรดแช่แข็ง และการเรียงตัวของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 2 ชั้น มีความเป็นระเบียบมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว นอกจากนั้นยังพบว่าอุณหภูมิในการแช่แข็งที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ขนาดของรูพรุนเล็กลง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการใช้โครงเลี้ยงเซลล์คอลลลาเจน-ไคโตซาน ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนเหมาะสมกับงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Phongying, S ในปี 2006 ได้ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานในระดับนาโน (chitosan nanoscaffold) ด้วยวิธีการเติมกรด (HCl) และการเติมเบส (NaOH) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

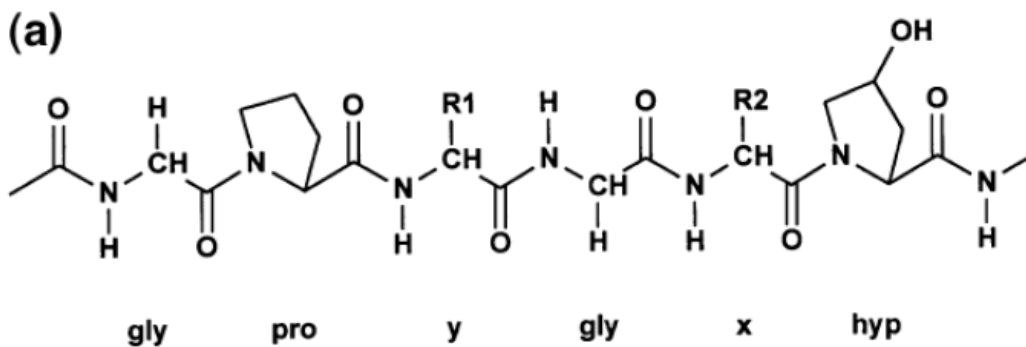


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ไคโตซานในระดับนาโน
 ที่ได้มาจากกระบวนการ deacetylation
 (ที่มา: Phongying, S., 2006; 48: 393-400.)

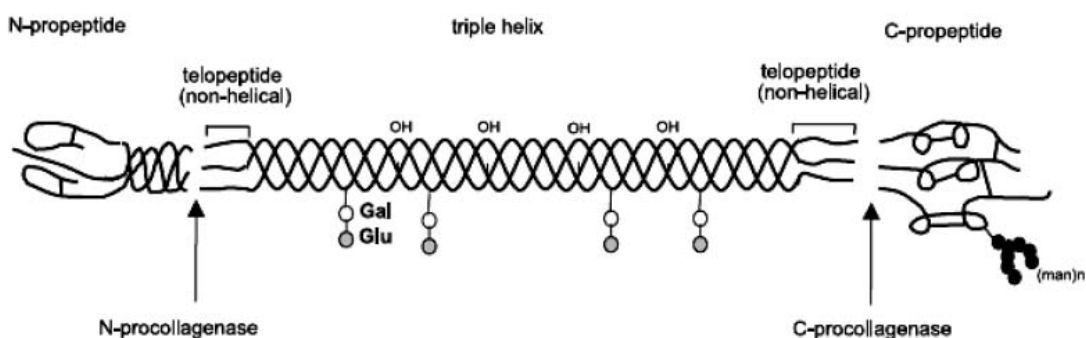
2.4 คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดใมนุุษย์และสัตว์ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนในร่างกาย คอลลาเจนเป็นส่วนประกอบของ extracellular matrix (ECM) หรือเรียกกว่าเป็นที่อยู่ของเซลล์ ซึ่งทำให้คอลลาเจนทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับอวัยวะต่างๆ เช่น เส้นเอ็น กระดูก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมดและยังคงพบคอลลาเจนในรอยต่อของเนื้อเยื่อที่ประกอบขึ้นเป็นส่วนของอวัยวะ คอลลาเจนช่วยสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อและอวัยวะ ให้มีโครงสร้างที่คงสภาพสมบูรณ์ ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีกลุ่มวิจัยต่างๆ สนใจคอลลาเจนเป็นจำนวนมากและได้แบ่งกลุ่มคอลลาเจนดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งคอลลาเจนในแต่ละกลุ่มจะมีหน่วยซ้ำที่เหมือนกันคือ Gly-X-Y ซึ่ง X แทน proline และ Y แทน 4-hydroxyproline แสดงดังรูปที่ 2.5 คอลลาเจนมีความเข้ากันได้ดีมากกับเซลล์ เนื่องจากพบมากตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย มี R-G-D peptide ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมีปฏิกิริยาสร้างภูมิคุ้มกันที่ต่ำ [Friess, W. 1998] โมเลกุลของคอลลาเจนประกอบไปด้วย polypeptide α -chain 3 เส้น ซึ่ง α -chain ทั้ง 3 เส้นพันรวมกันทำให้คอลลาเจนมีโครงสร้างเป็นแบบ triplehelix [Gelse, K. และคณะ, 2003] แสดงดังรูปที่ 2.6

การใช้ประโยชน์จากคอลลาเจนในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีมาก โดยเฉพาะคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง ซึ่งนิยมนำมาเป็นวัสดุทดแทนผิวหนังและแผลที่เกิดจากไฟไหม้ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะสมบัติทางกลที่เหมาะสมและมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์ [Rao, KP., 1995] ซึ่งบริษัทที่ผลิตคอลลาเจน เช่น sigma-aldrich และ Johnson&Johnson และงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อยังได้พัฒนาการใช้ คอลลาเจนในงานด้านอื่นๆ นอกจากผิวหนัง เช่น การแทนที่ของท่อลำเลียงเลือด ลิ้นปิดหัวใจ และ เอ็นยึด เนื่องจากคอลลาเจนแสดงสมบัติที่มีความสามารถในการห้ามเลือด โดยเหนี่ยวนำให้เกิด การจับตัวเป็นลิ่มหรือก้อนของเลือด และแสดงความสามารถในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ [Auger, FA. และคณะ, 1998]



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนชนิดที่ 1
(ที่มา: Friess, W., 1998; 45: 113-136.)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างแบบ triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1
(ที่มา: Gelse, K., 2003; 55: 1531-1546.)

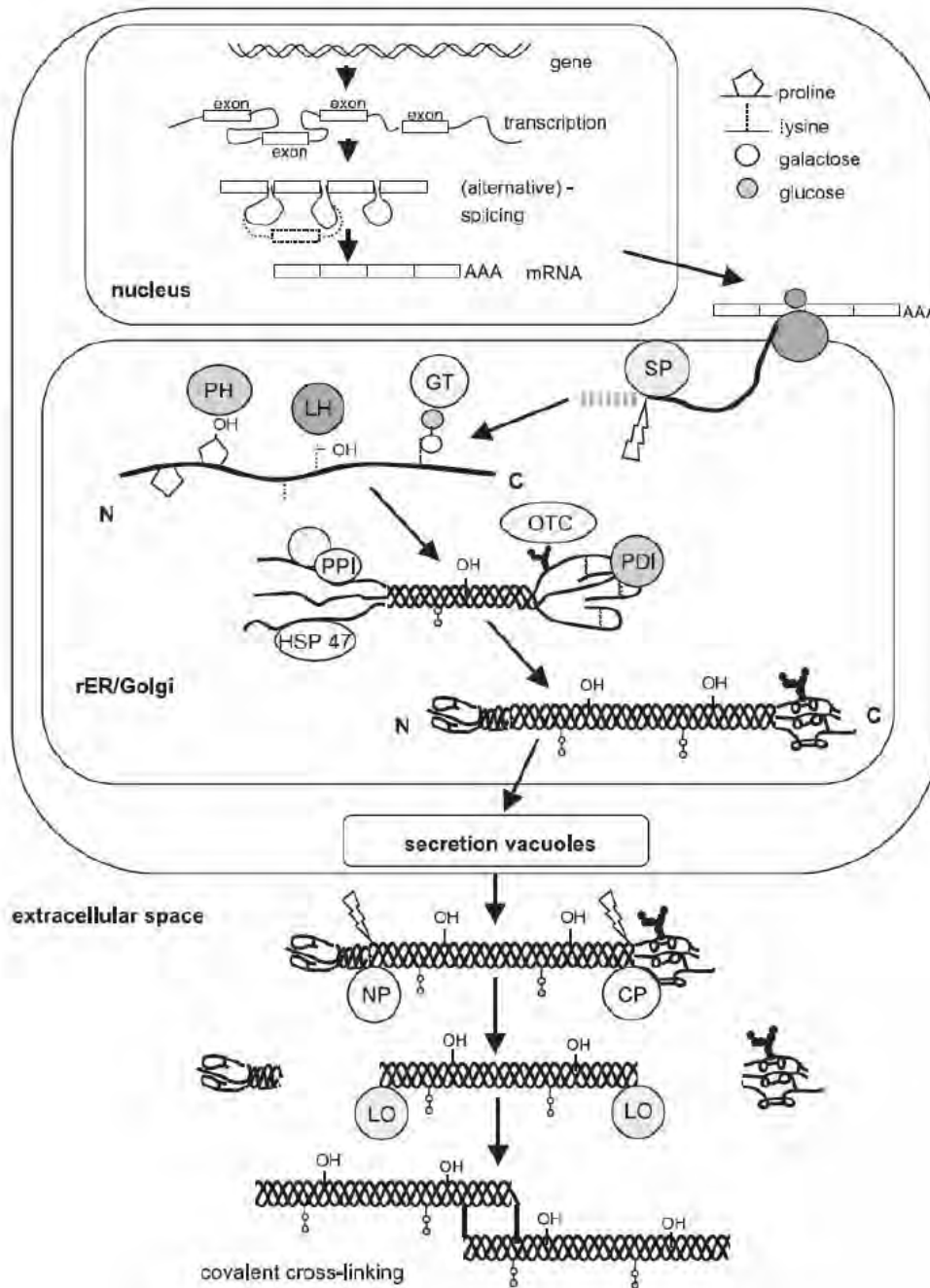
กระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 ในร่างกายซึ่งพบมากในส่วนของกระดูก ผิวหนัง เอ็น เยื่อ และกระจกตา ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนหลัก แสดงดังรูปที่ 2.7 ดังนี้ [Gelse, K. และคณะ, 2003]

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

คอลลาเจนเหมาะสำหรับการนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์มนุษย์ เนื่องจากพบมากในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทั้งยังมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย มีการต้านต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายที่ต่ำ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ และสามารถเพิ่มความสามารถในการชักนำเซลล์เข้ามายึดเกาะและเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามมีปัญหาบางประการที่นำคอลลาเจนมาใช้งาน ได้แก่ [Friess, W. 1998 และ Lee, CH. และคณะ, 2001]

- การเตรียมคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งให้บริสุทธิ์ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากการสกัดคอลลาเจนจากเนื้อเยื่อเป็นไปได้ยากเนื่องจากโมเลกุลในคอลลาเจนถูกเชื่อมโยงด้วยพันธะโควาเลนต์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุของสิ่งมีชีวิตและชนิดของเนื้อเยื่อที่สกัด
- เนื่องจากคอลลาเจนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สกัดได้จากแหล่งที่ต่างกัน และมีอยู่ตามอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย จึงทำให้คอลลาเจนมีความเป็นเนื้อเดียวกันต่ำ หรือ มีความสม่ำเสมอทางโครงสร้างต่ำ จึงทำให้เกิดความแปรปรวนต่างๆ เช่น ความหนาแน่นในการเชื่อมโยงพันธะ ขนาดของเส้นใย ความบริสุทธิ์ และการย่อยสลาย
- การคงสภาพโครงสร้างโมเลกุลของคอลลาเจนทำได้ยาก เนื่องจากคอลลาเจนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ มีการรุกรานของจุลินทรีย์ต่างๆ ง่าย และมีรายงานการติดเชื้อในคนไข้
- คอลลาเจนมีสมบัติทางกลที่ไม่แข็งแรง คือ มีการหดตัว (contraction) ของเส้นใยโดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสารละลายซีรัม

ลักษณะเด่นของคอลลาเจนคือ มีปริมาณกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ที่สูงซึ่งกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophobic protein และมีปริมาณของ กรดอะมิโน tyrosine, tryptophan, isoleucine, cystine และ histidine ที่ต่ำ [Neuman, RE. 1949]



รูปที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1
(ที่มา: Gelse, K., 2003; 55:1531– 1546.)

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

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของคอลลาเจนชนิดต่างๆ

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

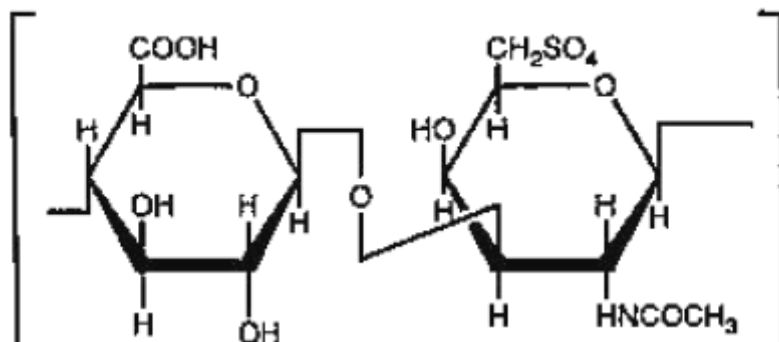
Given are the molecular composition, the genomic localization of the different chains as well as the basic tissue distribution.

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

2.5 ไกลโคซามิโนไกลแคน (GAG)

ไกลโคซามิโนไกลแคน เป็นองค์ประกอบสำคัญที่อยู่ในชั้นผิวหนังซึ่งอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจนที่อยู่ในชั้นหนังแท้ (dermis) GAG มีหลายชนิด มีลักษณะที่แสดงประจุเป็นลบและมีโครงสร้างคล้ายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่มีสาขา GAG มีหลายชนิด เช่น chondroitin-6 sulfate, dermatan sulfate, keratin sulfate, hyaluronan และ heparin เป็นต้น หน้าที่หลักของ GAG คือทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนสายหลักกลายเป็น proteoglycans อีกทั้งยังสามารถเพิ่มความสามารรถในการต้านทาน

การย่อยสลายของ extracellular matrix และสามารถจับยึดโมเลกุลโปรตีน จำพวกไซโตคายน์และโกรสแฟคเตอร์ที่มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของเซลล์ ในกระบวนการรักษาบาดแผล เป็นต้น ตัวอย่างเช่น 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 พื้นฐานที่พบในชั้นหนังแท้ที่มีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ดังเห็นจากงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีการใช้ chondroitin-6-sulfate (Shafritz และคณะ, 1994; Pek และคณะ, 2004; Lee และคณะ, 2004) เป็น GAG ในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการลดอัตราการย่อยสลายและเพิ่มความสามารถในการเกาะติดของเซลล์ในปี 1994 Shafritz และคณะได้ทำการศึกษาผลของ glycosaminoglycan ในโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-GAG ที่มีผลต่อการหายของบาดแผล (delay wound contraction and induces regeneration) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบผลจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็น คอลลาเจนชนิดที่ 1 กับ GAG ที่มีความแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ chondroitin-6-sulfate, dermatan sulfate, decorin (a proteoglycan-containing dermatan sulfate chain) และ aggrecan (a proteoglycan in which 90 % of chondroitin-6-sulfate) แล้วทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งควบคุมขนาดของรูพรุนด้วยการปรับเครื่องทำแห้ง (lyophilizer) ให้มีอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ถึง -38 องศาเซลเซียส และการเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ความดัน 50 มิลลิเมตรปรอท เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปิดทับโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย poly(dimethylsiloxane) เพื่อควบคุมความชื้นของบาดแผล เมื่อทำการทดสอบขนาดรูพรุนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-GAG พบว่ามีขนาด 91 ± 12 , 99 ± 23 , 102 ± 26 , 94 ± 23 , และ 160 ± 26 ไมโครเมตร ในโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-chondroitin-6-sulfate, คอลลาเจน-aggrecan, คอลลาเจน-dermatan sulfate, คอลลาเจน-decorin, และคอลลาเจน ตามลำดับ โดยมีอัตราการย่อยสลายด้วยการใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ซึ่งพบว่าอัตราการย่อยสลายเป็น 23.4 ± 3.4 , 38.6 ± 6 , 8.0 ± 3.9 ในโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-

chondroitin-6-sulfate, คอลลาเจน-aggrecan, คอลลาเจน-dermatan sulfate แต่ไม่สามารถวัดอัตราการย่อยสลายในคอลลาเจน-decorin ได้ และมีอัตราการย่อยสลาย 12.5-43.5 ในโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจนเพียงอย่างเดียว และเมื่อทดสอบจลนศาสตร์ในการปิดของบาดแผล (kinetics of wound contraction) ในการทดลองในหนูตะเภาพบว่า เมื่อเย็บโครงเลี้ยงเซลล์ คอลลาเจน-GAG จะมีการลดขนาดของแผลช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนเพียงอย่างเดียว

2.6 การเชื่อมโยงพันธะ (crosslinking)

การเชื่อมโยงพันธะเป็นวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญมากในการปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน เนื่องจากการเชื่อมโยงพันธะนั้นเป็นการทำให้สมบัติเชิงกล (mechanical properties), อัตราการย่อยสลาย (degradation rate), และความสามารถในการบวมน้ำ (swelling capacity) ของโครงเลี้ยงเซลล์มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น เนื่องจากการเชื่อมโยงพันธะสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายและอัตราการสร้างเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ [Ma, L. และคณะ, 2003] ซึ่งพบว่าในกระบวนการเชื่อมโยงพันธะนั้นมีวิธีการอยู่หลายวิธี โดยจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆคือ การเชื่อมโยงพันธะทางกายภาพ, การเชื่อมโยงพันธะทางเคมี และการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา

การเชื่อมโยงพันธะทางกายภาพ ได้แก่ การใช้ความร้อน หรือ dehydrothermal treatment (DHT), การใช้รังสี เช่น UV-irradiation เป็นต้น ส่วนการเชื่อมโยงพันธะทางเคมี ได้แก่ การใช้หมู่แอลดีไฮด์ เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (GA), formaldehyde , glycerinaldehydes, การใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), การใช้ polyepoxides, และการใช้ isocyanates เป็นต้น [Young, S. และคณะ, 2005] นอกจากนี้ยังมีการนำตัวเร่งปฏิกิริยา มาใช้ในการเชื่อมโยงพันธะอีกด้วย เช่น การใช้ transglutaminase เป็นต้น

2.6.1 การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีทางกายภาพ

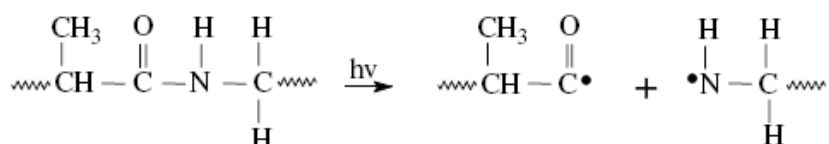
ก) การเชื่อมโยงพันธะโดยการใช้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT)

การเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้เพื่อหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ใช้เป็นตัวเชื่อมโยงพันธะ (cross-linker) ดำเนินการโดยอาศัยความร้อนภายใต้สุญญากาศที่ความดัน 0 มิลลิบาร์ ซึ่งกระบวนการนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์ (amide) ตัวใหม่ในสารจำพวกโปรตีนซึ่งมีหมู่เอมีน (amine) เป็นองค์ประกอบ จากปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) ระหว่างไฮดรอกซิลของหมู่เอมีน โดยทำการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่แล้วปรับเปลี่ยนระยะเวลาให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสมมากที่สุด [Ueda, H. และคณะ, 2002] ตัวอย่างเช่น โครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างมาจากคอลลาเจนถูกปรับปรุงให้มีความแข็งแรงมากขึ้นและมีการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้าลง ด้วยการเชื่อมโยงพันธะระหว่างโซ่ (interchain crosslinks) จากปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation)

หรือการสร้างพันธะเอไมด์ตัวใหม่ ระหว่างหมู่เอมีนของโมเลกุลคอลลาเจนที่อยู่ติดกันในโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนแล้ว ทำให้ปริมาณหมู่เอมีนอิสระและความสามารถในการกักเก็บน้ำในโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง ส่งผลให้ความทนต่อแรงดึง (tensile strength) เพิ่มขึ้น [Pieper, J.S. และคณะ, 1998] และเมื่อมีการนำการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนมาใช้กับคอลลาเจน ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าวิธีการนี้จะขับน้ำออกจากโมเลกุลของคอลลาเจน และทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในภายในโซ่ของคอลลาเจน ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในการเชื่อมโยงพันธะ แต่การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีนี้ก็ยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของคอลลาเจน (denature collagen) และความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ [Wess, T.G. และคณะ, 2000] แต่มีรายงานว่าได้มีการนำวิธีการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนไปใช้ร่วมกับการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC/NHS ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากคอลลาเจนผสมกับ chondroitin-6-sulfate เริ่มต้นจากการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนคอลลาเจน 92% chondroitin-6-sulfate 8% โดยอาศัยเทคนิคการทำแห้งแข็ง (freeze-dried) ก่อน แล้วจึงนำมาเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนในตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven) ที่สภาวะ 105 องศาเซลเซียส ความดัน 0 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเชื่อมโยงพันธะอีกครั้งโดยการแช่ในสารเคมี EDC/NHS ซึ่งสามารถเพิ่มความสามารถในการบวมน้ำสูงขึ้น 1.5 เท่า และเพิ่มความแข็งแรงทางกลสูงขึ้น 3 เท่าให้กับโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี EDC/NHS ในการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว [Pek, Y.S. และคณะ, 2004]

ข) การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการใช้รังสีอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Irradiation, UV)

การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการใช้รังสี UV เกิดจากการที่รังสี UV ทำให้เกิด photodegradation และพลังงานแสง เข้าไปกระตุ้นพันธะภายในโมเลกุลของคอลลาเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งไวต่อการเกิดปฏิกิริยาของหมู่เอมีนขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.9 โดยหมู่เอมีนอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะไปเชื่อมโยงพันธะกับหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนโมเลกุลอื่นทำให้เกิดการเชื่อมโยงพันธะระหว่างหมู่เอมีน [Sionkowska, A. 2006]



รูปที่ 2.9 การเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมโยงพันธะโดยการใช้ UV irradiation

(ที่มา :Sionkoska, A., 2006; 82: 9-15)

ค) การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการใช้รังสีแกมมา (gamma radiation)

การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการใช้รังสีแกมมา เป็นเทคนิคอย่างหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ซึ่งเทคนิคนี้ได้มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านการแพทย์ เช่น การตรึงเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะถูกตรึงอยู่บนพอลิเมอร์ ซึ่งเอนไซม์ที่นำมาใช้กับเทคนิคนี้ ได้แก่ urease, cellulose, glucose, oxidase, lipase, glucosamylase และ invertase เป็นต้น โดยดำเนินการเชื่อมโยงพันธะที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อนำรังสีแกมมาไปใช้กับคอลลาเจนและ poly(L-lactic acid) ที่ยึดเกาะกันด้วยพันธะโควาเลนต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ รังสีแกมมาจะเหนี่ยวนำให้คอลลาเจนและ poly(L-lactic acid) เกิดเป็นอนุมูลอิสระขึ้นโดยคอลลาเจนเกิดหมู่เอมีนอิสระ (NH_2^\bullet) ส่วน poly(L-lactic acid) เกิดหมู่คาร์บอกซิลิกอิสระ (COOH^\bullet) จากนั้นหมู่เอมีนอิสระที่เกิดขึ้นจะเชื่อมโยงพันธะกัน ส่งผลให้โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์มีความเสถียร และมีความสามารถในการบวมน้ำลดลง [Yang, Y. และคณะ, 2002]

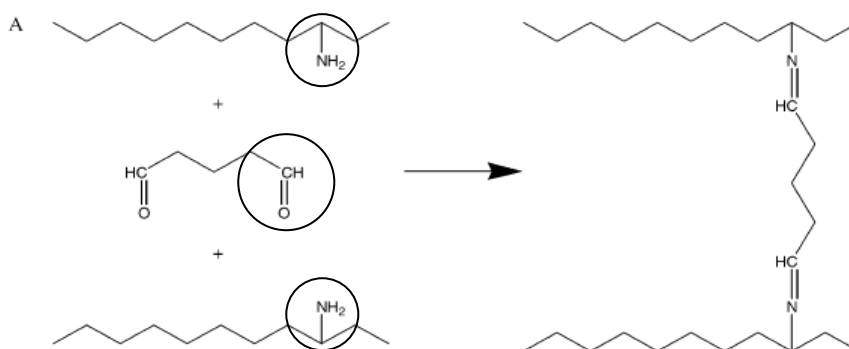
นอกจากนี้รังสีแกมมาถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการทำให้กระดูกปราศจากเชื้อ (sterilization of bone) จากเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรีย แต่การใช้รังสีแกมมาจะสร้างความเสียหายให้กับกระดูก เนื่องจากการเกิดหมู่อิสระขึ้นจากการแผ่รังสี โดยปฏิกิริยา radiolysis กับโมเลกุลของน้ำ ในรูปของหมู่อิสระของไฮดรอกซิล (OH^\bullet) [Akkus, O. และคณะ, 2005]

2.6.2 การเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีทางเคมี

ก) การเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ Glutaraldehyde (GA)

GA เป็นสารเคมี (reagent) ที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านชีวแพทยศาสตร์ (biomedical) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ (crosslinking agent) สำหรับโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์

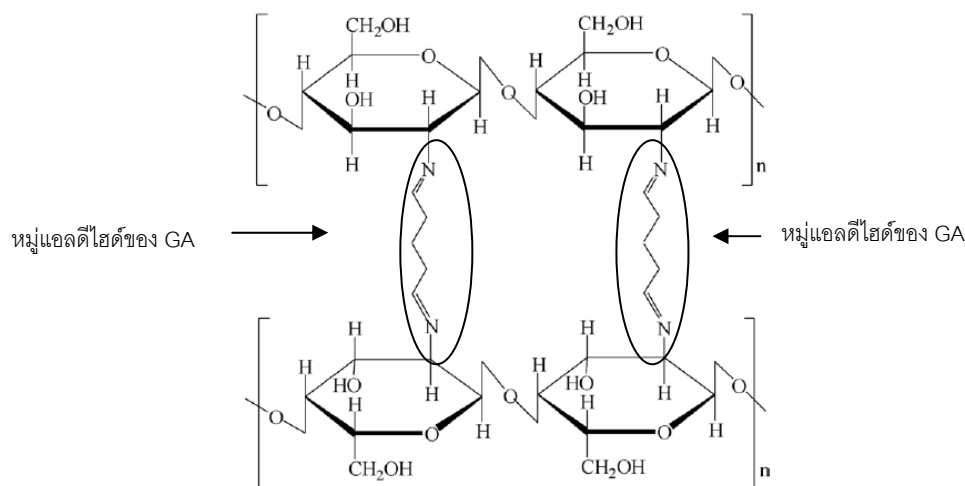
การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนเกิดขึ้นระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA กับหมู่เอมีน (NH_2) ของคอลลาเจนดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนกับ GA

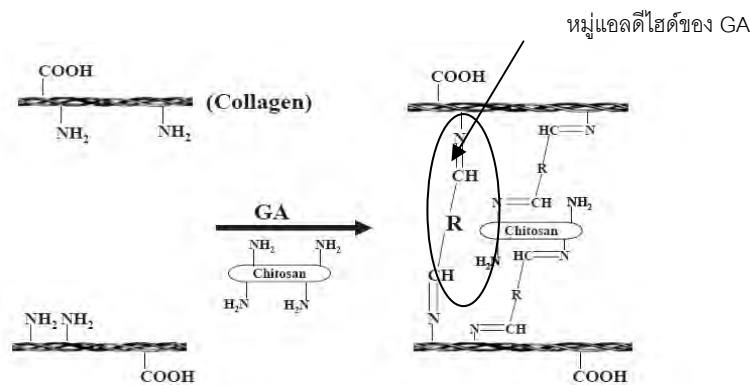
(ที่มา : Lee, C.R., 2001; 22: 3145-3154)

การเชื่อมโยงพันธะโคโตซานกับ GA เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA กับหมู่เอมีน (-NH₂) ของโคโตซาน หลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้วจะได้โครงสร้างอยู่ในรูปของ imine function ซึ่งพบว่าการเชื่อมโยงพันธะโคโตซาน กับ GA ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของโคโตซานถูกเชื่อมโยงพันธะด้วย GA
(ที่มา : Ngah, W, 2006; 277: 214-222)

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนเพียงอย่างเดียวมีคุณสมบัติเชิงกลที่ต่ำ และมีการย่อยสลายที่เร็ว จึงมีการทำการศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำวัสดุชีวภาพตัวอื่นมาผสมรวมเข้ากับคอลลาเจน ซึ่งโคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพตัวหนึ่งที่ยิมนำมาใช้ เนื่องจากโคโตซานมีคุณสมบัติที่ดีในการห้ามเลือดที่ดี (hemostasis), ช่วยเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ fibroblast ใหม่ และช่วยต้านทานการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยโคโตซานสามารถใช้หมู่เอมีนในการเชื่อมโยงพันธะกับหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในรูป 2.12 ดังนั้นโคโตซานที่นำมาผสมในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักสามารถใช้หมู่เอมีนช่วยในการเพิ่มปริมาณการเชื่อมโยงพันธะกับหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ซึ่งสามารถลดปริมาณสารเคมีที่ตกค้างของ GA ภายหลังจากการเชื่อมโยงได้

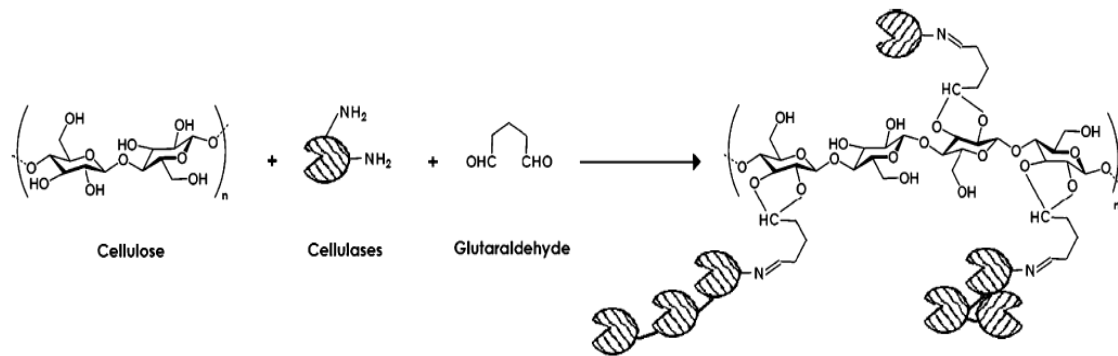


รูปที่ 2.12 โครงสร้างของคอลลาเจนกับไคโตซานเชื่อมโยงพันธะกับ GA

(ที่มา : Ma, L., 2003; 24: 4833-4841)

หมายเหตุ R แสดงหมู่ของคาร์บอนที่อยู่ในโมเลกุล ซึ่งไม่ได้เป็นหมู่ฟังก์ชันที่ใช้เชื่อมโยงพันธะ

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นระหว่างคอลลาเจนกับไคโตซาน แล้วมีการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA นั้น จำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะของโครงสร้างขนาดเล็ก (microstructure) เพื่อจะให้เห็นถึงลักษณะการกระจายตัวของคอลลาเจนและไคโตซานที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่อง confocal laser scanning microscopy (CLSM) รวมทั้งความสามารถในการบวมน้ำ, ความสามารถในการย่อยสลายทั้งภายในร่างกาย (*in vivo*) และภายในห้องทดลอง (*in vitro*) ของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนกับไคโตซาน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GA ส่งผลให้ความสามารถในการบวมน้ำลดลง เนื่องจากการเชื่อมโยงพันธะเป็นการทำให้สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น จึงทำให้ความชอบน้ำ (hydrophilic) ของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันจะมีระดับของการย่อยสลายทางชีวภาพที่ไม่เท่ากัน ซึ่งพบว่าเมื่อทำการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA สามารถลดระดับของการย่อยสลายทางชีวภาพให้ช้าลงได้ โดยพบว่าถ้าใช้คอลลาเจนเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเพิ่มไคโตซานเข้าไปสามารถช่วยลดระดับการย่อยสลายลงได้เล็กน้อย แต่ถ้ามีการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA เพิ่มเข้ามา จะทำให้ระดับของการย่อยสลายทางชีวภาพลดลงอย่างมาก [Ma, L., และคณะ, 2003] นอกจากนี้การเชื่อมโยงพันธะระหว่างเจลาตินกับ GA มีลักษณะเช่นเดียวกันกับการเชื่อมโยงพันธะระหว่างของคอลลาเจน GA โดยเจลาตินใช้หมู่เอมีนในการเชื่อมโยงพันธะ และ GA ใช้หมู่แอลดีไฮด์ในการเชื่อมโยงพันธะ ในระบบส่งผ่านยาในร่างกาย (drug delivery) ได้มีการนำพอลิเมอร์ธรรมชาติมาใช้มากกว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ เนื่องจากไม่มีสารพิษ, ราคาถูก, หาได้ง่าย, และสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติอีกตัวหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการส่งผ่านยา (controlled release) โดยในรูปที่ 2.13 เป็นการนำเซลลูโลสมาตรึงเอนไซม์เซลลูเลสและเชื่อมโยงพันธะด้วย GA เพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรงในการตรึงเอนไซม์เซลลูเลสกับเซลลูโลส

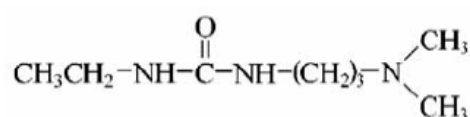


รูปที่ 2.13 โครงสร้างของเซลลูโลสเมื่อเชื่อมโยงพันธะกับ GA
(ที่มา : Bogomilova, S., 2007; 40: 1646-1650)

จากรูปที่ 2.3 หมู่แอลดีไฮด์ของ GA แทรกเข้าไปเชื่อมโยงพันธะระหว่างเซลลูโลสกับเอนไซม์เซลลูเลส โดย GA ใช้หมู่แอลดีไฮด์เชื่อมโยงพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของเซลลูโลส และหมู่เอมีนของเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้าง ในการนำมาใช้เป็นตัวส่งผ่านยาในร่างกายได้เหมาะสมมากขึ้น [Bogomilova, S., และคณะ, 2007]

ข) การเชื่อมโยงพันธะด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

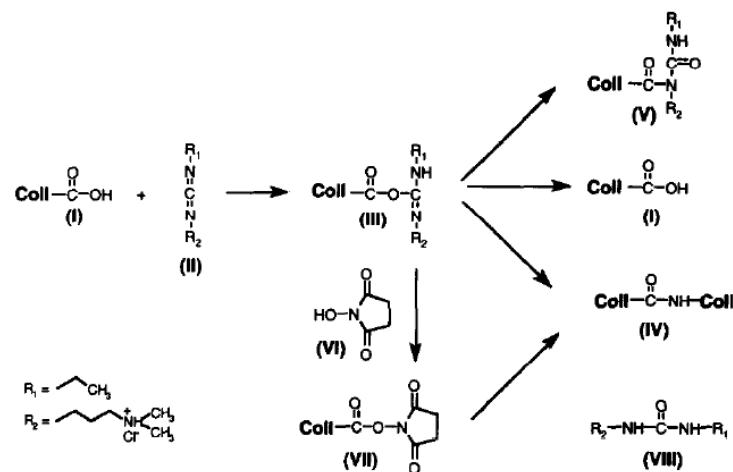
EDC เป็นสารที่นิยมใช้กันมากในการเชื่อมโยงพันธะ เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีพิษ และมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์และเลือด (biocompatible) โดยทำการเชื่อมโยงพันธะร่วมกับ N-hydroxysuccinimide (NHS) และบัฟเฟอร์ 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES)



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)
(ที่มา : Christiaens, P., 2006)

การเชื่อมโยงพันธะเกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน aspartic หรือ glutamic ซึ่งแสดงประจุรวมเป็นลบในคอลลาเจนกับ EDC ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือหมู่ O-acrylisourea (III) จากนั้นจะเกิดการเชื่อมโยงพันธะ ต่อโดยหมู่ O-acrylisourea และไปทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน lysine หรือ hydroxylysine ซึ่งแสดงประจุรวมเป็นบวก ได้เป็นกรดอะมิโนของคอลลาเจน ที่ต่อกันกับ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)urea (VIII) และการเติม N-hydroxyl succinimide (NHS) (VI) ในระหว่างการเชื่อมโยงพันธะจะช่วยเพิ่มจำนวนการเชื่อมโยงพันธะ, ลดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และเพิ่มอัตราการ

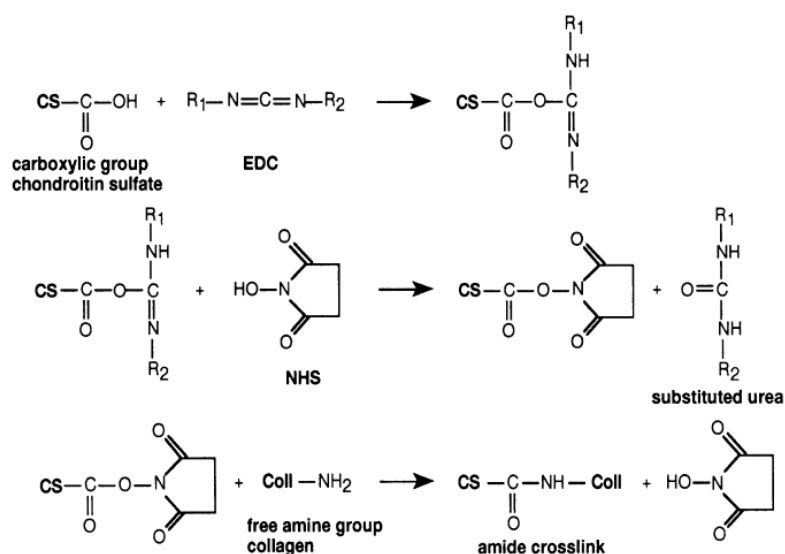
ปฏิกิริยาในการเชื่อมโยงพันธะ โดย NHS จะหยุดปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยา อันดับแรกคือ การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของหมู่ O-acylisourea กลายเป็น 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)urea (VIII) และกลับไปเริ่มต้นใหม่ที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน และปฏิกิริยาอันดับสองหมู่ O-acylisourea ที่ไม่เสถียรจะจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของหมู่ N-acylurea (V) การทำงานของ NHS จะทำการเปลี่ยนหมู่ O-acylisourea ให้เป็นหมู่ NHS-activated carboxylic (VII) ซึ่งจะมีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ pH ต่ำๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหมู่ O-acylisourea [Damink, LO. และคณะ, 1996] ดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนกับ EDC และ NHS
(ที่มา : Olde Damink, 1996; 17: 765-773)

การซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เช่น กระดูกอ่อน (cartilage) , กระดูก (bone) หรือกล้ามเนื้อ (muscle) นั้น ได้มีการนำสารที่มีความสามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์และเลือด และสารที่มีความสามารถในการย่อยสลายมาใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย ซึ่งคอลลาเจนเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ เนื่องจากมีผลในการยึดเกาะของเซลล์ (cell-adhesion), การแพร่พันธุ์ของเซลล์ (proliferation) และการเกิดเป็นเนื้อเยื่อใหม่ แต่ข้อเสียของการนำคอลลาเจนมาใช้คือ มีสมบัติเชิงกล (ความแข็งแรง) ที่ต่ำและมีการย่อยสลายที่เร็ว ดังนั้นจึงได้ใช้กระบวนการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีเพื่อให้ได้คุณสมบัติเชิงกลที่ต้องการ โดยได้มีการศึกษาและคัดเลือกสารเคมี ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้คือ GA โดยจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (amino groups) ของคอลลาเจน แต่พบว่า GA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งในร่างกาย (*in vivo*) และในห้องทดลอง (*in vitro*) ซึ่งเกิดจากสารพิษที่ตกค้าง GA ภายหลังจากการเชื่อมโยงพันธะ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาสารที่ใช้เป็นตัวเชื่อมโยงพันธะ โดยได้มีการนำ EDC และ NHS มาทำการเชื่อมโยงพันธะกับคอลลาเจน ซึ่งมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์และเลือด รวมทั้งส่งผลให้เซลล์สามารถแพร่พันธุ์ได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยในการยับยั้งอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยคอลลาเจนที่นำมาเชื่อมโยงพันธะสามารถสกัดมาได้จากวัว , หมู และแกะ เป็นต้น แต่ถ้าใช้คอลลาเจนที่สกัดมาจากวัวจะ

ค่อนข้างมีความเสี่ยงจากโรควัวบ้า (mad cow disease) ซึ่งจะต้องผ่านการตรวจสอบก่อนที่จะนำมาทำเป็นสารเชื่อมโยงพันธะ นอกจากนี้ก็ยังสามารถเลือกใช้คอลลาเจนที่สกัดได้จากม้า ซึ่งมีความเสี่ยงจากการติดเชื้อหรือโรคติดต่อน้อยกว่าวัว ในการวัดระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถวัดได้โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ลงไปในสาร 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid (TNBS) แล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการละลาย จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาระดับการเชื่อมโยงพันธะ โดยคิดจากค่าการดูดกลืนแสงของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมพันธะกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมพันธะ [Nagai, N. และคณะ, 2004] ในเวลาต่อมาได้มีการนำโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนมาผสมกับไกลโคซามิโนไกลแคน (GAG) เพิ่มเติมลงไปเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดย GAG ที่นำมาใช้จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆดังนี้ เช่น ชนิด, ตำแหน่งของ GAG ในโครงสร้าง และความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่นำ GAG มาผสมเพิ่มลงไป เมื่อทำการศึกษาพบว่า GAG ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลิกสร้างพันธะโควาเลนต์กับคอลลาเจนซึ่งมีหมู่เอมีนโดยใช้ EDC และ NHS เป็นตัวเชื่อมโยงพันธะโดย GAG ที่เลือกใช้จะเป็น chondroitin sulfate ซึ่งเป็น GAG ที่สามารถหาได้ง่ายและพบมากที่สุดดังแสดงในรูป 2.16



รูปที่ 2.16 การเชื่อมโยงพันธะโควาเลนต์ระหว่าง chondroitin sulfate กับคอลลาเจน โดยใช้ EDC และ NHS

(ที่มา : Pieper, J.S., 1999; 20: 1999: 847-858)

การเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนโดยใช้ GA โมเลกุลของ GA จะเข้าไปแทรกวมอยู่กับคอลลาเจน โดยการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA นี้มักมีสารพิษตกค้างหลังจากการเชื่อมโยงพันธะ เนื่องจากกำจัด GA ออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ได้ไม่หมด ซึ่งจะส่งผลร้ายต่อเซลล์ (cytotoxicity) จึงได้มีการ

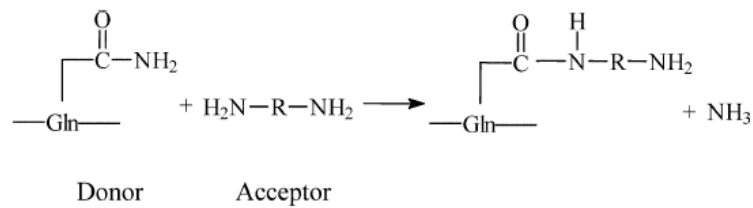
พัฒนาการเชื่อมโยงพันธะเพื่อป้องกันสารพิษที่หลงเหลือหลังกระบวนการเชื่อมโยงพันธะโดยได้มีการเปลี่ยนสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ (crosslinking agent) เป็น EDC และ NHS ซึ่งเป็นสารที่สามารถกำจัดสารพิษที่หลงเหลือหลังกระบวนการเชื่อมโยงพันธะได้ โดยการล้างด้วยน้ำกลั่นซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นอนุพันธ์ของยูเรีย [Wissink, M.J.B. และคณะ, 2001] นอกจากนี้ก็ยังสามารถใช้ GAG ตัวอื่นๆได้อีกไม่ว่าจะเป็น dermatan sulfate , heparin sulfate หรือ heparin มาผสมรวมกับคอลลาเจน [Pieper, J.S. และคณะ, 1999]

ความแตกต่างระหว่างการใช้สารเคมี EDC และ GA คือ โมเลกุลของ EDC จะไม่มีสารพิษตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการเชื่อมโยงพันธะ คือ อนุพันธ์ของยูเรีย หรือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea ที่สามารถกำจัดออกได้โดยการละลายน้ำทำให้ไม่มีสารตกค้างในโมเลกุลของสารพวกโปรตีน ด้วยเหตุนี้โครงสร้างเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วย EDC จึงมีความเป็นพิษที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม EDC กำจัดอยู่ในระหว่างกระบวนการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา [Liu, H. และคณะ, 2004] ส่วนการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ GA จะมี GA ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์หลังการเชื่อมโยงพันธะ ซึ่งมักจะมีกระบวนการกำจัดหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ที่ตกค้างอยู่ได้โดยการล้างโครงสร้างเซลล์ด้วยไกลซีน เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ที่เกินพอและล้างต่อด้วยน้ำหลายรอบ [Ozeki, M., 2004] ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA มีความเป็นเนื้อเดียวกันสูงเนื่องจาก GA มีการกระจายตัวของพันธะทางเคมีอย่างเป็นระเบียบในโมเลกุล ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นมีสมบัติทางกลที่สูงขึ้น [Goissis, G. และคณะ, 1998] นอกจากนี้ GA ยังได้รับการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาจากประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วในปัจจุบัน [U.S. Food and Drug Administration. March 3, 2006]

2.6.3 การเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Enzyme)

การเชื่อมโยงพันธะด้วย transglutaminase

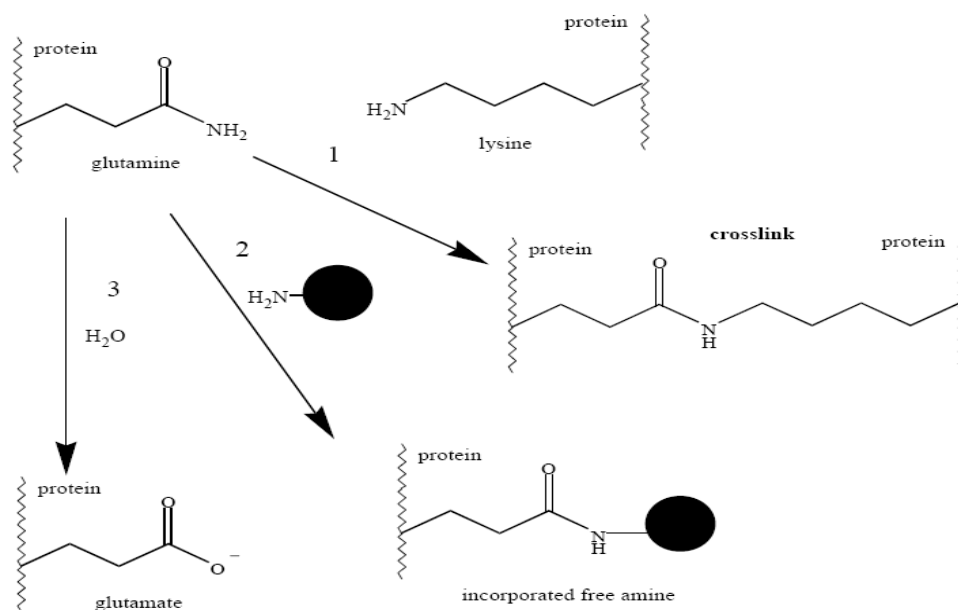
Transglutaminase เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของโปรตีนโดยที่สามารถนำมาเป็นตัวเชื่อมโยงพันธะของโครงสร้างเซลล์ที่สร้างมาจากคอลลาเจน ซึ่งจะทำการเชื่อมโยงพันธะให้อยู่ในรูปของ $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ โดยเกิดจากโซ่ด้านข้าง (side chains) ของไลซีน ในคอลลาเจนและกลูตามีนใน transglutaminase โดยที่ transglutaminase จะสร้างพันธะโควาเลนต์กับ primary amino ของคอลลาเจนซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาระหว่างหมู่ $\gamma\text{-carboxamine}$ ของกลูตามีน (ตัวให้) กับหมู่ amino ของ primary amine ในคอลลาเจน(ตัวรับ) ดังแสดงในรูป 2.17



รูปที่ 2.17 ปฏิกิริยาระหว่าง γ -carboxamine group ของกลูตามีน (donor) กับหมู่อะมิโนของ primary amine ในคอลลาเจน (acceptor)

(ที่มา : Punakivi, K, 2006; 68: 1040-1045)

เพื่อที่จะปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพ, ทางเคมี, และทางชีวภาพของคอลลาเจน ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น ด้วยเหตุผลนี้จึงได้มีการนำ transglutaminase มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการต่างๆ มากมาย เช่น การปรับปรุงคุณสมบัติของคอลลาเจน เพื่อที่จะนำไปทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำ transglutaminase มาประยุกต์ใช้กับโครงสร้างเจลาตินเพื่อเพิ่มความแข็งแรง, ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ (cell adhesion), และส่งผลให้เซลล์สามารถแพร่พันธุ์ได้ดีขึ้น (cell proliferation) [Chau, D.Y.S. และคณะ 2005] นอกจากนี้ transglutaminase นิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น พกอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์ของเจลาติน ซึ่งจะเข้าไปปรับปรุงความสามารถของการละลาย, ความเสถียรในเรื่องความร้อน, และปรับปรุงโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ เพื่อปรับปรุงให้มีรสชาติที่ดีขึ้น และมีคุณค่าทางอาหารมากขึ้น เป็นต้น [Punakivi, K. และคณะ, 2005]



รูปที่ 2.18 ปฏิกิริยาของ transglutaminase

(ที่มา : Gerrard, J.A, 2005; 16: 510-512)

จากรูปที่ 2.18 จะแสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของ transglutaminase ดังนี้

1. Protein crosslinking เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่กลูตามีนใน transglutaminase กับหมู่ไลซีนในคอลลาเจน
2. Incorporation of a free amino เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่กลูตามีนใน transglutaminase กับเอมีนอิสระของคอลลาเจน
3. Deamidation of a glutamine residue to form glutamate เป็นปฏิกิริยากำจัดเอมีนออกจากหมู่กลูตามีน และเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ glutamate [Gerrard, J.A. และคณะ, 2005]

2.7 การทดสอบผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์

ในการผลิตจำพวกผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์หรือเครื่องมือแพทย์ ต้องมีการตรวจสอบมาตรฐานผลิตภัณฑ์เหล่านั้น โดยมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบเรื่องนี้ คือ ISO/EN30993-1 ซึ่งเป็นการทดสอบทางชีววิทยา เพื่อให้เป็นมาตรฐานของเครื่องมือที่ใช้ในงานทางการแพทย์ โดยเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ ดังนี้

- surface device
- external communicating device
- internal device

เครื่องมือในแต่ละกลุ่มถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ เพื่อใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีววิทยา (biocompatibility test) สำหรับเครื่องมือที่ใช้เป็น surface device ใช้กับส่วนที่เป็น ผิวหนัง (skin), เยื่อเมือก (mucous membrane), และผิวหนังแตก (breached surface) โดยทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีววิทยา ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีววิทยาที่จัดอยู่ในกลุ่มของ surface device

surface device	ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ (วัน)	การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีววิทยา (Biocompatibility test)
ผิวหนัง	<1	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity
	1-30	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity
	>30	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity
เยื่อเมือก	<1	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity
	1-30	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity
	>30	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity, subchronic toxicity, genotoxicity
ผิวรอยแตก	<1	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity
	1-30	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity
	>30	cytotoxicity, sensitization, Intracutaneous reactivity, subchronic toxicity, genotoxicity

(ที่มา : Antonietta M. Gallti, Biocompatibility and Biological tests, 27, 797)

2.7.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test)

การทดสอบความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์ (cellular toxicity testing) อยู่ใน ISO 10993-5 ซึ่งการทดลองจะทำการทดลองนอกร่างกาย (*in vitro*) โดยจะทำการเลี้ยงเซลล์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้เซลล์ของหนู (L929 cell) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงซึ่งบรรจุอยู่ในขวดพลาสติก (flask) แล้วทำการประเมินการยึดเกาะของเซลล์ เพื่อศึกษาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

วิธีการทดสอบ

นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในพลาสติก และทำการทดสอบด้วยวิธี elution test เป็นวิธีการสกัดจากเนื้อวัสดุที่นำมาทดสอบและเป็นตัวควบคุม (control) โดยทำการสกัดออกมาจากอาหารเลี้ยงภายใต้สภาวะมาตรฐาน ยกตัวอย่างเช่นน้ำ 0.2 กรัม/มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยง ที่เวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาทดสอบ โดยในการทดสอบอาหารเลี้ยงจะต้องเป็นอาหารเลี้ยงที่สดและใหม่ (fresh) ทั้งในวัสดุที่นำมาทดสอบและตัวควบคุม จากนั้นจึงนำไปบ่ม (incubate) ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์โดยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายในช่วงเวลา 3 วัน ซึ่งจะศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์จากภาพถ่าย เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์

เกณฑ์มาตรฐาน

ตารางที่ 2.5 ระดับการรอดชีวิตของเซลล์

ระดับ	กระบวนการ	สภาวะของการเลี้ยง
0	ไม่มี	ไม่มีเซลล์ตาย
1	เล็กน้อย	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมด
2	ไม่รุนแรง	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด
3	ปานกลาง	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 70 ของเซลล์ทั้งหมด
4	รุนแรง	เซลล์ตายเกือบทั้งหมด

2.7.2 การทดสอบสภาวะที่ไวต่อสิ่งกระตุ้น (sensitization test)

การทดสอบสภาวะที่ไวต่อสิ่งกระตุ้นอยู่ใน ISO 10993-10 ซึ่งปฏิกิริยา sensitization เกิดขึ้นจากการสัมผัสกับสารเคมี ซึ่งมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นมากกับเซลล์ผิวหนัง (dermal cell) เช่น การสวมใส่ถุงมือกลายเป็นเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน ปรากฏว่าจะส่งผลกระทบต่อมือหรือข้อมือ ซึ่งปฏิกิริยา sensitization อาจเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีของถุงมือ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอาการแพ้หรือระคายเคือง

วิธีการทดสอบ

ในการทดสอบจะทำการทดสอบกับเซลล์สัตว์ตาม Buehler test โดยเฉพาะเซลล์ที่ได้จากหนูตะเภา (guinea pig) เพื่อทดสอบสภาวะที่ไวต่อสิ่งกระตุ้นในชั้นผิวหนังแท้ของหนู ซึ่งจะใช้หนูที่มีอายุอยู่ระหว่าง 6-8 สัปดาห์ โดยเริ่มต้นจากการนำวัสดุที่ใช้ในการทดสอบฝังไว้บริเวณแผ่นหลังของหนู แล้วตัดผิวหนังบริเวณที่ฝังวัสดุทดสอบภายหลังเย็บแผลอย่างน้อย 6 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงแผ่นหลังของหนูบริเวณที่มีการฝังวัสดุทดสอบ

2.7.3 การทดสอบการโต้ตอบใต้ผิวหนัง (intracutaneous reactivity)

สารเคมีที่ปล่อยออกมาจากเครื่องมือแพทย์ เมื่อสัมผัสกับร่างกายอาจทำให้ผิวหนังหรือตา เกิดอาการระคายเคืองได้ ซึ่งอาจเกิดขึ้นทันที หรือเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เช่น การตกค้างของ ethylene oxide ในเครื่อง gas-sterilized ซึ่งสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองได้ โดยสาเหตุส่วนใหญ่จะมาจากปริมาณสารตกค้าง หรือมีสิ่งปนเปื้อนเชื้อปนจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ไม่สามารถยอมรับให้เป็นเครื่องมือแพทย์เพื่อนำมาใช้กับผู้ป่วยได้ ในการทดสอบการระคายเคืองนั้นจะทำการทดสอบในร่างกาย (in vivo) ซึ่งสามารถทำการทดสอบได้ 3 บริเวณ คือ intracutaneous, primary skin, และ ocular เช่น การทดสอบใต้ผิวหนังของกระต่าย (Albino rabbits) ซึ่งจะต้องทำการควบคุมสภาวะต่างๆให้เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ, เวลา,

และปริมาณพื้นที่สัมผัสของเซลล์กับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ จากนั้นจึงฝังผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ลงไปในบริเวณแผ่นหลังของกระต่าย และทำการแปรผันกับเวลา เพื่อศึกษาลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ รูปร่างและขนาดของเซลล์ที่เปลี่ยนไป [Richard, F. และคณะ, 1998]

วิธีการทดสอบ

ทำการทดสอบโดยใช้วิธี allergy test เริ่มต้นจากเตรียมสารที่สกัดได้จากวัสดุที่ทำการทดสอบไว้ที่สภาวะอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทดสอบ รวมทั้งอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวและปริมาตรของสารที่สกัด จากนั้นใช้เข็ม small-bore needles ฉีดลงไปยังแผ่นหลังของกระต่าย โดยฉีดในปริมาณที่เท่ากันทั้งในตัววัสดุทดสอบ และในตัวควบคุม ภายหลัง 24, 48, และ 72 ชั่วโมงหลังการฉีด บริเวณที่ใช้ฉีดวัสดุที่ทดสอบกับบริเวณที่ควบคุมถูกนำมาทดสอบการคั่งของโลหิต (erythema) เพื่อดูความเป็นสีแดง หรืออาการบวม (edema) เนื่องจากมีของเหลวสะสมมากเกินไปในบริเวณเนื้อเยื่อส่วนนั้น

2.7.4 การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง (subchronic toxicity)

การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10993-1 เริ่มต้นจากการคัดเลือกช่วงเวลา ชนิดและปริมาณของสัตว์ทดลองที่ใช้ อายุ เพศ และปริมาณยาที่ใช้ต่อครั้ง ซึ่งในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง จะใช้สัตว์ทดลองที่มีช่วงชีวิตต่ำกว่า 10% ของช่วงชีวิตทั้งหมด โดยทั่วไปจะเลือกใช้สัตว์ที่มีฟันแทะ (rodent) และสัตว์ที่ไม่มีฟันแทะ (nonrodent) มาเป็นสัตว์ทดลอง ซึ่งสัตว์ที่มีฟันแทะจะเป็นพวกหนู และสัตว์ที่ไม่มีฟันแทะจะเป็นพวกสุนัข โดยสัตว์ทั้ง 2 ชนิดนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นสัตว์ที่หาได้ง่าย และในบางกรณีสามารถที่จะฝังเครื่องมือทางการแพทย์ลงไปในตัวสัตว์ได้ง่าย ยกตัวอย่างเช่น สุนัขนิยมนำมาใช้มากกว่าหนูสำหรับการทดสอบ catheter device (ท่อกลวงสำหรับระบายของเหลวจากโพรงร่างกาย)

วิธีการทดสอบ

การทดสอบการเป็นพิษเรื้อรังใช้วิธี clinical test ดำเนินการโดยศึกษาจาก น้ำหนักของร่างกาย, การกินอาหาร, เลือดและปัสสาวะ, และการมองเห็น

การทดสอบแบบ clinical มี 2 องค์ประกอบหลักๆ คือ โลหิตวิทยา (hematology) และสารเคมี (clinical chemistry) การทดสอบแบบโลหิตวิทยาแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การตรวจปัสสาวะและการวิเคราะห์เลือดตัวอย่าง ซึ่งการวิเคราะห์เลือดจะแยกเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกร็ดเลือด ออกมาโดยใช้เครื่องปั่นแยกเม็ดเลือดออกจากพลาสมา (hematocrit) โดยเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวจะใช้วิธีการนับจำนวนเม็ดเลือด ส่วนเกร็ดเลือดจะดูจากเวลาที่ก้อนเลือดแข็งตัว (clotting time) ส่วนการทดสอบสารเคมี จะใช้ซีรัม (serum) ในการแยกเม็ดเลือดจากพลาสมา รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติของ

สารประกอบที่เป็นตัวนำไฟฟ้าและแตกตัวเป็นไอออน (electrolyte balance) กระบวนการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism)

2.7.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อยีน (genotoxicity)

ถึงแม้ว่าในร่างกายของมนุษย์จะมีความซับซ้อนมาก แต่ก็สามารถอธิบายความเป็นพิษของยีนจากหน่วยที่เล็กที่สุด คือ เซลล์ โดยการทดสอบความเป็นพิษของยีนแบ่งออกเป็น 3 แบบใหญ่ๆ คือ การเปลี่ยนแปลงของยีน (gene mutation), ความผิดปกติของโครโมโซม (chromosomal aberration), และผลของ DNA (DNA effect)

วิธีการทดสอบ

1) การเปลี่ยนแปลงของยีน

เป็นการเปลี่ยนแปลงในส่วนที่เล็กของโมเลกุล DNA โดยทั่วไปจะทดสอบการเปลี่ยนแปลงของยีนด้วยวิธี Ames bacteria reverse mutation assay โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ขึ้นกับ histidine (กรดอะมิโนชนิดหนึ่ง) ทดสอบโดยการนำไมโครโซม (microsome) ของตับหนูมาทดสอบ เริ่มต้นจากการสกัดของเหลวออกมาจากไมโครโซม จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ซึ่งปราศจาก histidine แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ ถ้าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแสดงว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้จำเป็นต้องอาศัย histidine ในการเจริญเติบโต แต่ถ้าไม่มีการเติบโตของแบคทีเรียแสดงว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน

2) ความผิดปกติของโครโมโซม

การทดสอบนี้เป็นการตรวจสอบความเสียหายของโครโมโซมภายหลังการแบ่งเซลล์ เนื่องจากโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงในขั้นตอนการแบ่งเซลล์ที่โครโมโซมปรากฏตัวในแนวกลางตามขวางบนกลุ่มรูปกระสวย หรือเรียกกระยะนี้ว่าเมตาเฟส (metaphase) ซึ่งทำการทดสอบในเซลล์รังไข่ของ Chinese hamster เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมเมื่อเกิดกิจกรรมการสันดาป (metabolic activation) เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป

3) ผลกระทบของ DNA

การเปลี่ยนแปลงของยีนมีผลกับความเสียหายของ DNA ได้จากหลายๆกระบวนการ ในการทดสอบนิวเคลียสขนาดเล็ก (micronucleus) ในไซโทพลาซึมของหนู ระหว่างขั้นตอนการแบ่งเซลล์โครโมโซมถูกทำให้เพิ่มขึ้นจากการแบ่งตัวของนิวเคลียส แต่ถ้าโครโมโซมที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้เกิดความเสียหาย แล้วเข้าไปรวมกันเกิดเป็นนิวเคลียสอีกตัวหนึ่ง (secondary nuclei) แทนนิวเคลียสตัวหลัก

(main nucleus) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่ามาก ดังนั้นจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครโมโซม ซึ่งมีผลกระทบกับ DNA เมื่อสังเกตจากภาพถ่ายจะเห็นนิวเคลียสขนาดเล็กปนอยู่กับนิวเคลียสขนาดใหญ่ภายในโครโมโซม (Medical Device & Diagnostic Industry, 1998)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยหลายชิ้นที่ปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยใช้วิธีการเชื่อมโยงพันธะ ได้แก่ การใช้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT) และ การใช้สารเคมี ได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ (GA), และ 1-ethyl-3-(3-dimethyl)carbodiimide (EDC) ร่วมกับการใช้ N-hydroxysuccinimide (NHS)

ในปี ค.ศ. 1987 Yannas และคณะ นำพอลิเมอร์ที่ผสมกันระหว่างคอลลาเจนกับ GAG โดยใช้เป็น chondroitin-6-sulfate แล้วขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการทำแห้งแข็งที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาเชื่อมโยงพันธะด้วยกลูตารัลดีไฮด์ด้วยวิธีการแช่ในสารละลาย GA ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ โดย GA ใช้หมู่แอลดีไฮด์มาเชื่อมโยงพันธะกับหมู่อะมิโนของคอลลาเจน และหมู่คาร์บอกซิลิกของ chondroitin-6-sulfate แล้วทำการกำจัด GA ที่ตกค้างหลังการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งแข็ง โดยที่อุณหภูมิที่ใช้ทำแห้งต่ำมากๆ โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกทำให้แข็งอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ผลึกที่ได้มีขนาดเล็ก และขนาดรูพรุนมีขนาดเล็กด้วย

ในปี ค.ศ.1992 Gorham และคณะ ได้นำคอลลาเจนมาเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการใช้ความร้อน หรือ DHT โดยทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะที่ 60, 80, 100, และ 120 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะความดันสุญญากาศ พบว่าคอลลาเจนที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนมีระดับการเชื่อมโยงพันธะ และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายสูงขึ้น แต่ความสามารถในการละลาย (solubility) มีค่าลดลง ซึ่งแปรผกผันกับระดับการเชื่อมโยงพันธะและระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น

ในปี ค.ศ.1997 Scolchford และคณะ ได้นำคอลลาเจนมาผสมกับ poly(vinyl alcohol) หรือ PVA แล้วทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธี DHT นอกจากนี้ได้นำสารเคมี กลูตารัลดีไฮด์ (GA) มาใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ แล้วทำการศึกษาการยึดเกาะและการรอดชีวิตของเซลล์ เปรียบเทียบกันระหว่างการเชื่อมโยงพันธะแบบ DHT กับการใช้สารเคมี GA โดยการใช้อัตราส่วนระหว่างคอลลาเจนกับ PVA ที่ต่างกัน ได้แก่ 0/100, 30/70, 50/50, 70/30, และ 100/0 พบว่าที่อัตราส่วนคอลลาเจนต่อ PVA 0/100, 30/70 เท่านั้น ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี GA แล้วมีการรอดชีวิตของเซลล์ที่สูงกว่า แต่เมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจนขึ้นไปที่อัตราส่วน 50/50, 70/30, และ 100/0 พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยวิธี DHT มีการรอดชีวิตที่สูงกว่าการใช้สารเคมี GA

ในปี ค.ศ.1999 Kang และคณะ ได้นำไฮโดรเจลเจลาตินมาเชื่อมโยงพันธะในสารละลาย GA โดยศึกษาความแตกต่างกันของโครงสร้างที่เป็นรูพรุน (porous structure) ซึ่งทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ทำแข็ง (freezing temperature) ก่อนการทำแห้ง (lyophilized) ทั้งนี้ได้นำการทำแข็งด้วยไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียสมาเปรียบเทียบกับร่วมด้วย เมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพพบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการทำแข็งที่ -20, -80, และ -196 องศาเซลเซียส มีขนาดรูพรุนลดลง (250, 85, 45 ไมโครเมตรตามลำดับ) ซึ่งแปรผกผันกับความหนาแน่นที่มีค่าสูงขึ้น (9, 11.03, 29.13 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับ)

ในปี ค.ศ.1999 Pieper และคณะ ได้นำ EDC และ NHS มาเชื่อมโยงพันธะกับคอลลาเจนที่ผสมกับไกลโคซามิโนไกลแคน (GAG) โดย GAG ที่ใช้เป็น chondroitin sulfate (CS) ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ โดยใช้หลักของการดูดกลืนแสง ภายหลังทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยความเข้มข้นของ EDC ที่ใช้เชื่อมโยงพันธะได้แก่ 0, 14, และ 33 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ EDC สูงขึ้น ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสมีค่าลดลง

ในปี ค.ศ. 2001 Park และคณะ ได้นำ EDC มาเชื่อมโยงพันธะกับคอลลาเจนซึ่งผสมกับ GAGs อีกตัวหนึ่ง คือ hyaluronic acid โดยทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ทำแข็งที่ -20, -70, และ -196 องศาเซลเซียส รวมทั้งแปรผันความเข้มข้นของ EDC ในช่วง 1-100 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำแข็งขึ้น ขนาดของรูพรุนมีค่าสูงขึ้น ทั้งแบบที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ (60-65 ไมโครเมตร) และแบบที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ (84-190 ไมโครเมตร) จากนั้นศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าเมื่อเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ระยะเวลาในการย่อยสลายจะสูงขึ้นด้วย

ในปี ค.ศ. 2003 Mao และคณะนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกันระหว่างเจลาติน ไคโตซาน และ hyaluronic acid ที่ผลิตจากวิธีการทำแห้งแข็ง มาเชื่อมโยงพันธะโดยแช่ในสารละลาย EDC และ NHS จากนั้นจึงศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ fibroblast เทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกันระหว่างเจลาติน ไคโตซานที่ไม่มี hyaluronic acid พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี hyaluronic acid มีการยึดเกาะของเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน

ในปี ค.ศ. 2005 Rho และคณะ ได้นำคอลลาเจนมาสร้างเส้นใยระดับนาโนด้วยวิธีการปั่นขึ้นรูปทางไฟฟ้า (electrospinning) ใน 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HEIP) โดยขึ้นรูปเส้นใยระดับนาโนจาก 8% คอลลาเจน ซึ่งเส้นผ่าศูนย์กลางมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 100-1200 นาโนเมตร เมื่อนำเส้นใยคอลลาเจนมาเชื่อมโยงพันธะด้วย 25% ไอโซของกลูตารัลดีไฮด์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างด้วยไกลซีน ค่าความเป็นรูพรุน (porosity) ของคอลลาเจนลดลงจาก 89% เหลือ 71% แต่ความแข็งแรงทางกล (tensile strength) มีค่าสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยระดับนาโนที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ

ในปี ค.ศ. 2006 Zhang ได้นำเส้นใยเจลาตินระดับนาโนความหนาประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการปั่นขึ้นรูปด้วยไฟฟ้า จากนั้นจึงนำมาเชื่อมโยงพันธะด้วยไอของ GA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อศึกษาถึงความแข็งแรงด้วยการดึง พบว่าเส้นใยเจลาตินระดับนาโนที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยไอของ GA พบว่ามีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นจาก 1.28 เป็น 12.62 เมกกะปาสคาล และมีค่ายังโมดูลัสเพิ่มขึ้นจาก 46.5 เป็น 424.7 เมกกะปาสคาล

2.9 เอกสารสิทธิ (patents)

1. US Patent no. 5126328

ในปี ค.ศ 1992 Bower และคณะ ทำการเชื่อมโยงพันธะพวกโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาล, เกลือ, และน้ำ ด้วยวิธีการให้ความร้อน โดยให้มีระดับความชื้น (moisture content) ขององค์ประกอบอย่างน้อย 3% โดยน้ำหนัก และใช้ความร้อนในการเชื่อมโยงพันธะที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

การอ้างสิทธิ์

- โปรตีนที่นำมาใช้ในการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการให้ความร้อนเป็นเจลาติน โดยเลือกนำมาทดสอบทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ซึ่งนำมาผสมกับน้ำตาลที่จัดอยู่ในกลุ่มของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว พวกกลูโคส และฟรุกโตส เกลือที่ใช้อยู่ในกลุ่มที่สามารถละลายในน้ำได้ ได้แก่ พวก sodium carbonate, potassium carbonate, calcium sulfate, and calcium phosphate ซึ่งเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต
- เชื่อมโยงพันธะในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- อัตราส่วนที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนใช้เจลาติน bloom 50-300 น้ำหนัก 10-30% โดยน้ำหนัก น้ำตาล 5-20% โดยน้ำหนัก เกลือ 1-10% โดยน้ำหนัก และน้ำ 3-60% โดยน้ำหนัก

2. US Patent no. 6509039

ในปี ค.ศ. 2003 Nies และ Berthold ทำการเชื่อมโยงพันธะระหว่างไคโตซานหรือเจลาตินกับ pyromellitic dianhydride หรือ polymaleic anhydride ในการผลิตเป็นไฮโดรเจล (hydrogel) เพื่อนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านเภสัชกรรมและการแพทย์

การอ้างสิทธิ์

- ใช้พอลิเมอร์ 2 ตัวคือ ไคโตซานและเจลาตินมาเชื่อมโยงพันธะกับ polymaleic anhydride และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 ระบบ
- ไคโตซานที่ใช้มีระดับ deacetylation 87% และมีน้ำหนักโมเลกุล 300000

- ในการเชื่อมโยงพันธะด้วยเจลาตินมีข้อเสียเปรียบกว่าการใช้โคโตซาน เนื่องจากเจลาตินเป็นสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) จึงไม่ค่อยจะเหมาะสมที่นำมาใช้ทำเป็นไฮโดรเจล
- ทำการเชื่อมโยงพันธะระหว่างโคโตซานหรือเจลาตินกับ polymaleic anhydride ในสารละลายกรดอะซีติก ที่ละลายอยู่กับอะซีโตน
- สาร polymaleic anhydride มีน้ำหนักโมเลกุล 1000 มีหมู่อะมิโนของโคโตซานหรือเจลาตินทำปฏิกิริยากับหมู่ anhydride ของ polymaleic anhydride เพื่อนำไปใช้ในการทำยาแคปซูล (capsule) และทำวัสดุที่ใช้เย็บแผล

3. US Patent no. 6831058

ในปี ค.ศ. 2004 Ikada และคณะ เชื่อมโยงพันธะเจลาตินเจล โดยบรรจุ basic fibroblast growth factor (bFGF) เจลาตินเจล ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ ถูกนำไปใช้ในงานส่งถ่ายยา (drug delivery) เพื่อควบคุมการปลดปล่อย bFGF เมื่อนำเข้าสู่ร่างกาย (*in vivo*) โดยทำการศึกษาจากความแตกต่างการดูดซับน้ำ (water content) และการย่อยสลายของเจลาตินเจล

การอ้างสิทธิ์

- เจลาตินเจลที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะโดยวิธีการทำแห้งแข็ง (lyophilized) สำหรับใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย bFGF จะต้องมีการดูดน้ำ 63.1-99% ซึ่งทำการรวม bFGF ลงไปในขั้นตอนหลังทำการเชื่อมโยงพันธะแล้วผ่านการทำแห้งแข็ง
- เจลาตินต้องมีค่า isoelectric point (IEP) 4.9 สารที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะเป็นสารเคมี คือ กลูตารัลดีไฮด์ หรือ carbodiimide

4. US Patent no. 20040147016

ในปี ค.ศ. 2004 Rowley และคณะ ทำการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ จากกระบวนการทำแห้งแข็งของไฮโดรเจล แล้วทำการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารเคมี EDC ร่วมกับสารเคมี NHS หรือสารเคมี sulfo NHS

การอ้างสิทธิ์

- ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีทำแห้งแข็งแบบไฮโดรเจล โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำแห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- พอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูป ได้แก่ hyaluronic และ alginate
- ความเข้มข้นที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC อยู่ในช่วง 25-200%

5. US Patent no. 20050112173

ในปี ค.ศ. 2005 Mao และ Jian นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้ากันได้กับเซลล์ (biocompatibility) เช่น เจลาติน ผสมรวมกับพอลิเมอร์ตัวอื่น ได้แก่ คอลลาเจน เพื่อนำไปสังเคราะห์เนื้อเยื่อใหม่ โดยมีการเติม TGF-beta เพิ่มเติมลงไป และจะนำไปฝังยังบริเวณที่ต้องการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ได้แก่ กระโหลกศีรษะ และเอ็น เป็นต้น

การอ้างสิทธิ์

- โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่ผสมกับคอลลาเจน เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์เนื้อเยื่อใหม่ บริเวณกระโหลกศีรษะ มีการเติม growth factor เพิ่มเติมลงไป โดยจะบรรจุ rhBMF-2 ของ TGF-beta และนำไปฝังในสัตว์ทดลองที่เนื้อเยื่อเส้นใย (fibrous tissue) สามารถเจริญเติบโตได้ ได้แก่ หนู rat, หนู mouse, และกระต่าย
- โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้มีลักษณะเหมือนขนมปังประกบ (sandwich) โดยเป็นเจลาติน 2 ชั้น ประกบกับคอลลาเจน 1 ชั้น หรือเป็นแบบคอลลาเจน 2 ชั้น ประกบกับเจลาตินชั้นเดียว

6. US Patent no. 20060115644

ในปี ค.ศ. 2006 Ma และคณะ ทำการเชื่อมโยงพันธะวัสดุที่มีรูพรุน 3 มิติ โดยใช้ poly(L-lactic acid) (PLLA), polyglycolic acid (PGA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีขนาดเล็กต้องมีรูพรุนระดับนาโนเมตร (10^{-9}) ผสมรวมอยู่กับรูพรุนระดับไมครอน (10^{-6}) ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงลักษณะของพื้นผิวโครงสร้างให้มีความเสถียรมากขึ้น โดยการกำหนดสภาวะที่ใช้ในการปรับปรุงขนาดรูพรุนไว้ล่วงหน้า และมีการนำวัสดุธรรมชาติมาทำการเคลือบผิว

การอ้างสิทธิ์

- ทำการเชื่อมโยงพันธะโดยทำการแปรผันความหนาแน่นในการเชื่อมโยงพันธะ เพื่อให้ได้คุณสมบัติทางกลที่เหมาะสมประกอบด้วย ลักษณะพื้นผิว และสมบัติของการบวมน้ำ โดยวัสดุที่มีรูพรุนจะเป็นพวกวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่
- วัสดุธรรมชาติที่นำมาใช้ในการเคลือบผิว vitronectin, fibronectin, laminin, peptides, polypeptides, hyaluronate, ไคโตซาน, และเจลาติน
- วัสดุที่นำมาใช้เป็นโครงสร้าง 3 มิติ คือ poly(L-lactic acid) (PLLA), polyglycolic acid (PGA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)

บทที่ 3

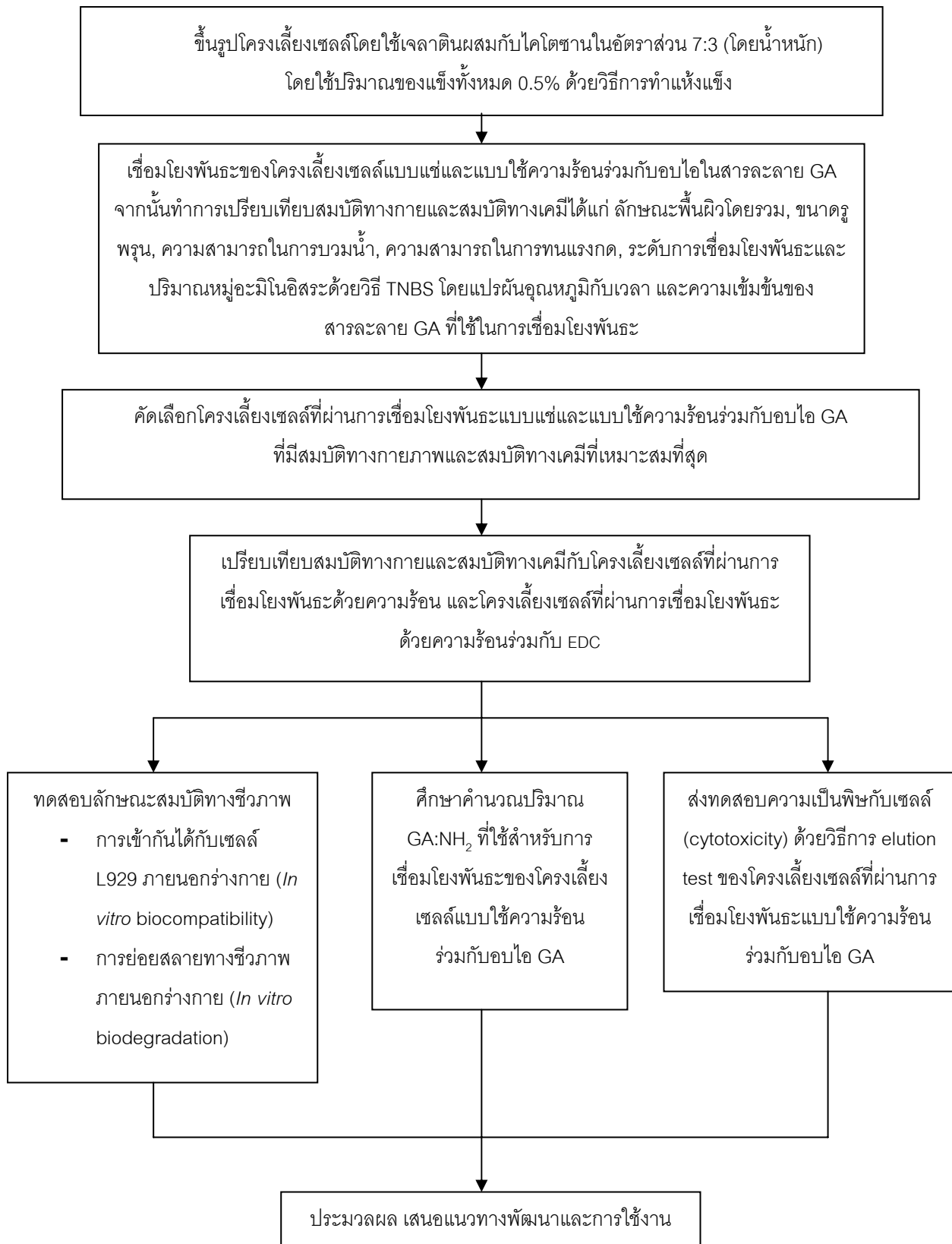
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ การขึ้นรูปและการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์ กับการทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ ดังแสดงอยู่ในแผนผังรูปที่ 3.1

วิธีการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมาจากเจลาตินกับโคโตซานแบ่งออกเป็น 3 วิธีการใหญ่ๆ ได้แก่

- ก) การเชื่อมโยงพันธะทางกายภาพ
 - การใช้วิธีทางความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT)
- ข) การเชื่อมโยงพันธะทางเคมี
 - การใช้สารเคมีกลูตาร์ดีไฮด์ (GA)
- ค) การเชื่อมโยงพันธะทางกายภาพร่วมกับทางเคมี
 - การใช้วิธีทางความร้อนร่วมกับสารเคมี GA
 - การใช้วิธีทางความร้อนร่วมกับสารเคมี 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)



รูปที่ 3.1 แผนผังการขึ้นรูปและการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์

3.2 วัสดุดิบและสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ก) วัสดุดิบ

- เจลาตินชนิด A (300 bloom, pl 9, food grade, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- ไคโตซานมวลโมเลกุลสูง (1,450 kDa, Fluka, Sigma-Adrich, Japan)
- น้ำกลั่น (double-distilled water)
- 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (nacalai tesque, Japan)
- β -Alanine (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)
- Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3 99%, Fluka, Buchs, Germany)
- Dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride (EDC) (nacalai tesque, Japan)
- N-hydroxysuccinimide (NHS) (nacalai tesque, Japan)
- Enzyme bacterial collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Glycine ultrapure (Usb Corporation , USA)
- Mouse skin fibroblasts (L929 or murine fibroblasts)
- Dulbecco's modified eagle medium, DMEM (10%medium + L-glutamine + AB, Hyclone, Utah, USA)
- Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with $\text{EDTA} \cdot \text{Na}$, Gibco BRL, Canada)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (USB corporation, Cleveland, OH, USA)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen Corp., Paisley, UK)
- Dimethylsulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, Germany)
- Hydrochloric acid (HCl 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, USA)
- Ethanol (99.7-100%, VWR International Ltd., Poole Dorset, United Kingdom)
- Glutaraldehyde (Ajax Finechem, Newzealand)
- Sodium chloride (Usb corporation, USA)
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Germany)
- Sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma Co., St. Louis, USA)

ข) อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digit balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (5-digit balance) รุ่น AE 240 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- แท่งกวนแม่เหล็กและแผ่นให้ความร้อน (Magnetic stirrer/hot plate) รุ่น RCT Basic ของบริษัท Ika labortechnik, Germany
- เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave) รุ่น HVE 25/50 ของบริษัท Hirayama, Japan
- ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum drying oven and pump) รุ่น VD23 ของ บริษัท Binder ประเทศเยอรมัน
- เครื่องทำความเย็น -40°C รุ่น Heto, PowerDry LL3000 ประเทศอเมริกา
- Lyophilizer รุ่น Heto, PowerDry LL3000 ประเทศอเมริกา
- Fine coat (JFC-1100E, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
- Scanning Electron Microscopy (JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
- Universal Testing Machine (No. 5567, Instron, USA)
- Laminar Flow (Safe/Maxi Safe 2010, Holten, USA)
- CO₂ incubator (New Brunswick Scientific, Innova CO170, USA)
- Polystyrene tissue culture discs (NUNC, Denmark)
- 24-well and 48-well polystyrene tissue culture plates (NUNC, Denmark)
- Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
- กระจกใสไม่มีขุย
- โถดูดความชื้น (Desiccators, SR Lab, Thailand)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1235 PC, Shel-Lab)
- กล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast microscope)
- Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)
- Laminar flow hood (BH 18, Labcaire)
- Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

ก) การเตรียมสารละลายเจลาติน

เตรียมสารละลายเจลาตินชนิด A ความเข้มข้น 0.5% และ 0.8% (โดยน้ำหนัก) ในสารละลายอะซีติกเข้มข้น 0.5 และ 0.8% โมลาร์ ตามลำดับ โดยแช่เจลาตินทิ้งในสารละลายอะซีติกเป็นเวลา 30 นาที ก่อน จากนั้นจึงนำไปปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ข) การเตรียมสารละลายโคโตซาน

เตรียมสารละลายโคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (1,450 kDa) ความเข้มข้น 0.5% และ 0.8% (โดยน้ำหนัก) ในสารละลายอะซีติกเข้มข้น 0.5 และ 0.8% โมลาร์ ตามลำดับ โดยการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ค) การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน

นำสารละลายเจลาตินและสารละลายโคโตซานที่เตรียมไว้ในข้อ ก และข้อ ข มาผสมกันในอัตราส่วน 70:30 โดยน้ำหนัก ปั่นกวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วจึงทำให้สารละลายที่ผสมแล้วไม่มีฟองด้วยปั๊มสุญญากาศ หรือทิ้งไว้โดยไม่ปั่นกวนเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงดูดสารละลายที่ไม่มีฟองใส่ลงในหลุมของจานเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม (24-well culture plates) ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งในตู้เย็น (Heto, PowerDry LL3000 ประเทศอเมริกา) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปทำแห้งด้วยการระเหิดน้ำออกที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยเครื่องทำแห้งแข็ง (Lyophilizer, Heto, PowerDry LL3000 ประเทศอเมริกา)

3.3.2 การเชื่อมโยงพันธะ

เมื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.1 แล้ว จากนั้นจึงนำไปทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีดังต่อไปนี้

ก) การเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT)

นำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน เชื่อมโยงพันธะด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 0 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ตู้อบสุญญากาศ (Vacuum oven, VD23 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน)

ข) การเชื่อมโยงพันธะโดยวิธีการแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde, GA)

นำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโคซาน ไปทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยการแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยอะซีไตนกับกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 75:25 ในขวด flask โดยทำการห่อด้วยกระดาษตะกั่ว (foil) เพื่อให้ GA เชื่อมโยงพันธะได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจาก GA จะทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรดและในที่มืด จากนั้นทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย GA ที่ 0.03, 0.06, 0.085, และ 0.12% และแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะที่ 4, 25, และ 37 องศาเซลเซียส

ค) การเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนร่วมกับการแช่ในสารละลาย EDC

นำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโคซานไปเชื่อมโยงพันธะด้วยการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 0 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ตู้อบสุญญากาศ (Vacuum oven, VD23 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน) ก่อน จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปเชื่อมโยงพันธะอีกครั้ง โดยการแช่ในสารละลายที่ผสมกันระหว่างสารละลาย EDC 14 มิลลิโมลาร์ กับสารละลาย N-hydroxy-succinimide (NHS) 5.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ใน phosphate buffered saline (PBS) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไประเหิดน้ำออกที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยเครื่องทำแห้งแข็ง (Lyophilizer, Heto, PowerDry LL3000 ประเทศอเมริกา)

ง) การเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนร่วมกับการอบไอสารละลาย GA

นำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโคซาน ไปทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ตู้อบสุญญากาศ (Vacuum oven, VD23 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน) ก่อน จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปเชื่อมโยงพันธะอีกครั้งด้วยการอบไอ โดยการนำโครงเลี้ยงเซลล์จำนวน 20 ชิ้น วางไว้บนตะแกรงในขวดโหลสุญญากาศ ซึ่งประกอบด้วยสารละลายอะซีไตนกับกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 75:25 แล้วทำการห่อด้วยกระดาษตะกั่ว (foil) ดังแสดงในรูปที่ 3.3 จากนั้นทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย GA ที่ 0.03, 0.06, 0.085, และ 0.12%, แปรผันอุณหภูมิที่ 4, 25, และ 37 องศาเซลเซียส และแปรผันเวลาที่ 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ GA

ในการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน ทั้งวิธีการใช้อุณหภูมิและสารเคมี สามารถเขียนให้อยู่ในรูปรหัสสูตรของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รหัสสูตรต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน

รหัสสูตร ของโครงเลี้ยงเซลล์	วิธีการเชื่อมโยงพันธะ
GCH	โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ
DHT	โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อน
GAS	โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยการแช่ในสารละลาย GA
DEDC	โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนร่วมกับสารเคมี EDC
DGAV	โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนร่วมกับการอบไอดีด้วยสารละลาย GA

3.3.3 การทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

ก) ลักษณะพื้นผิวโดยรวม

พิจารณาลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์โดยรวมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM) ด้วยเครื่อง Joel JSM 5400 ที่มีความต่างศักย์ 12-15 kV ทำการเคลือบทองโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย Ion sputtering device, JFC 1100 ซึ่งพิจารณาลักษณะพื้นผิวโดยใช้ไบโอมิดโกนตัดโครงเลี้ยงเซลล์ในแนวตัดขวาง (cross-section) และแนวราบ (horizontal)

ข) ขนาดของรูพรุน

ขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลต่อการเคลื่อนที่และการกระจายตัวของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์และมีผลกระทบต่อสมบัติทางกล โดยทั่วไปเมื่อขนาดของรูพรุนเพิ่มขึ้นจะทำให้ความแข็งแรงทางโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง [Karageorgiou, V. 2005]

การหาขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ HW. Kang โดยวัดขนาดของรูพรุนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแบบสุ่ม 200 รู ในแนวราบ (horizontal) และแนวตัดขวาง (cross-section) จากนั้นนำขนาดของรูพรุนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย [Kang, HW. และคณะ, 1999]

ค) ความสามารถในการบวมน้ำ

ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญในการดูดซับของเหลวในร่างกาย การเคลื่อนที่ของสารอาหารสำหรับเซลล์ และขบวนการ metabolite ของเซลล์ ซึ่งการทดสอบความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ SJ. Mao โดยคำนวณได้จากผลต่างของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ น้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่แห้งสนิทในสารละลาย PBS buffer ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นซับโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองด้านด้วยกระดาษไม่มีชุย และชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ทันที จะได้เป็นค่าน้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถคำนวณความสามารถในการบวมน้ำ (swelling ratio) ได้จากสูตร

$$\text{ความสามารถในการบวมน้ำ (\%)} = \frac{W_{so} - W_0}{W_0} \times 100$$

โดย W_{so} คือ น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากที่ถูกดูดซับน้ำ และ

W_0 คือ น้ำหนักเริ่มต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ [Mao, SJ. และคณะ, 2003]

ง) ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

การวัดระดับการเชื่อมโยงพันธะดัดแปลงมาจากวิธีของ N. Nagai ซึ่งวัดได้โดยใช้ 2, 4, 6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) โดยทำการศึกษาจากการดูดซับค่า absorbance โดยทำการเปรียบเทียบตัวอย่างที่ต้องการศึกษากับแบลนด์ (blank) ซึ่งจะมีตัวอย่าง 2 ชนิด คือ ตัวอย่างที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะและตัวอย่างที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ ซึ่งสามารถคำนวณหาระดับการเชื่อมโยงพันธะได้จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลง แต่เนื่องจากมีปริมาณเนื้อสารในแต่ละสถานะไม่เท่ากัน จึงมีการประมาณระดับการเชื่อมโยงพันธะได้จากสูตร

$$\text{ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนเชื่อมโยงพันธะ x ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนเชื่อมโยงพันธะ

B คือ น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์หลังเชื่อมโยงพันธะ x ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระหลังเชื่อมโยงพันธะ

TNBS สามารถบ่งบอกถึงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระหรือ $-NH_2$ ในโมเลกุล เนื่องจากหมู่ $-NH_2$ เป็นองค์ประกอบที่พบในเจลาติน ซึ่งถ้าปริมาณหมู่อะมิโนในโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากการเชื่อมโยงพันธะเหลือต่ำลงแสดงว่าเกิดการเชื่อมโยงพันธะภายในโครงเลี้ยงเซลล์สูงขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่เตรียมจากสาร β -alanine โดยแสดงวิธีการเตรียม และกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ค

จ) การนำสารละลาย GA มาใช้ใหม่ในการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA

ในการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี GA มักมีสารพิษหลงเหลือจากการเชื่อมโยงพันธะปะปนอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากไม่สามารถกำจัด GA ได้หมดหลังการเชื่อมโยงพันธะ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษากระบวนการที่สามารถลดการใช้ GA โดยการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA แทนวิธีการแช่ GA ที่โครงเลี้ยงเซลล์ต้องสัมผัสกับกับ GA โดยตรง ดังนั้นจึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อเชื่อมโยงพันธะโดยอบไอ GA ด้วยวิธีการอบไอซ้ำๆ (เปลี่ยนตัวอย่างใหม่และใช้สารละลายเดิม) ซึ่งในการเชื่อมโยงพันธะในแต่ละครั้งใช้ตัวอย่างครั้งละ 127 มิลลิกรัม และ 202 มิลลิกรัม สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% และ 0.8% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แล้วโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ถูกนำไปประเมินระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยวิธี TNBS เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการอบไอของ GA

ฉ) ความทนต่อแรงกด

โครงเลี้ยงเซลล์ควรจะสามารถในการรับแรงกดได้มาก ทั้งนี้เพื่อจะคงสภาพรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์ในการส่งผ่านอาหาร และอากาศสำหรับเซลล์ รวมทั้งไม่เกิดการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อนำไปใช้งานจริงจึงมีการทดสอบสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์โดยวัดจาก การทนทานต่อแรงกด (compression test) จากเครื่อง universal testing machine (UTM, INSTRON No.4465, NY, USA) โดยใช้อัตราการกด 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที เพื่อดำเนินหาค่า young modulus โดยหาได้จากค่าความชันระหว่างกราฟของความเค้น (compression stress) และความเครียด (compression strain) ที่ initial stress-strain ในช่วง 5-20% แรกของแรงกด โดยแสดงตัวอย่างการคำนวณและกราฟในภาคผนวก ข

ช) การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้สำหรับผิวหนังควรจะมีการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biodegradation) ในช่วง 2 ถึง 4 สัปดาห์ [Yannas, IV. 2001] การทดสอบการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เลียนแบบสภาวะในร่างกายโดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) โดยดัดแปลงวิธีของ YS. Pek โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS buffer) ที่ pH 7.4 ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 32 ยูนิต/มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

0.25, 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน จึงนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ก่อนที่จะทำให้แห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็งและชั่งน้ำหนัก โดยที่การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ น้ำหนักที่เหลืออยู่} = 100 - \frac{w_o - w_t}{w_o} \times 100$$

ขณะที่ w_o คือ น้ำหนักตอนเริ่มต้น

และ w_t คือ น้ำหนักที่เวลาใดๆ [Pek, YS. และคณะ, 2003]

โดยทำการทดลองตัวอย่างซ้ำ 4 ครั้ง ($n=4$) จากนั้นจึงนำมาหาค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ถูกย่อยสลายจนน้ำหนักลดลงเหลือ 50% เมื่อเทียบกับน้ำหนักในตอนเริ่มต้น

ช) การทดสอบจำนวนเซลล์สัมพัทธ์ในห้องปฏิบัติการ

โครงเลี้ยงเซลล์ควรจะมี ความเข้ากันได้กับเซลล์ได้ดีจึงทำการวิเคราะห์การเข้ากันได้ของโครงเลี้ยงเซลล์กับเซลล์ไลน์มาตรฐานของผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblast) ในสภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biocompatibility) โดยประเมินได้จากการยึดเกาะของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่เวลา 5, 48, และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งจะวัดกิจกรรมของเซลล์ที่มีชีวิต โดยดัดแปลงวิธีของ H. Liu [Lui, H. และคณะ, 2004] ซึ่งวิธีการเตรียมและการคำนวณแสดงในภาคผนวก ง

ฉ) ความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ (cytotoxicity) ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การตรวจสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ใช้วิธี indirect method แบบ elution titration test เป็นการสกัดตัวอย่างก่อนโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เป็นสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ และทดสอบกับเซลล์ที่เลี้ยงเป็นแบบ monolayer ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 (1999) โดยส่งไปทดสอบยังสำนักงานยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นบุคคลที่สามที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องในการวิจัยเป็นผู้ทดสอบ ดังแสดงในภาคผนวก จ

3.3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกการทดลองจะมีการทำซ้ำอย่างน้อย $n=3$ และมีการเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้ t-test ที่ระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ โดยใช้ผลจากโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโคซานที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ

แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบไฮดรอลิก GA เป็นตัวเปรียบเทียบ รวมทั้งมีการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

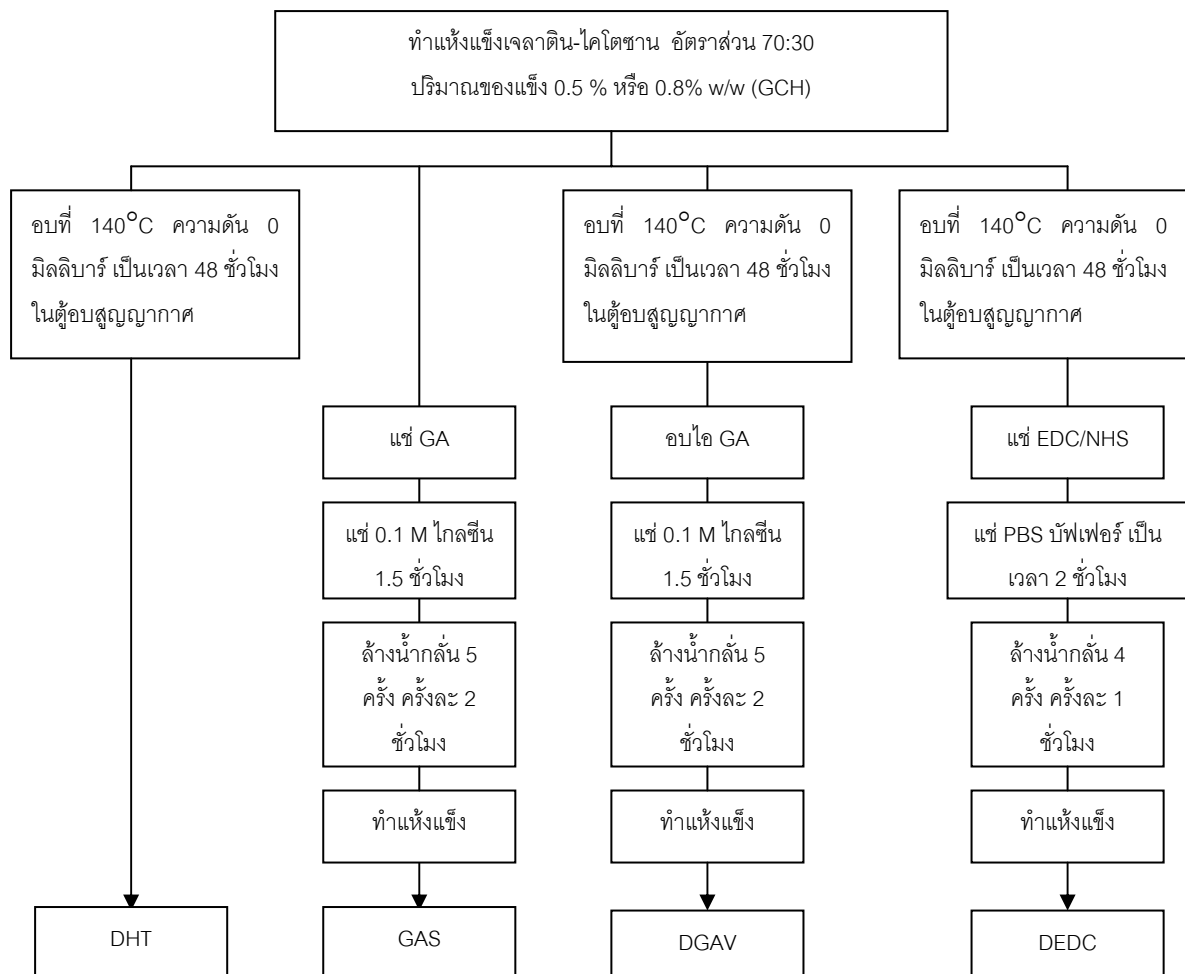
3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเคมี ตึกอาคารอนุสาสน์ยันตรกรรม ชั้น 5 ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ชั้น 9 ตึก อ.ป.ร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

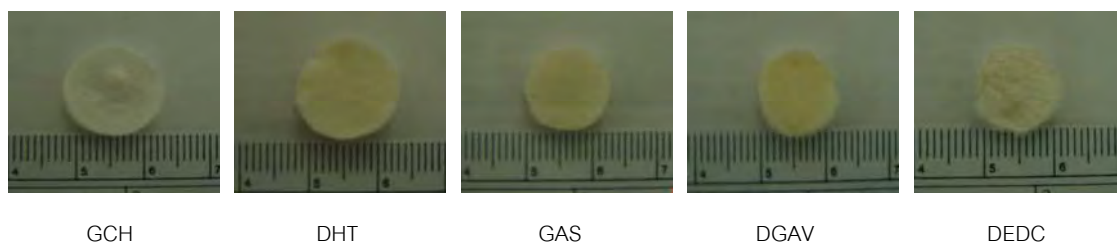
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในการศึกษานี้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซาน (70:30) ที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแข็ง (freeze-dried) ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 หรือ 0.8 โดยน้ำหนักแล้ว ถูกนำมาเชื่อมโยงพันธะด้วยกระบวนการที่แตกต่างกัน 4 กระบวนการดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยมีการเปรียบเทียบลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ในด้านกายภาพ เคมี และชีววิทยา เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue engineering) เช่น ผิวหนังแท้ โดยมีรายงานลักษณะสมบัติที่เหมาะสมของโครงเลี้ยงเซลล์ดังนี้ ขนาดรูพรุนประมาณ 70 ไมครอน [Yannas., และคณะ, 1982], ความทนต่อแรงกด (compressive modulus) 0.029 กิโลปาสคาล [Freyman., และคณะ, 2001], การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ในช่วง 2-4 สัปดาห์ [Yannas, และคณะ, 2001]



รูปที่ 4.1 ขั้นตอนการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ



รูปที่ 4.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะโครงสร้างเซลล์แบบต่างๆ

การศึกษาผลของการเชื่อมโยงพันธะมีการศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะสมบัติของโครงสร้างเซลล์ชนิดต่างๆดังนี้

- 4.1 ผลของการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (GA) โดยศึกษาจากอุณหภูมิเวลาและความเข้มข้นที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ
- 4.2 ผลของการเชื่อมโยงพันธะโครงสร้างเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบอื่น ๆ ที่มีรายงานมาก่อน
- 4.3 ผลของการนำสารละลาย GA มาใช้ใหม่ในการเชื่อมโยงพันธะของโครงสร้างเซลล์แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA

4.1 ผลของการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (GA)

โครงสร้างเซลล์เจลาติน-โคโคซานที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแข็ง (freeze-dried) ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนเจลาตินต่อโคโคซาน 70:30 ถูกนำมาเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde, GA) 2 แบบ ได้แก่ แบบแช่ในสารละลาย GA และแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ซึ่งเป็นวิธีเชื่อมโยงพันธะที่ดัดแปลงมาจากการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA ที่โครงสร้างเซลล์ต้องสัมผัสกับสารละลาย GA โดยตรงและวิธีนี้ใช้ไอระเหยของ GA ในการเชื่อมโยงพันธะ เพื่อลดปริมาณ GA ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ดีในการลดสารพิษในกระบวนการเชื่อมโยงพันธะ โดยมีการศึกษาผลของอุณหภูมิเวลาและความเข้มข้นที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ โดยมีการศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะพื้นผิว, ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, ความสามารถในการบวมน้ำ และความทนต่อแรงกด รวมทั้งลักษณะสมบัติทางเคมี ได้แก่ ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโครงสร้างเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะทั้ง 2 แบบ เพื่อเลือกโครงสร้างเซลล์ที่มีความเหมาะสมไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.1.1 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ

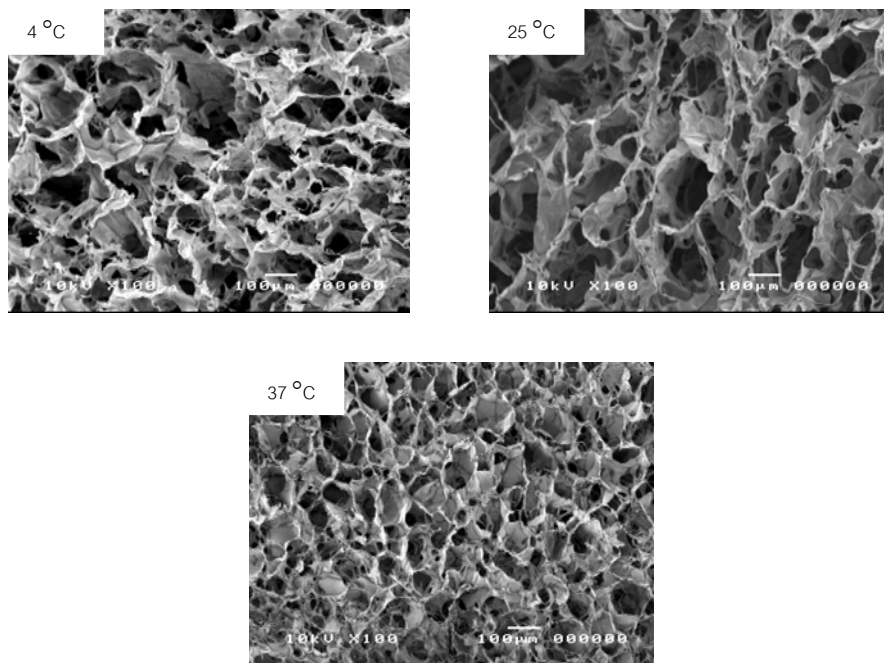
เมื่อทำการเชื่อมโยงพันธะของโครงสร้างเซลล์แบบแช่ในสารละลาย GA ความเข้มข้น 0.06% (wt/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิ (4, 25, และ 37 องศาเซลเซียส) แม้ว่าลักษณะพื้นผิว

ของโครงเลี้ยงเซลล์ดูแตกต่างกัน แต่ขนาดรูพรุนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากความเบี่ยงเบนของข้อมูล (SD) สูง (รูปที่ 4.3) โดยขนาดของรูพรุนเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 85-95 ไมครอน ส่วนการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อทำการเชื่อมโยงพันธะที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันมีขนาดรูพรุนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้เวลาอบไอส 6-24 ชั่วโมง โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 60-90 ไมครอน (รูปที่ 4.4 และรูปที่ 4.5) ขนาดรูพรุนเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น และลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ต่ำกว่า 30 ไมครอน) เมื่อทำการเชื่อมโยงพันธะที่เวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสูงกว่า 4 องศาเซลเซียส

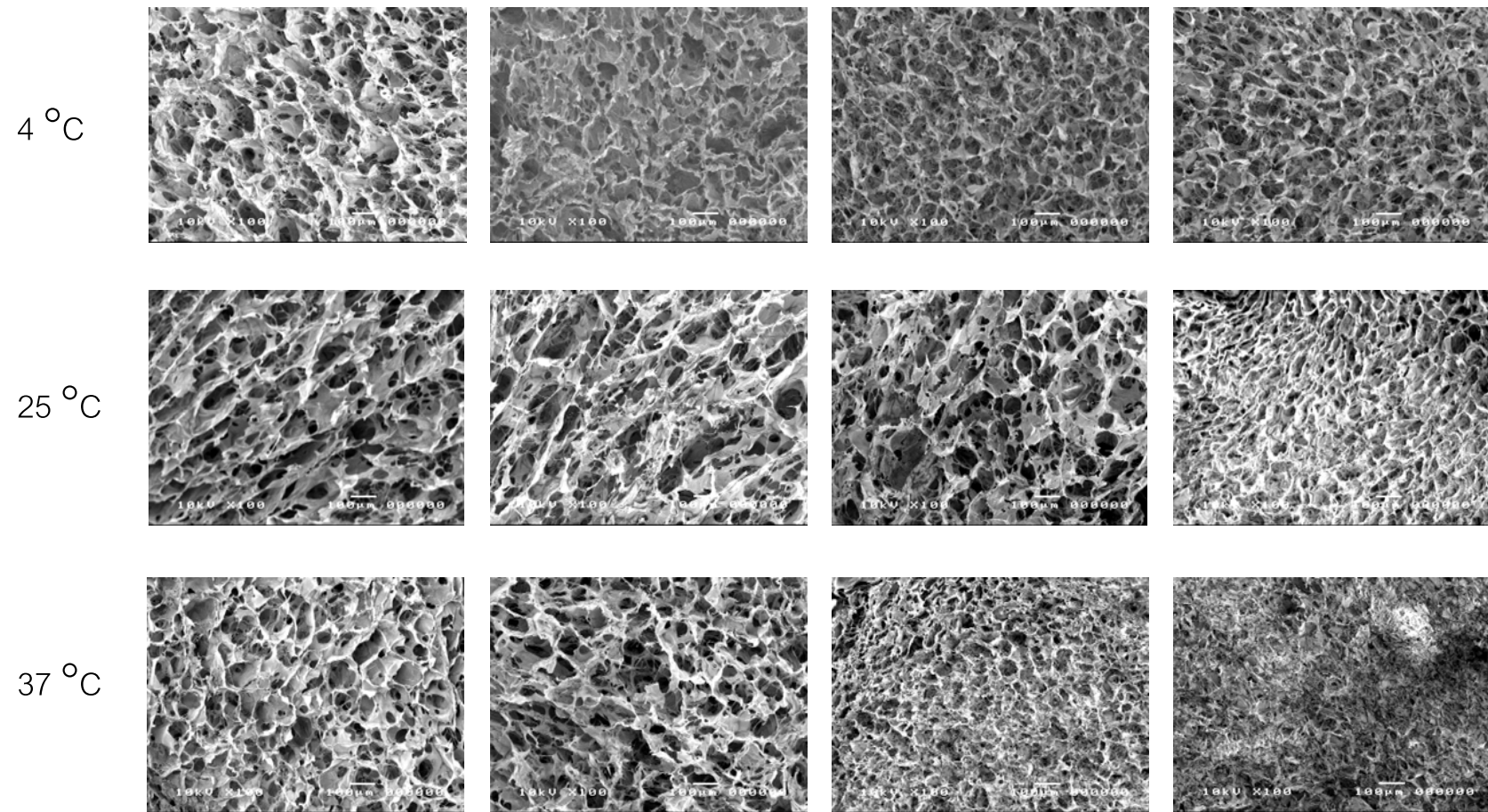
การเปลี่ยนแปลงขนาดรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ระดับของการเชื่อมโยงพันธะในโครงเลี้ยงเซลล์ [Lee, C.R., 2001] ซึ่งในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการสูญเสียน้ำหนักหลังกระบวนการและการหดตัว มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนด้วย นอกจากนี้ขนาดรูพรุนยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งก่อนที่นำไปทำแห้ง (lyophilized) เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ Kang, และคณะ (1999) พบว่าเมื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ -20, -80, และ -196 องศาเซลเซียส ขนาดของรูพรุนมีแนวโน้มลดลงและมีความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์สูงขึ้น เมื่อทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ แต่ในการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์ในงานวิจัยนี้มีกระบวนการทำแห้งแข็งที่อุณหภูมิเดียวกันคือ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นขนาดรูพรุนที่เปลี่ยนแปลงไปจึงไม่เป็นผลจากการทำแห้งแต่เป็นผลจากกระบวนการเชื่อมโยงพันธะ โครงเลี้ยงเซลล์ที่นำมาเชื่อมโยงพันธะมีเจลาตินซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้เป็นองค์ประกอบหลัก ในระหว่างกระบวนการเชื่อมโยงพันธะที่มีการแช่ในน้ำ (รูปที่ 4.1) จึงมีเจลาตินบางส่วนละลายหายไป ในขณะที่ปฏิกิริยาเชื่อมโยงพันธะยังไม่สมบูรณ์ มีผลให้ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง รวมทั้งบางกระบวนการมีการใช้ความร้อน บางกระบวนการมีการใช้น้ำในระหว่างกระบวนการเชื่อมโยงพันธะล้วนมีผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA เมื่อใช้อุณหภูมิในการเชื่อมโยงพันธะที่สูงขึ้น น้ำหนักที่หายไปน้อยกว่า 5% และการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ระหว่าง 30-40% (รูปที่ 4.6) ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอส GA เมื่อใช้อุณหภูมิในการเชื่อมโยงพันธะสูงกว่า 4 องศาเซลเซียส มีการหดตัวที่สูงกว่าแบบแช่ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 50-75% และมีการหดตัวสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีการสูญเสียน้ำหนักไม่แตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิและเวลาในการเชื่อมโยงพันธะที่ต่างกัน โครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอส GA นี้ได้ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนจะนำมาอบไอส จึงอาจมีผลทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีการหดตัวที่สูงกว่า ดังที่ Wess, และคณะ (2000) เคยรายงานไว้ว่าการใช้ความร้อนในการเชื่อมโยงพันธะมีผลต่อน้ำหนักที่หายไปและการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ ความร้อนทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมโยงพันธะเร็วขึ้น ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการหดตัวจากความเร็วของปฏิกิริยาในแต่ละจุดได้เร็วไม่เท่ากัน ส่วนการสูญเสียน้ำหนักอาจเกิดจากการละลายออกไปบางส่วนของผนังโครงเลี้ยงเซลล์ที่เป็นเจลาติน ส่งผลให้มี

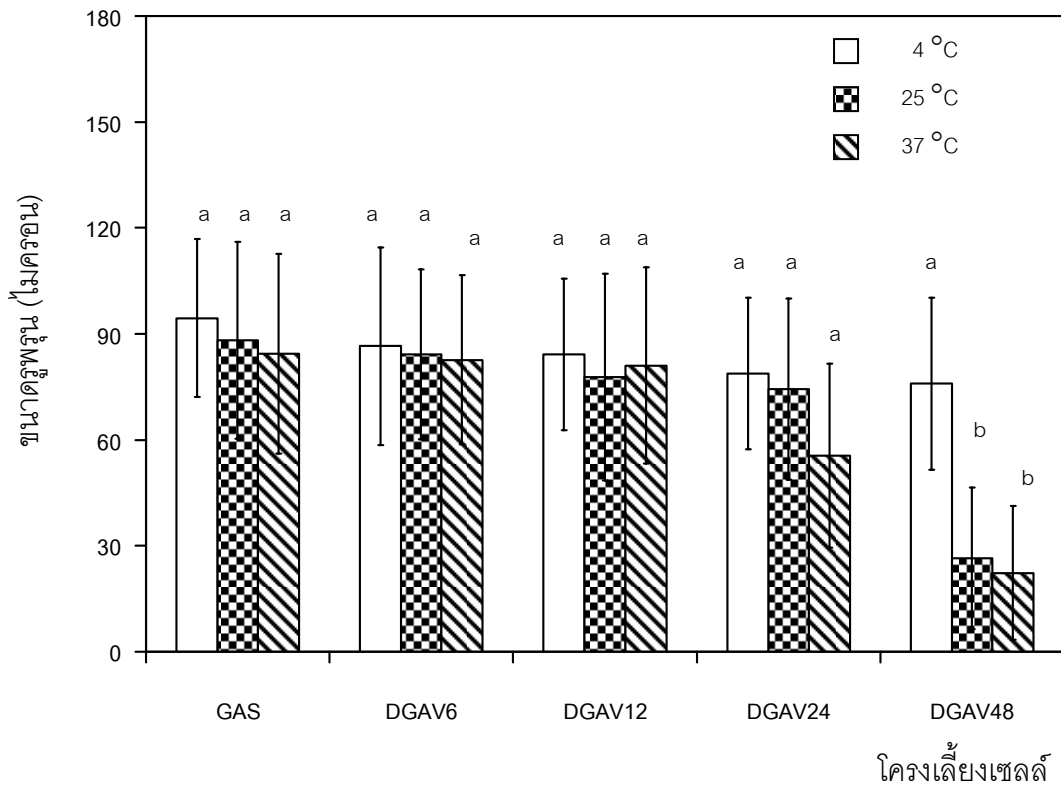
ขนาดรูพรุนที่ใหญ่ขึ้น ในขณะที่การหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้มีขนาดรูพรุนที่ลดลง อนึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ทุกแบบผ่านกระบวนการทำแห้งแข็งเป็นกระบวนการสุดท้าย เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษา แต่เมื่อนำมาใช้งานจะต้องมีการนำมาแช่สารละลายบัฟเฟอร์ให้อิ่มตัว อาจจะทำให้มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าขนาดที่รายงานในงานวิจัยนี้



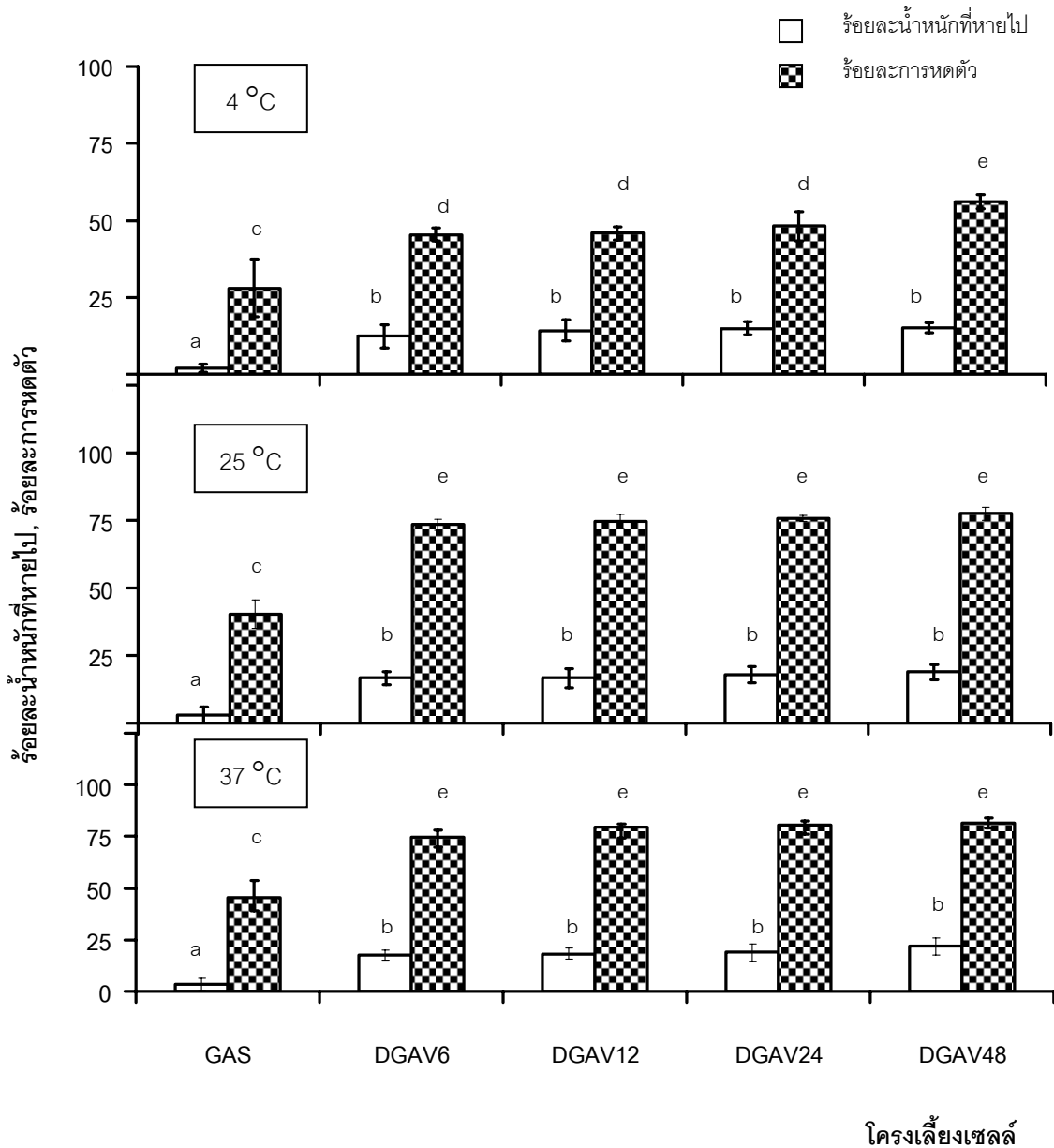
รูปที่ 4.3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้น GA 0.06% v/v) ที่ 4, 25, และ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอของสารละลาย GA ที่ 4, 25, และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ a-b แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแซในสารละลาย GA, DGAV6, DGAV12, DGAV24, DGAV48 เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

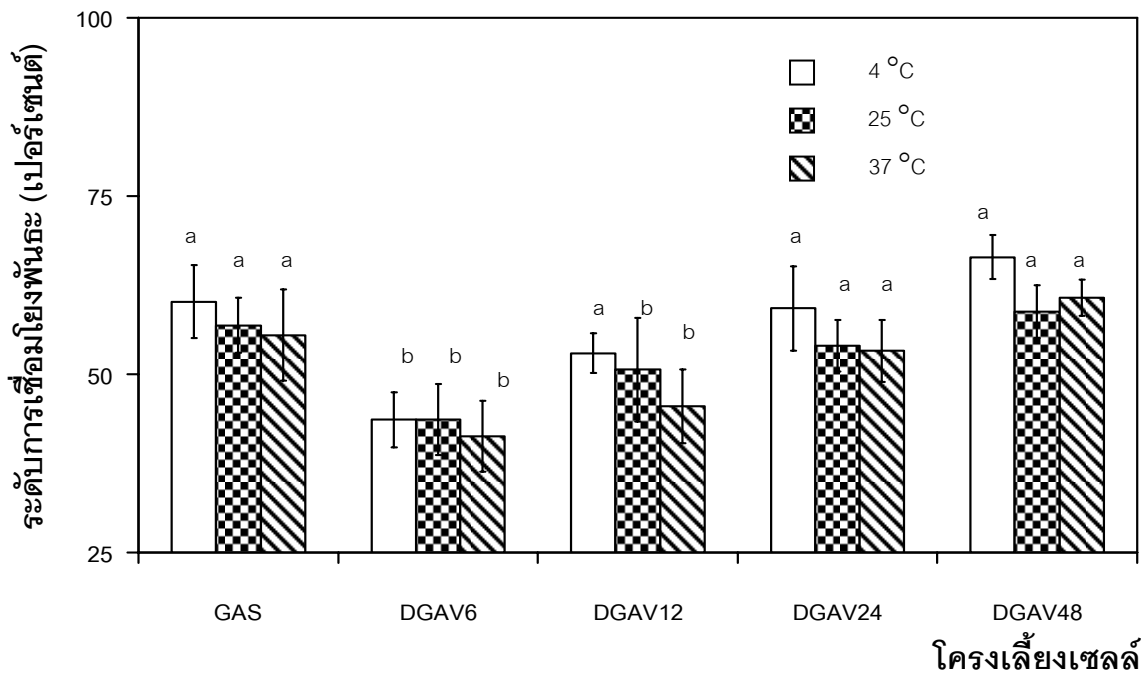


รูปที่ 4.6 ร้อยละน้ำหนักรที่หายไปและร้อยละการเหี่ยวตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

a-d แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายเหตุ GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแซนไธสละลาย GA, DGAV6, DGAV12, DGAV24, DGAV48 เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับบอโรไดซอร์ละลาย GA ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

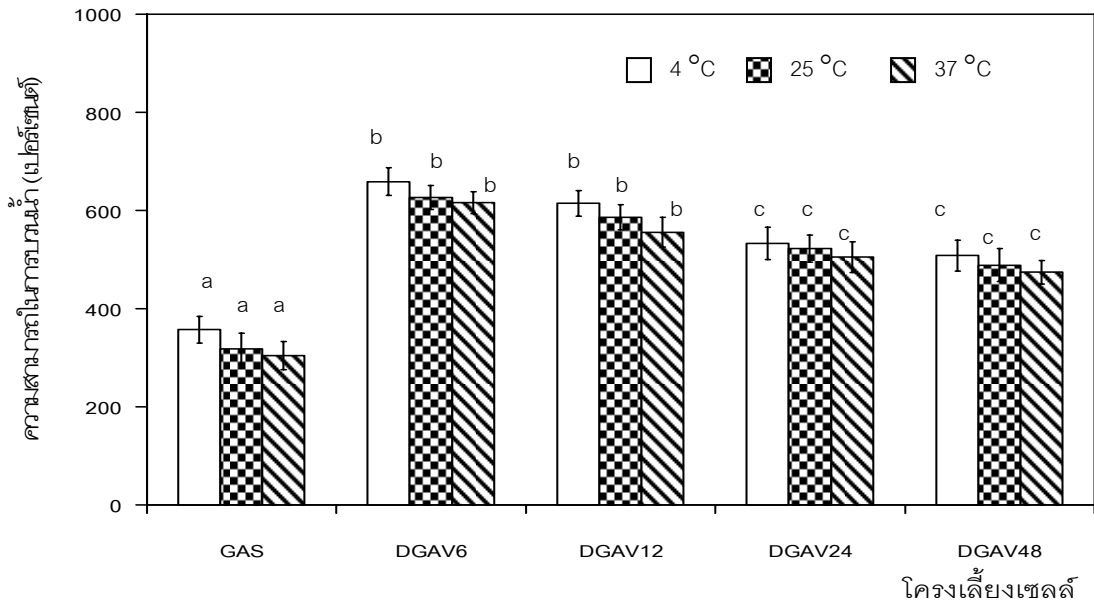
เมื่อพิจารณาระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองแบบ ระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแซนไธสมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้อุณหภูมิในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบบอโรไดเมื่อใช้อุณหภูมิในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น ระดับการเชื่อมโยงพันธะมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน แต่เมื่อใช้เวลาในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้นถึง 24-48 ชั่วโมง ระดับการเชื่อมโยงพันธะมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเท่าๆกับระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบแซนไธส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7) ส่วน

ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะทั้งสองแบบต่ำลง เมื่อระดับการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น (รูปที่ 4.8) โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ เมื่อใช้อุณหภูมิและเวลาในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้นความสามารถในการบวมน้ำมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่สูงกว่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบแช่ โดยทั่วไปความสามารถในการบวมน้ำจะบ่งบอกถึงระดับการเชื่อมโยงพันธะที่เปลี่ยนไป โดยถ้ามีการเชื่อมโยงพันธะมากขึ้นความสามารถในการบวมน้ำลดลง [Ozeki, M., และคณะ, 2004] อย่างไรก็ตามแม้ว่าระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่จะไม่แตกต่างกับระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอที่ 24 และ 48 ชั่วโมง แต่กลับมีความสามารถในการบวมน้ำที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากการที่โครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอมีการสูญเสียน้ำหนักและการหดตัวที่สูงกว่า ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้เวลาและอุณหภูมิสูงขึ้น (รูปที่ 4.9) แต่มีค่าสูงกว่าความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่อย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอที่ 24 และ 48 ชั่วโมง จะมีระดับการเชื่อมโยงพันธะที่ใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ แต่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำหนักที่หายไปสูงกว่าจึงทำให้มีความหนาแน่นต่ำกว่า ส่งผลให้ความทนต่อแรงกดต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่



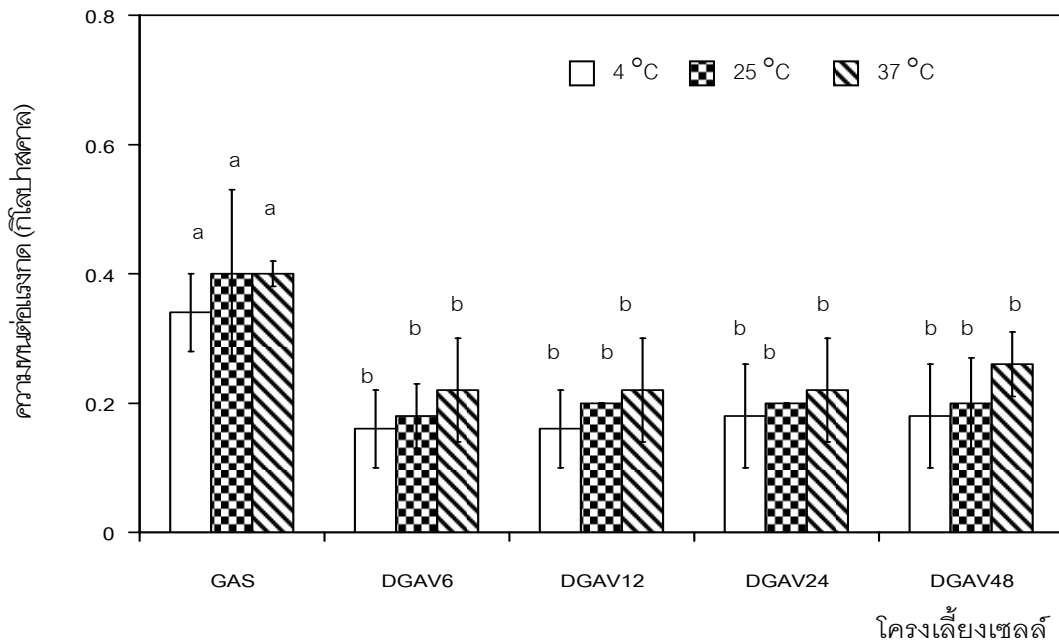
รูปที่ 4.7 ระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV (0.06% v/v)

a-b แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายเหตุ GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA, DGAV6, DGAV12, DGAV24, DGAV48 เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.8 ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน (70:30) ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5 % โดยน้ำหนัก ที่เชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารละลาย GA

a-c แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05



รูปที่ 4.9 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน (70:30) ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5 % โดยน้ำหนัก ที่เชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารละลาย GA

a-b แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05, หมายเหตุ GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA, DGAV6, DGAV12, DGAV24, DGAV48 เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย GA ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์

เมื่อทำการเชื่อมโยงพันธะโดยการแปรผันอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะในหัวข้อ

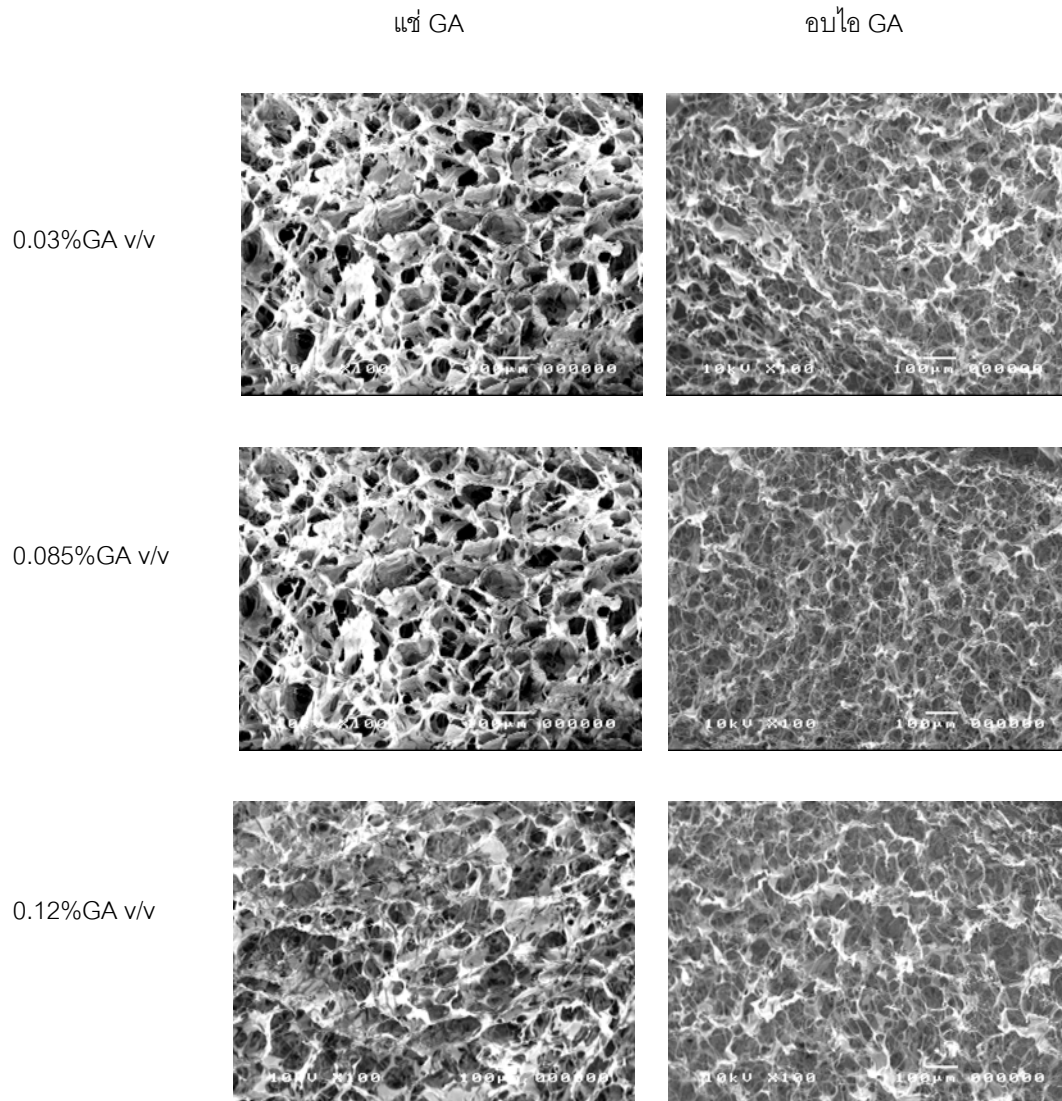
4.1.1 แล้วจากนั้นได้เลือกสภาวะที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบอบไอน้ำ GA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการศึกษาผลความเข้มข้นของ GA ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ เนื่องจากที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านกระบวนการเชื่อมโยงพันธะทั้งสอง มีขนาดรูพรุนกับน้ำหนักคงเหลือสูง ปริมาตรคงเหลือกับร้อยละการหดตัวต่ำ ระดับการเชื่อมโยงพันธะและ ความทนต่อแรงกดสูง ลักษณะพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA และแบบอบไอน้ำ GA ที่ความเข้มข้นของ GA แตกต่างกันแสดงในรูปที่ 4.10 โครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอน้ำมีลักษณะคล้ายเส้นใย และผนังของรูพรุนบางกว่าแบบแช่ GA ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA และแบบอบไอน้ำ GA มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ GA สูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA มีขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำ GA ทุกความเข้มข้น GA แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.11) น้ำหนักที่หายไปและการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะทั้งสองแบบ มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้น GA สูงขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันภายในกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA มีน้ำหนักที่หายไปและการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำ GA ทุกความเข้มข้น GA (รูปที่ 4.12)

โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA มีขนาดรูพรุนสูงขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้น GA ในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น [Ma, L., และคณะ, 2003] อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการเชื่อมโยงพันธะของ GA เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและในเวลาเดียวกันโครงเลี้ยงเซลล์บางส่วนก็เกิดการละลายด้วย โดยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA มีขนาดรูพรุนเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 88-106 ไมครอน และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำ GA มีขนาดรูพรุนเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 75-89 ไมครอน โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำ GA มีการหดตัวและมีน้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA มาก ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเชื่อมโยงพันธะที่ต่างกัน ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำ GA มีน้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA อย่างเห็นได้ชัดในทุกความเข้มข้น GA เมื่อความเข้มข้นของ GA ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น มีผลทำให้ยังสูญเสียเนื้อสารมากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากที่ความเข้มข้นของ GA สูงๆ ปฏิกิริยาของการเชื่อมโยงพันธะเกิดได้ไม่สมบูรณ์ ซึ่ง GA ที่ความเข้มข้นมากกว่าจะแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนได้มากกว่า จึงเกิดความแตกต่างของความหนาแน่นในการเชื่อมโยงพันธะ (crosslinking density) ที่ขอบและภายในของโครงเลี้ยงเซลล์ อาจเป็นผลให้เกิดการละลายของส่วนที่ GA ยังไปไม่ถึงและการหดตัวที่มากกว่า ผลการทดลองในหัวข้อนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ GA ไม่มีผลต่อการหดตัวและน้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์ ถ้ากระบวนการเชื่อมโยงพันธะต่างกัน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ จะมีน้ำหนักที่หายไปและการหดตัวที่ต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำเสมอด้วยปฏิกิริยาเชื่อมโยงพันธะที่เกิดขึ้นได้เร็วกว่า เนื่องจากการนำ GA เข้าสู่

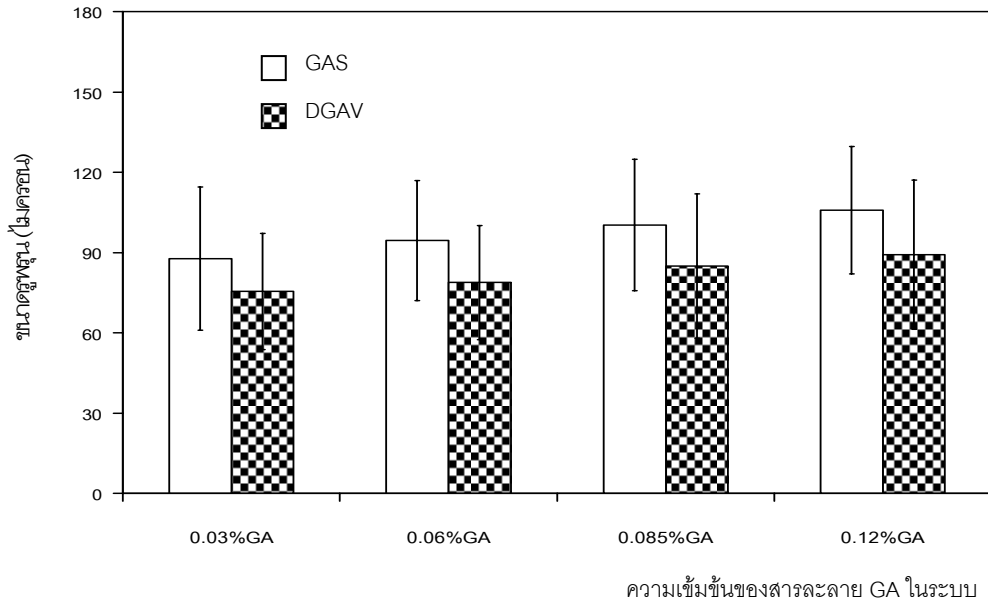
โครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายทำได้รวดเร็วกว่าการนำ GA โดยไอของอะซีโตน และโครงเลี้ยงเซลล์แบบแช่ไม่ได้ผ่านกระบวนการอบด้วยความร้อนมาก่อนจึงอาจทำให้การหดตัวน้อยกว่ามาก (รูป 4.1)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงระดับการเชื่อมโยงพันธะ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ GA มีระดับการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้น GA ถึง 0.085% อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.13) โครงเลี้ยงเซลล์แบบแช่ GA มีระดับการเชื่อมโยงพันธะสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอ GA ทุกความเข้มข้น แต่ไม่มีนัยสำคัญ ในขณะที่เดียวกันความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แบบแช่ GA และโครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอ GA ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้น GA ในการเชื่อมโยงพันธะอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์แบบแช่ GA มีความสามารถในการบวมน้ำต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอ GA ทุกความเข้มข้นของ GA ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ (รูปที่ 4.14) โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ มีระดับการเชื่อมโยงพันธะสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอทุกความเข้มข้น เนื่องจากการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ใช้ GA 0.06% ในสารละลาย 100% (อะซีโตน, กรดไฮโดรคลอริก, และ GA) แต่การเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอใช้การฟุ้งของไอกายในภาชนะปิด ดังนั้นความเข้มข้นต่อปริมาตรของ GA จึงน้อยกว่าแบบแช่ ภาชนะปิดที่ใช้มีรูปร่างเป็นทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร ปริมาตร 1272 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายที่มี GA อยู่ 0.06% เท่ากับการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ หรือ 0.0047% (v/v) ซึ่งมีความเข้มข้นของ GA ที่น้อยกว่าความเข้มข้นของ GA ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ประมาณ 12-13 เท่า แต่ก็ยังมีระดับการเชื่อมโยงพันธะที่ใกล้เคียงกับแบบแช่ แสดงว่าระบบการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอสามารถเชื่อมโยงพันธะได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ GA ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะ นอกจากนี้เมื่อปริมาณของ GA สูงขึ้น ส่งผลให้หมู่แอลดีไฮด์ของ GA สามารถเชื่อมโยงพันธะกับหมู่อะมิโนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากเจลาตินและไคโตซานได้มากขึ้น เนื่องจาก 1 หมู่แอลดีไฮด์ของ GA สามารถเชื่อมโยงพันธะกับ 2 หมู่อะมิโนของโปรตีน [Damink, L.H.H.O., และคณะ, 1995] โดยทั่วไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GA ในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น ระดับการเชื่อมโยงพันธะมีค่าสูงขึ้นด้วย [Sheu, M.T., และคณะ, 2000] และส่งผลให้ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ GA สูงขึ้น

เมื่อพิจารณาความทนต่อแรงกดโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้น GA ในการเชื่อมโยงพันธะสูงขึ้น ความทนต่อแรงกดมีแนวโน้มสูงขึ้น และสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอ GA ทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.15) ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองแบบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GA ถึง 0.12% ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.03-0.085% ค่าความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์จากกระบวนการเดียวกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าจะมีแนวโน้มสูงขึ้นตามความเข้มข้น GA ที่สูงขึ้น การที่ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์จากสองกระบวนการมีค่าต่างกันทั้งๆที่ระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกัน อาจเนื่องจากความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์หลังผ่านการเชื่อมโยงพันธะที่ต่างกันเนื่องจากการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการ

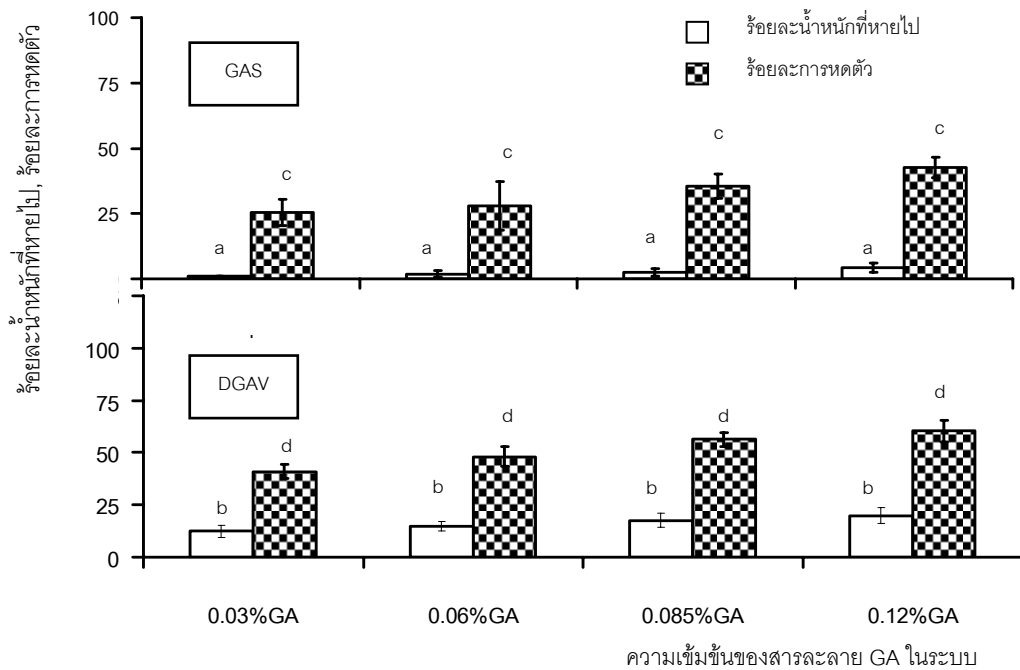


รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA และแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไค้ GA (240 ไมโครลิตร GA/127 มิลลิกรัมโครงเลี้ยงเซลล์) ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.085, 0.12% GA wt/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาชนะปิดขนาด 1272 ลูกบาศก์เซนติเมตร



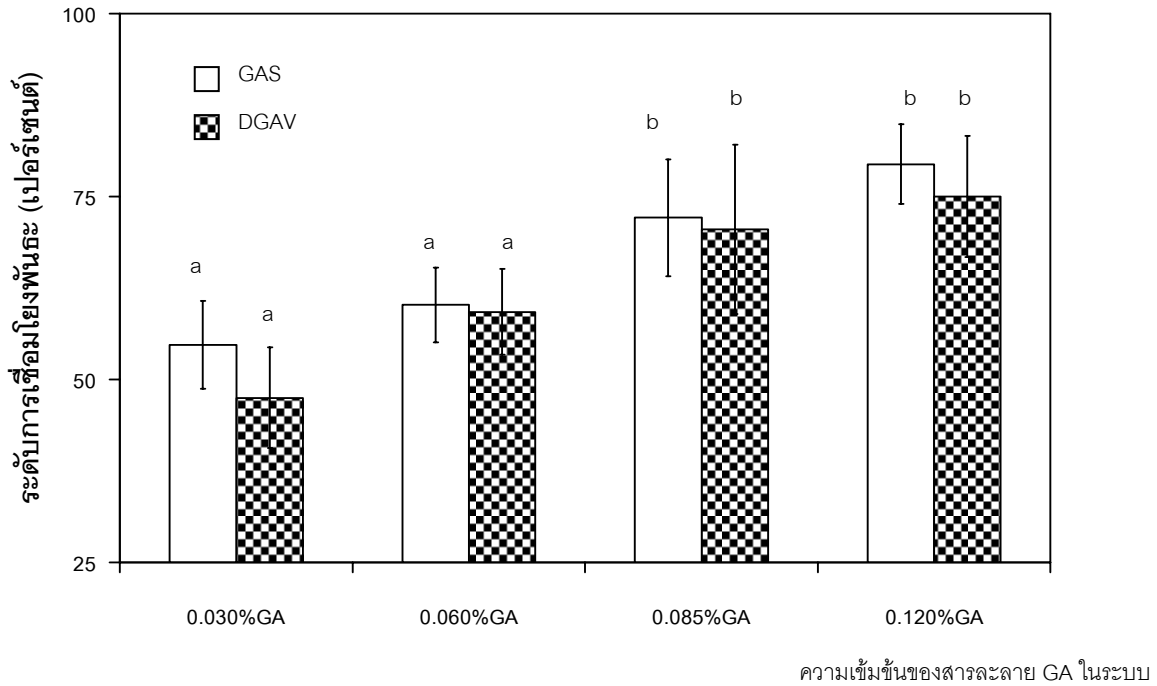
รูปที่ 4.11 ขนาดรากของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ

a-e แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

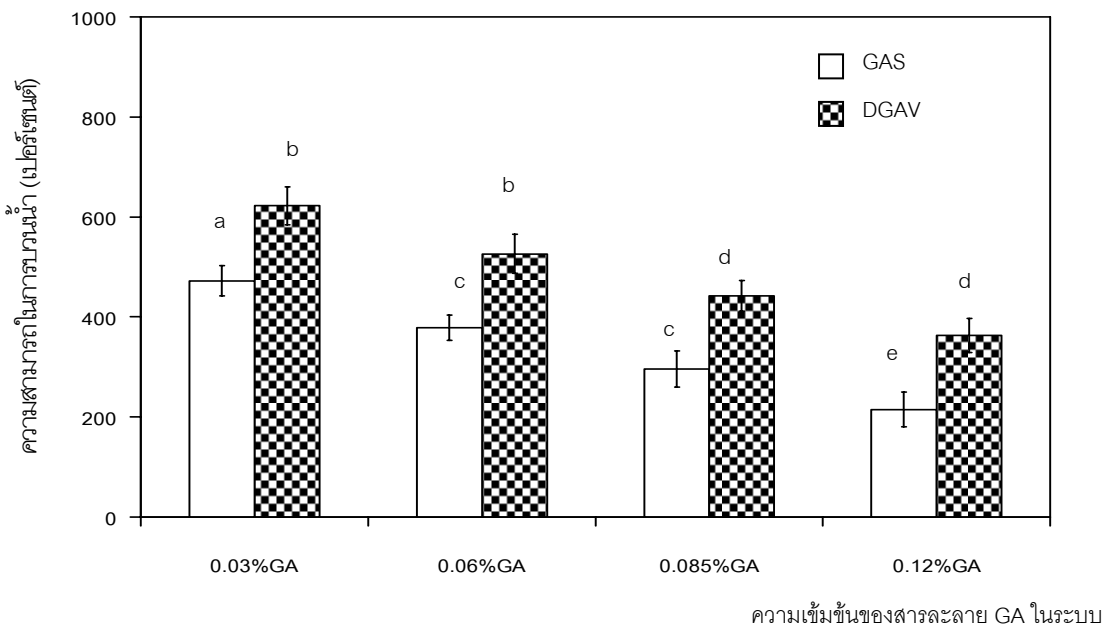


รูปที่ 4.12 ร้อยละน้ำหนักรากที่หายไปและรอยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ

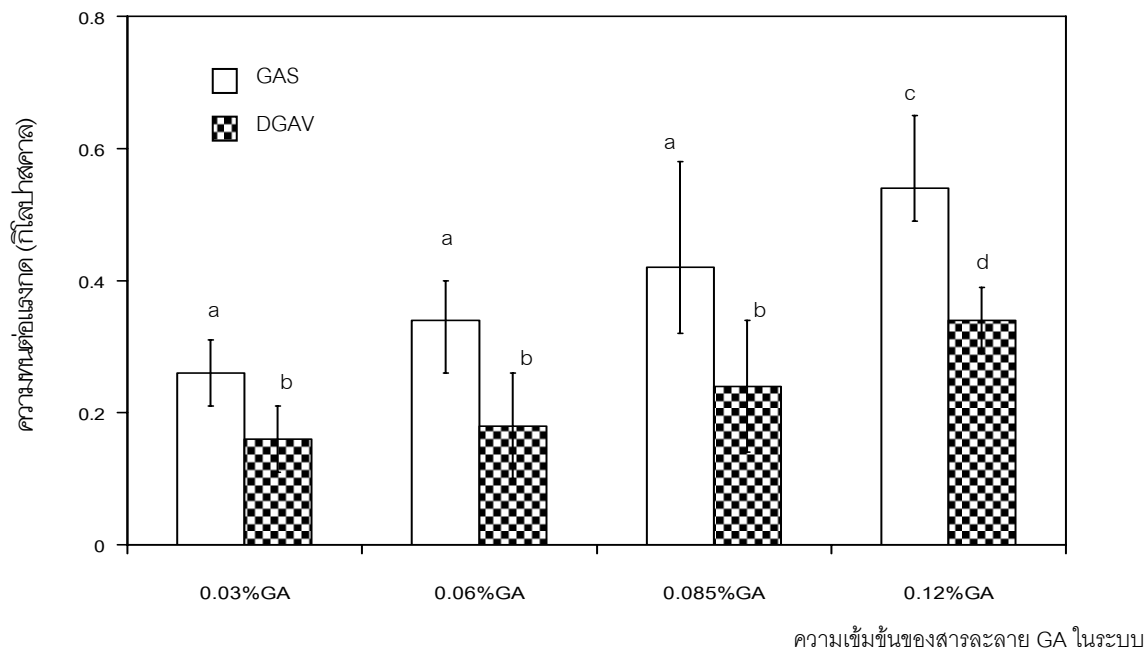
a-d แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายเหตุ GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำสารละลาย GA



รูปที่ 4.13 ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ
 a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05



รูปที่ 4.14 ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ
 a-e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05, หมายเหตุ GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแซนในสารละลาย GA, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA



รูปที่ 4.15 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น GA ต่างๆ

a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

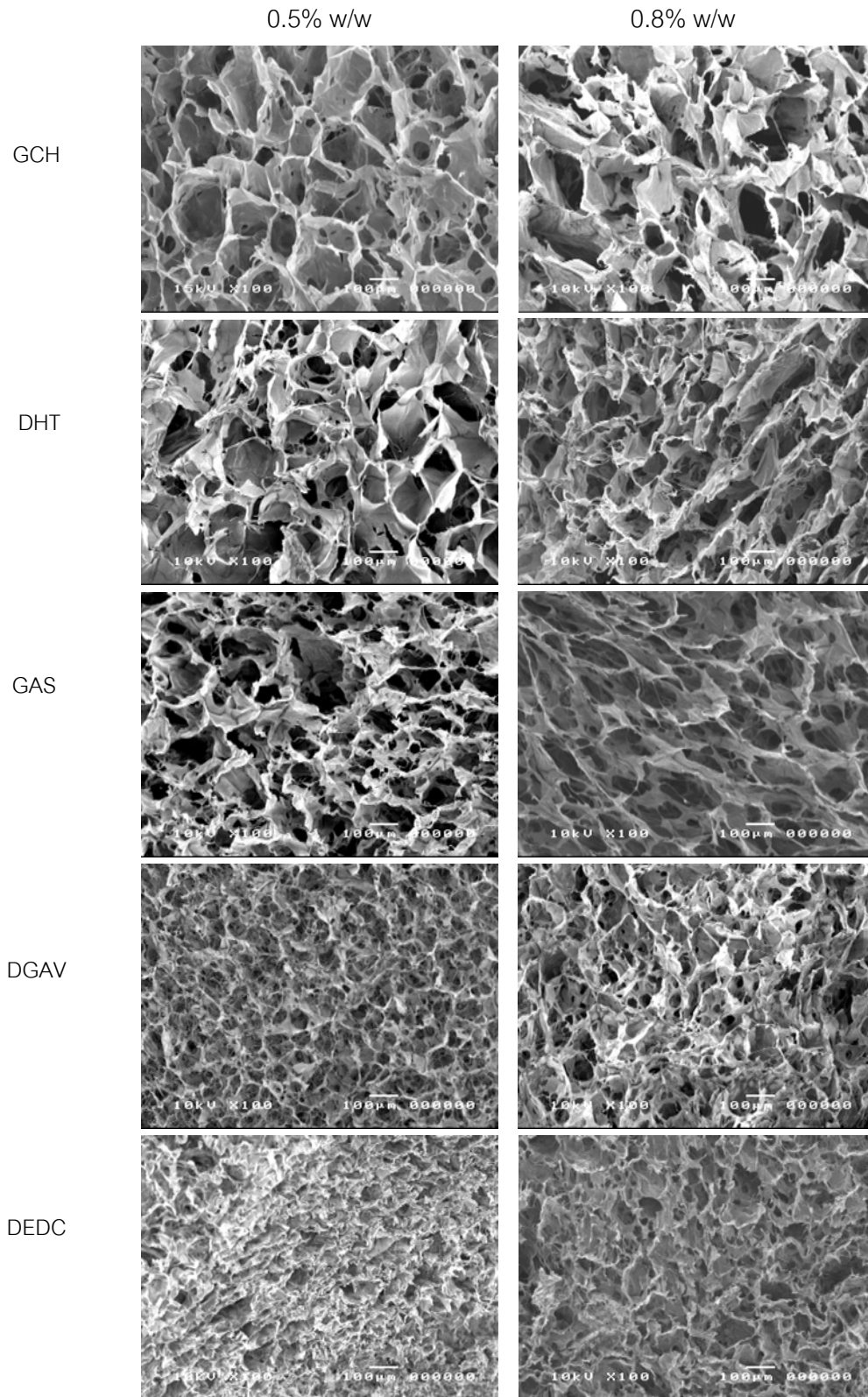
หมายเหตุ GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA

4.2 การเปรียบเทียบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบอบไอสารละลาย GA ที่ความเข้มข้น GA 0.06% w/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถูกเลือกมาเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ (GCH) และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบอื่นๆที่มีรายงานในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์อีก 2 กระบวนการ ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียว (DHT) [Ozeki, M., และคณะ, 2004] และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนร่วมกับแช่ในสารละลาย 1-ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) [Pek, Y.S., และคณะ, 2003] โดยมีกระบวนการเชื่อมโยงพันธะที่แตกต่างกัน ดังรูป 4.1 กล่าวคือ GCH เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านกระบวนการเชื่อมโยงพันธะแต่ผ่านกระบวนการทำแห้งแข็ง ซึ่งมีการดึงน้ำออกที่อุณหภูมิต่ำความดันสูง ในทางทฤษฎีแล้วอาจเกิดการเชื่อมโยงพันธะกันแต่ไม่มาก DHT เกิดจากการนำ GCH มาอบที่สูญญากาศ และ EDC เป็นกระบวนการคล้าย GAS แต่เชื่อมโยงพันธะโดยการแช่ในสารเคมีชนิดกัน และการเกิดปฏิกิริยาที่ต่างกัน โดยการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA เป็นการเชื่อมโยงพันธะซึ่ง GA เข้าไปแทรกอยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 2.12) EDC เป็น coupling agent ซึ่งไม่เหลือในโครงสร้างของโปรตีนหลังการเชื่อมโยงพันธะแล้ว นอกจากนั้นยังมี

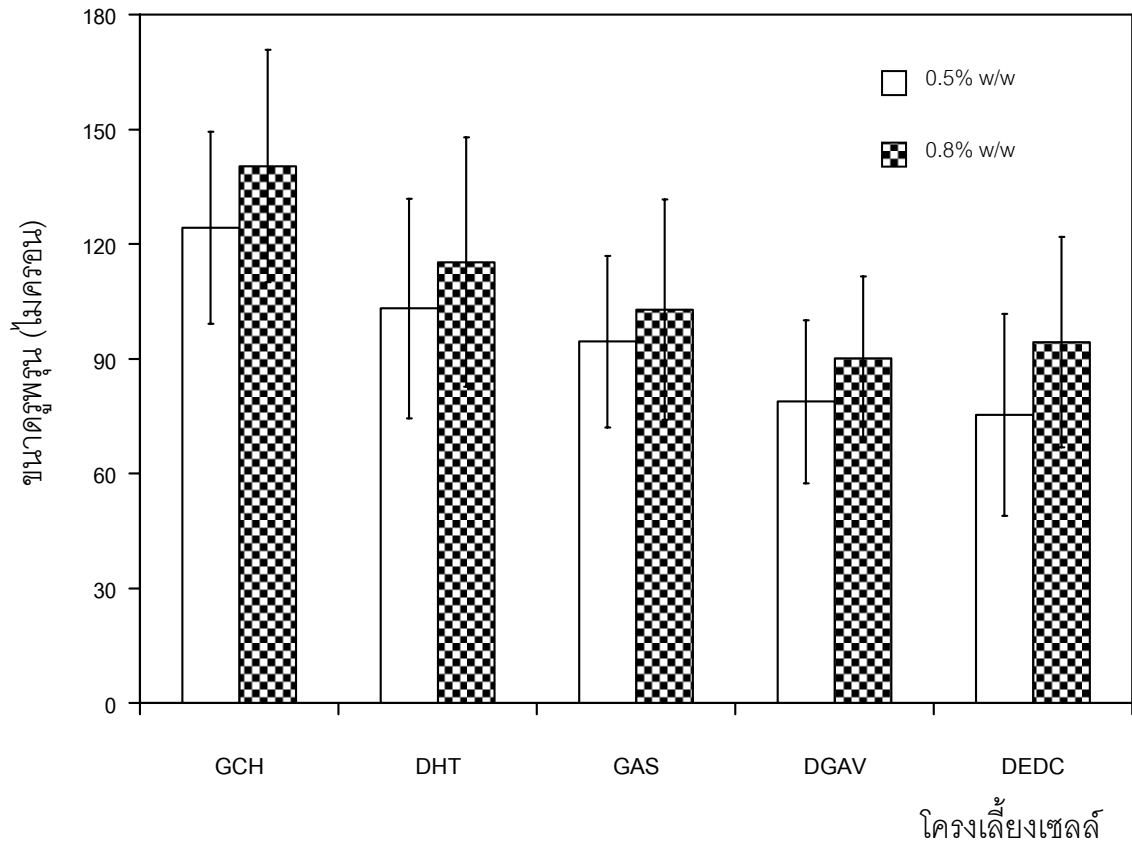
การศึกษาผลของการใช้ปริมาณของแข็งทั้งหมดในโครงเลี้ยงเซลล์ (ร้อยละ 0.5 และร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก)

แม้ว่าลักษณะพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ จะดูแตกต่างกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.16) ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแต่ละกระบวนการมีแนวโน้มสูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากค่าความผิดพลาด (error bar) ที่สูง และมีแนวโน้มว่าการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีทั้ง 3 แบบ มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าแบบ DHT เล็กน้อย โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ GA และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ EDC มีขนาดรูพรุนเล็กที่สุด เมื่อสังเกตด้วยตา เมื่อเปลี่ยนปริมาณเนื้อสารของแข็งทั้งหมดในโครงเลี้ยงเซลล์จากร้อยละ 0.5 เป็นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อขนาดรูพรุน (รูปที่ 4.17) ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ EDC มีน้ำหนักที่หายไปและการหดตัวสูงที่สุด ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียวมีค่าใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ (รูปที่ 4.18) การหดตัวและน้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นผลกระทบมาจากปฏิกิริยาการเชื่อมโยงพันธะที่เร็ว-ช้า และความเป็นเนื้อเดียวของการเกิดปฏิกิริยาทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันทำให้ปฏิกิริยาการเชื่อมโยงพันธะอาจเกิดขึ้นสมบูรณ์ไม่เท่ากัน โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ GA มีความเข้มข้นของ GA ต่ำมาก ส่วน EDC มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาซับซ้อนกว่า GA และโอกาสการเชื่อมโยงพันธะสำเร็จขึ้นกับ NHS ด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อการเชื่อมโยงพันธะ แม้ว่าวิธีการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ใน GA ต้องสัมผัสกับสารละลายซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบแต่กลับมีน้ำหนักที่หายไปและการหดตัวที่ต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ เนื่องจากการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่มีอัตราการเชื่อมโยงพันธะที่รวดเร็วมาก จึงมีการละลายของโครงเลี้ยงเซลล์ขณะเชื่อมโยงพันธะน้อยกว่าแบบอบไอ รวมทั้งการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าแบบแช่มาก แม้ว่าจะใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นเดียวกัน แต่การเชื่อมโยงพันธะแบบอบไออาศัยวิธีการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ไอพ่นกระจายภายในภาชนะปิดที่มีไอระเหยของ GA ดังนั้นปริมาตรของภาชนะมีส่วนที่สำคัญในการเชื่อมโยงพันธะ จึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบกับปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการอบไอ ส่วนกระบวนการเชื่อมโยงพันธะแบบ DHT เป็นกระบวนการเดียวที่ไม่มีการแช่น้ำ น้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์จึงต่ำ ดังนั้นน้ำหนักที่หายไปของกระบวนการนี้จึงเป็นน้ำหนักของน้ำในโครงสร้างที่หายไปจากการอบนั่นเอง (ประมาณ 5% ของน้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์) ในขณะที่ DGAV และ DEDC ได้ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนมาก่อน จึงทำให้มีน้ำหนักที่หายไปและการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์สูงกว่าการเชื่อมโยงพันธะแบบอื่นๆ



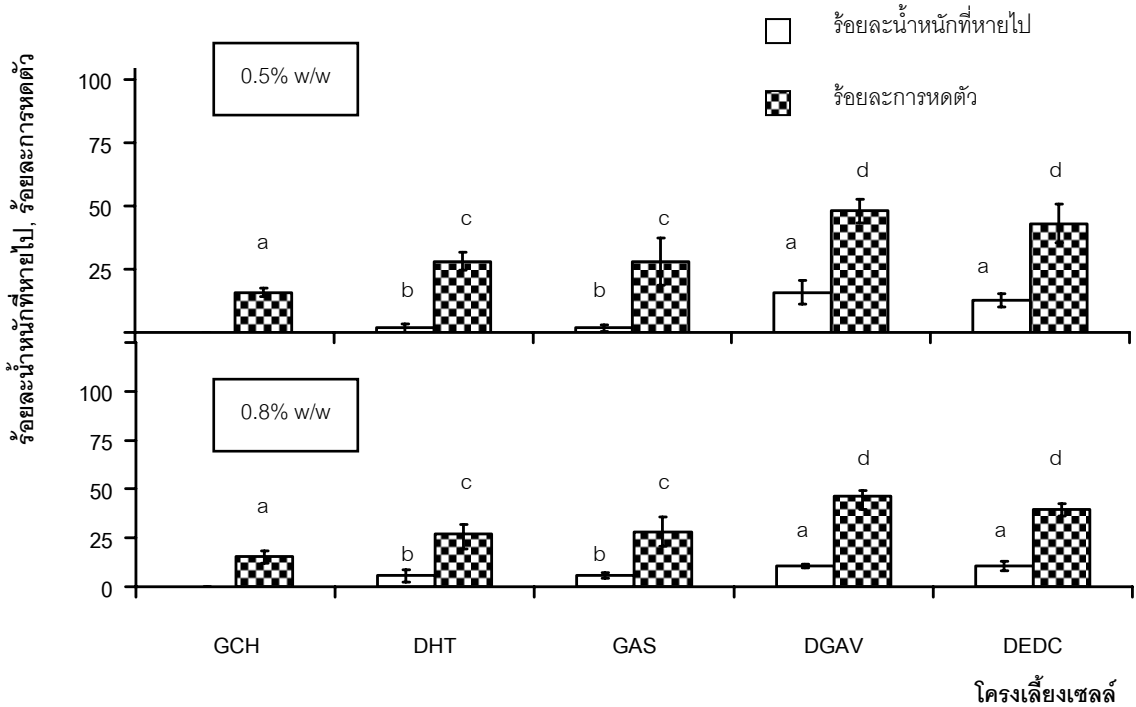
รูปที่ 4.16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน 70:30 ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้

หมายเหตุ GCH ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ, DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบโอ GA ที่สภาวะเดียวกับ GAS ความเข้มข้น 0.0047% เมื่ออบไอน้ำในภาชนะปิด, DEDC เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย EDC



รูปที่ 4.17 ขนาดสปอร์ของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC

a-e แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง GCH ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ, DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำที่สภาวะเดียวกับ GAS ความเข้มข้น 0.0047% เมื่ออบไอน้ำในภาชนะปิด, DEDC เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย EDC



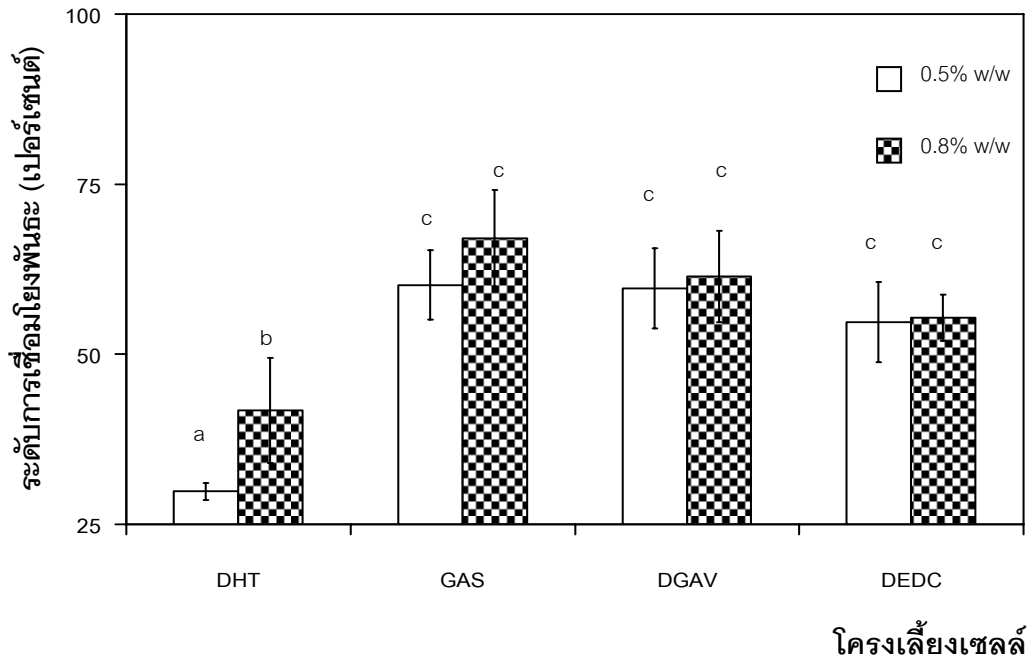
รูปที่ 4.18 ร้อยละน้ำหนักที่หายไปและร้อยละการดูดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC a-d แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05, หมายถึง GCH ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ, DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA ที่สภาวะเดียวกับ GAS ความเข้มข้น 0.0047% เมื่ออบไอน้ำในภาชนะปิด, DEDC เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย EDC

ระดับการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้สารเคมีทั้ง GA และ EDC (รูปที่ 4.19) สูงกว่าการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเพิ่มปริมาณของแข็งทั้งหมดในโครงเลี้ยงเซลล์จากร้อยละ 0.5 เป็นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ระดับการเชื่อมโยงพันธะมีแนวโน้มสูงขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเนื้อสารมีผลกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียวมากกว่าวิธีอื่นๆ เพราะโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้มีระดับการเชื่อมโยงพันธะที่ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ เมื่อพิจารณาความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียวมีความสามารถในการบวมน้ำสูงที่สุด ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อเพิ่มปริมาณของแข็งทั้งหมดในโครงเลี้ยงเซลล์จากร้อยละ 0.5 เป็นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.20)

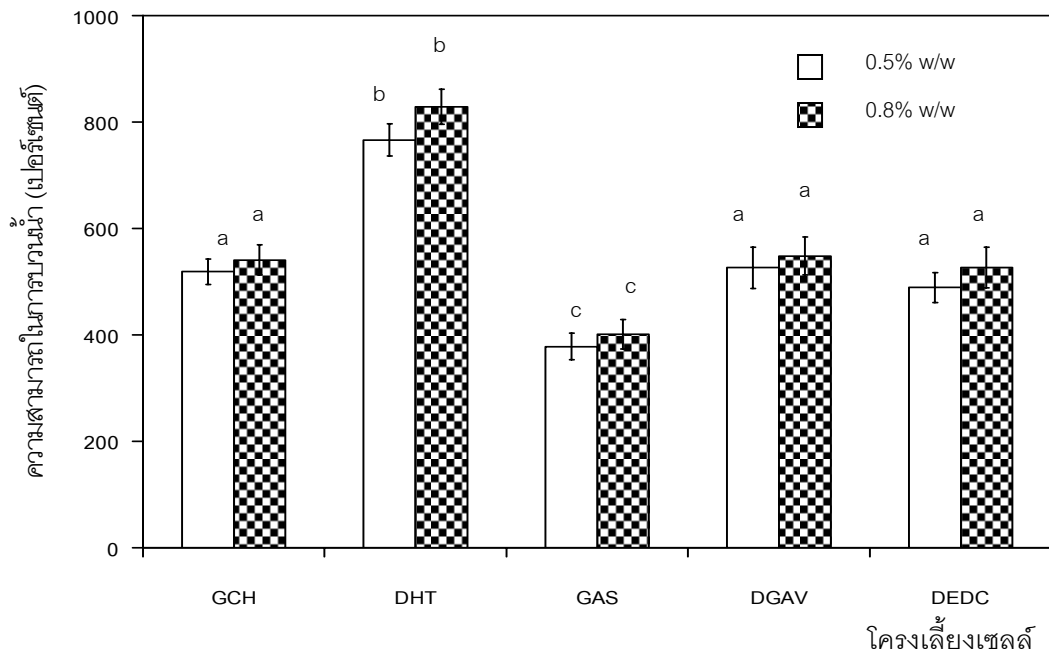
โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะมีความสามารถในการบวมน้ำต่ำ ซึ่งตรงข้ามกับเหตุผลที่ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ มีความยืดหยุ่น และสามารถดูดซับน้ำได้ทุกทิศทาง ดังนั้นควรมีความสามารถในการบวมน้ำที่สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ แต่

เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะมีเจลาตินเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ จึงมีเจลาตินบางส่วนได้ละลายหายไป ในกระบวนการทดสอบความสามารถในการบวมน้ำ จึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ มีความสามารถในการบวมน้ำที่น้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนมีขนาดรูพรุน, น้ำหนักที่หายไป และการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์หลังการเชื่อมโยงพันธะใกล้เคียงกันกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ แต่กลับมีระดับการเชื่อมโยงพันธะและความสามารถในการบวมน้ำแตกต่างกันมาก เนื่องมาจากการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนมีข้อจำกัดสามารถเชื่อมโยงพันธะหมู่เอมีน และหมู่คาร์บอกซิลิกที่อยู่ใกล้กันเท่านั้น [Ueda, H., และคณะ, 2003] แต่การเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีนั้นมีการพา GA ไปสู่หมู่เอมีนได้ทั่วถึงกว่า จึงทำให้มีระดับการเชื่อมโยงพันธะที่สูงกว่าการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน ซึ่งส่งผลกับค่าความสามารถในการบวมน้ำด้วย

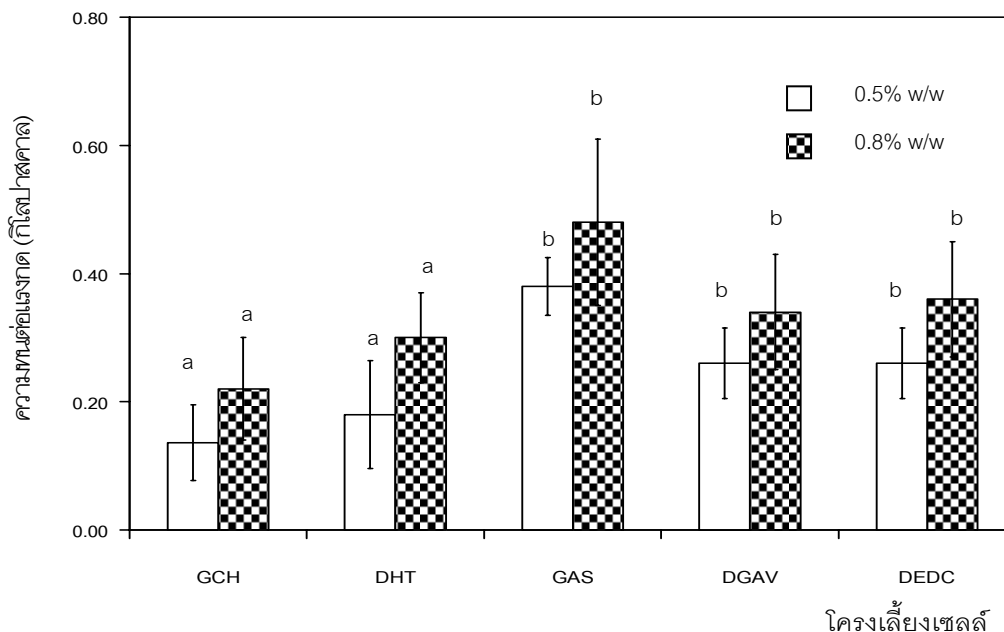
ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้สารเคมีสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียว และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.21) โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA มีความทนต่อแรงกดสูงสุด และเมื่อเพิ่มปริมาณของแข็งทั้งหมดในโครงเลี้ยงเซลล์จากร้อยละ 0.5 เป็นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบแช่ GA กับแบบใช้ DHT มีการหดตัวที่ใกล้เคียงกัน แต่โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA มีระดับการเชื่อมโยงพันธะที่สูงกว่ามากจึงทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่มีความทนต่อแรงกดเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอน้ำ GA ระดับการเชื่อมโยงพันธะมีค่าน้อยกว่าการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA จึงส่งผลให้มีความสามารถในการบวมน้ำที่สูงกว่าและมีความทนแรงกดที่ต่ำกว่า รวมทั้งโครงเลี้ยงเซลล์แบบอบไอน้ำมีน้ำหนักที่หายไปสูงทำให้มีความหนาแน่นต่ำในโครงเลี้ยงเซลล์ต่ำ จึงมีผลทำให้ความทนแรงกดต่ำด้วย และเมื่อทำการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ EDC พบว่ามีการหดตัวที่สูงกว่าการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA อาจเนื่องจาก EDC เชื่อมโยงพันธะแบบ zero-length และปฏิกิริยาที่ซับซ้อนมากกว่า GA รวมทั้งความสำเร็จของปฏิกิริยาการเชื่อมโยงพันธะขึ้นกับ NHS อีกด้วย จึงเกิดการเชื่อมโยงพันธะที่ช้ากว่า GA ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วย EDC มีการหดตัวสูง เนื่องจากน้ำหนักที่หายไปมากกว่า



รูปที่ 4.19 ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโครงเลี้ยงเซลล์ DHT, GAS, DGAV, และ DEDC a-c แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$



รูปที่ 4.20 ความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC a-c แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง DHT เชื่อมโยงพันธะแบบให้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ ที่สภาวะเดียวกับ GAS ความเข้มข้น 0.0047% เมื่ออบไอน้ำในภาชนะปิด, DEDC เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย EDC



รูปที่ 4.21 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC

a-b แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง GCH เชื่อมโยงพันธะ, DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแอสซาร์ละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DEDC คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแอสซาร์ละลาย EDC

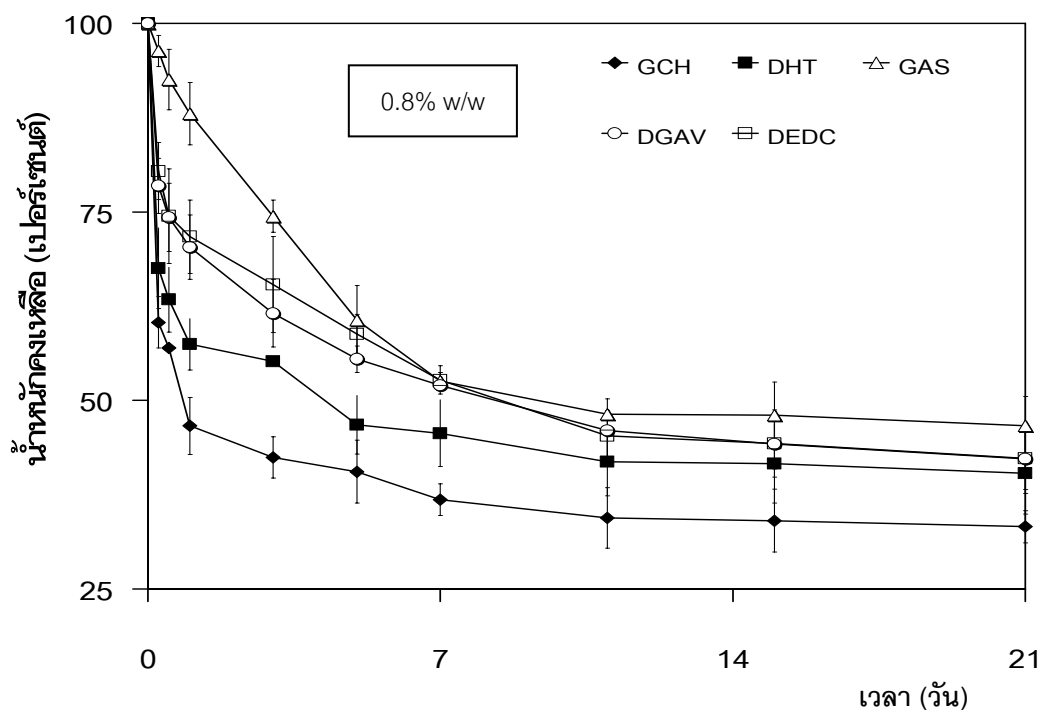
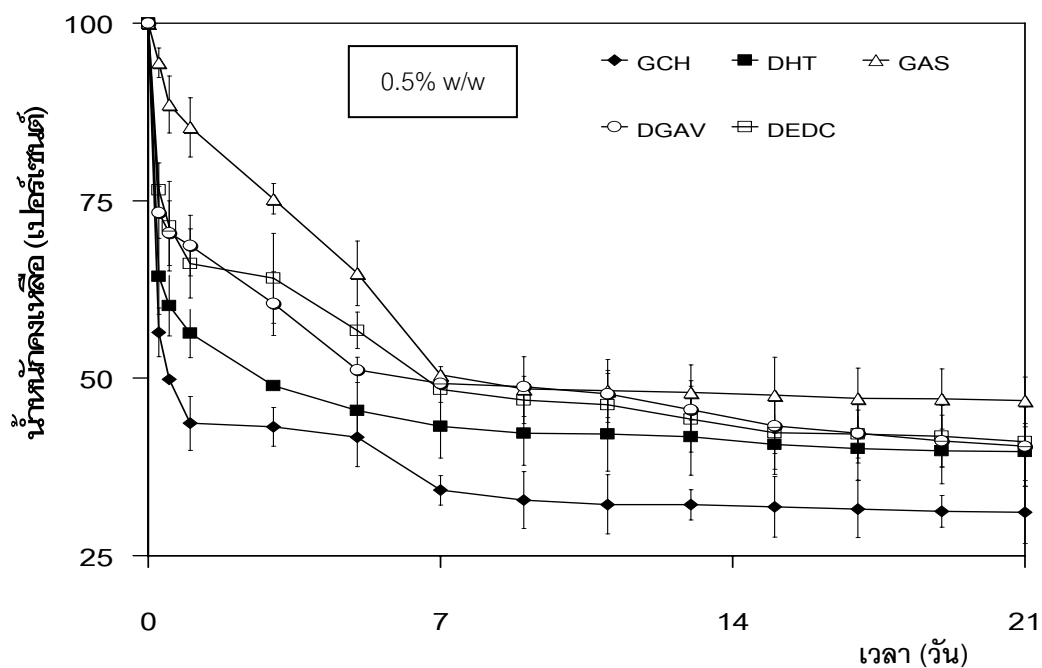
การทดสอบลักษณะสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ ที่ทำมี 2 แบบคือ การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*In vitro* biodegradation) และการทดสอบการเข้ากันได้กับเซลล์ L929 ภายนอกร่างกาย (*In vitro* biocompatibility)

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (1 มิลลิกรัม = 125 ยูนิต) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ เพื่อจำลองสภาวะของร่างกาย [Campbell, N.A. และคณะ, 1999, Tangsadthakun, C. และคณะ, 2005] เพื่อหาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในรูปร้อยละของน้ำหนักที่หายไปเทียบกับเวลา โดยที่น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ค่อยๆ ลดลงจนหมดเมื่อเวลาผ่านไปขณะอยู่ในเอนไซม์ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ รวมทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ ถูกนำมาศึกษาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4.22) ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 แบบนี้ มีน้ำหนักคงเหลือที่เกิดจากการย่อยสลายแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรก (0-7 วัน) เป็นช่วงที่มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์คอลลาจีเนส ซึ่งได้ย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ในส่วนที่เป็นเจลาตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของโครงเลี้ยงเซลล์ และช่วงที่ 2 (7-21 วัน) เป็นช่วงที่มีการย่อยสลายที่ช้าลงและค่อนข้างคงที่ เนื่องจากการย่อยสลายโครงเลี้ยงเซลล์ในช่วงนี้เจลาตินถูกย่อยสลายจนเกือบหมด เหลือเพียงไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบรอง ซึ่งเอนไซม์คอลลาจีเนสไม่สามารถย่อยสลายได้หมด จะเห็นได้ว่าอัตราการ

ย่อยสลายนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ประกอบเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ และกระบวนการเชื่อมโยงพันธะโดยการเชื่อมโยงพันธะแบบ GAS มีอัตราการย่อยสลายต่ำสุด ค่าครึ่งชีวิตของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.1 และเมื่อเพิ่มปริมาณของแข็งทั้งหมดในโครงเลี้ยงเซลล์เป็นร้อยละ 0.8 ลักษณะการย่อยสลายมีแนวโน้มแบบเดียวกันกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 แต่มีการย่อยสลายที่ช้ากว่าดังแสดงในรูป 4.22

การประมาณค่าครึ่งชีวิตของโครงเลี้ยงเซลล์คิดจากน้ำหนักคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ลดลงเหลือ 50% ของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด เมื่อทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยโครงเลี้ยงเซลล์แบบ GAS มีค่าครึ่งชีวิตสูงสุด (7.82 วัน) ใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบ DGAV และ DEDC แต่โครงเลี้ยงเซลล์แบบ DHT มีค่าครึ่งชีวิตต่ำสุด โดยทั่วไปค่าครึ่งชีวิตของโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นกับระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ [Ozeki, M., และคณะ, 2004] ทั้งนี้อาจมีผลจากปัจจัยอื่นๆได้อีก ได้แก่ พื้นที่ผิว (surface area) (มีผลมาจาก ขนาดรูพรุน ปริมาตร และรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์) และชนิดของเอนไซม์ และมีลักษณะเช่นเดียวกันกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก แตกต่างกันเพียงโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดมีค่าครึ่งชีวิตที่สูงกว่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับโครงเลี้ยงเซลล์ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆถูกนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 (mouse fibroblast) และวัดจำนวนเซลล์ที่เวลา 5, 24, และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.23) ซึ่งแสดงความเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังว่าสามารถส่งเสริมการเกาะติดและเจริญเติบโตของเซลล์ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์ L929 ที่ 5 ชั่วโมง จำนวนเซลล์สัมพัทธ์ในโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 14-26% และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตมีแนวโน้มสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยจำนวนเซลล์สัมพัทธ์มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 36-70% และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบ DHT มีแนวโน้มจำนวนเซลล์เกาะติดและเจริญเติบโตต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีทุกแบบ และเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตมีแนวโน้มสูงขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะจำนวนเซลล์สัมพัทธ์ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี GA และ EDC ซึ่งอยู่ในช่วง 156-185% โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ GA มีจำนวนเซลล์สัมพัทธ์ใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ EDC แต่ถ้าเลี้ยงเซลล์นานกว่า 72 ชั่วโมง คาดว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียวจำนวนเซลล์สัมพัทธ์น่าจะลดลง เนื่องจากการย่อยสลายเพราะเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีค่าครึ่งชีวิตต่ำที่สุด เมื่อเพิ่มปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก จำนวนเซลล์สัมพัทธ์ในโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดมีแนวโน้มแบบเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



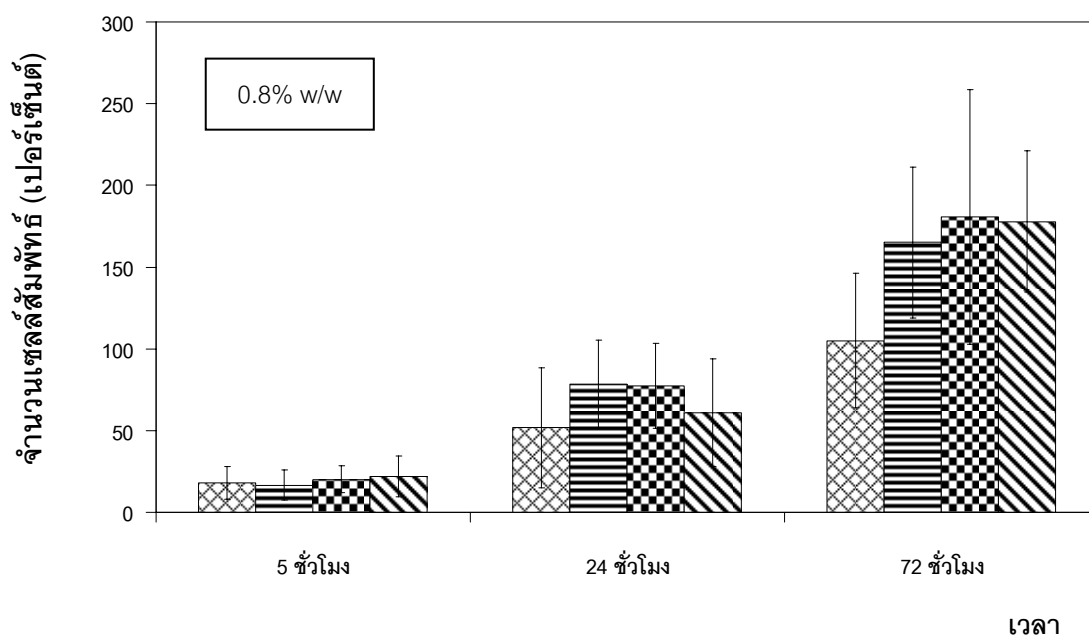
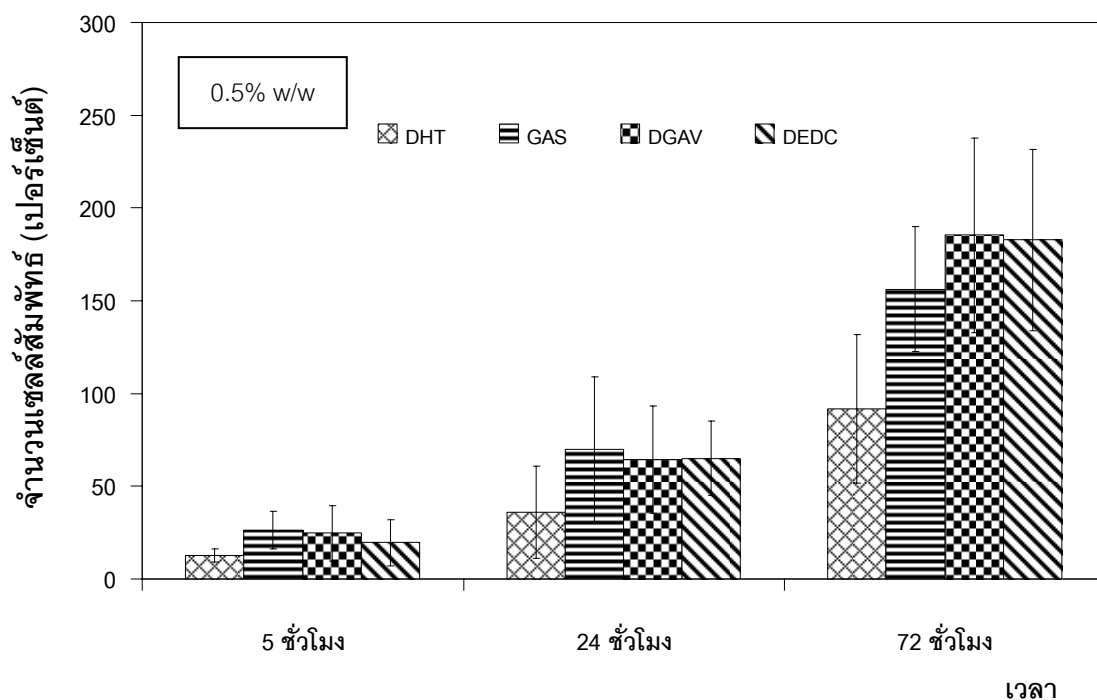
รูปที่ 4.22 การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโคซาน (70:30) ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% และ 0.8 % โดยน้ำหนัก

หมายเหตุ GCH เชื่อมโยงพันธะ, DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่สารละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA w/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA w/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DEDC คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย EDC

ตารางที่ 4.1 ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w และ 0.8% w/w

โครงเลี้ยงเซลล์	ครึ่งชีวิตของโครงเลี้ยงเซลล์ (วัน)	
	ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w	ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.8% w/w
GCH	0.49±0.01	0.84±0.11 d
DHT	2.61±0.37 a	4.21±0.29 e
GAS	7.82±0.08 b	9.59±0.81 f
DGAV	6.56±0.37 c	8.27±0.69 f
DEDC	6.65±0.32 c	8.53±0.59 f

a-f แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง GCH เชื่อมโยงพันธะ, DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแฮสสารละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA w/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอไบโอ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA w/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DEDC คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแฮสสารละลาย EDC



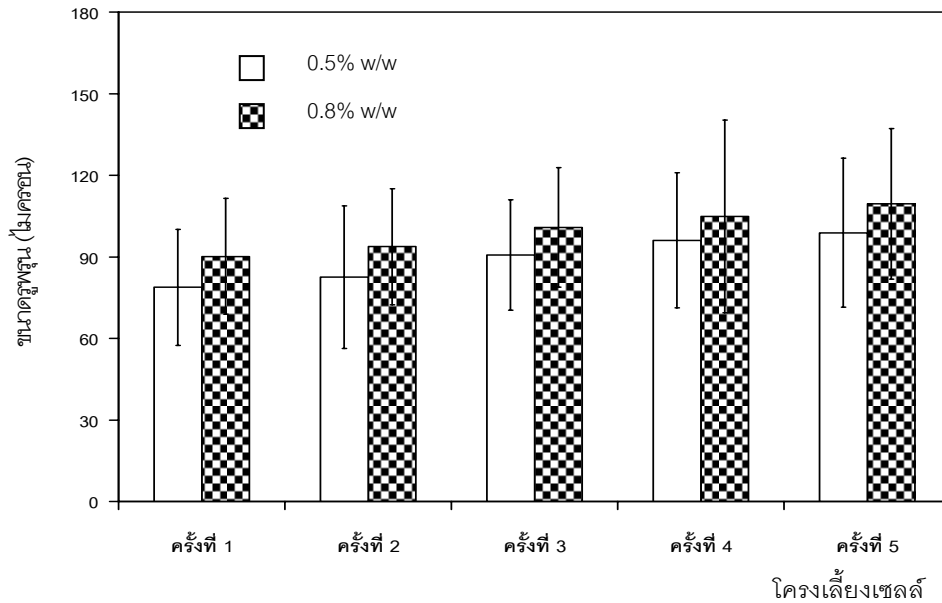
รูปที่ 4.23 จำนวนเซลล์สัมพัทธ์ในโครงเลี้ยงเซลล์ DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5%w/w และ 0.8%w/w โดยเฉพาะเซลล์จำนวน 20,000 เซลล์

a-g แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบเกี่ยวกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแอสารละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA w/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับออบไอ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DEDC เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแอสารละลาย EDC

4.3 ผลของการนำสารละลาย GA มาใช้ใหม่ในการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA

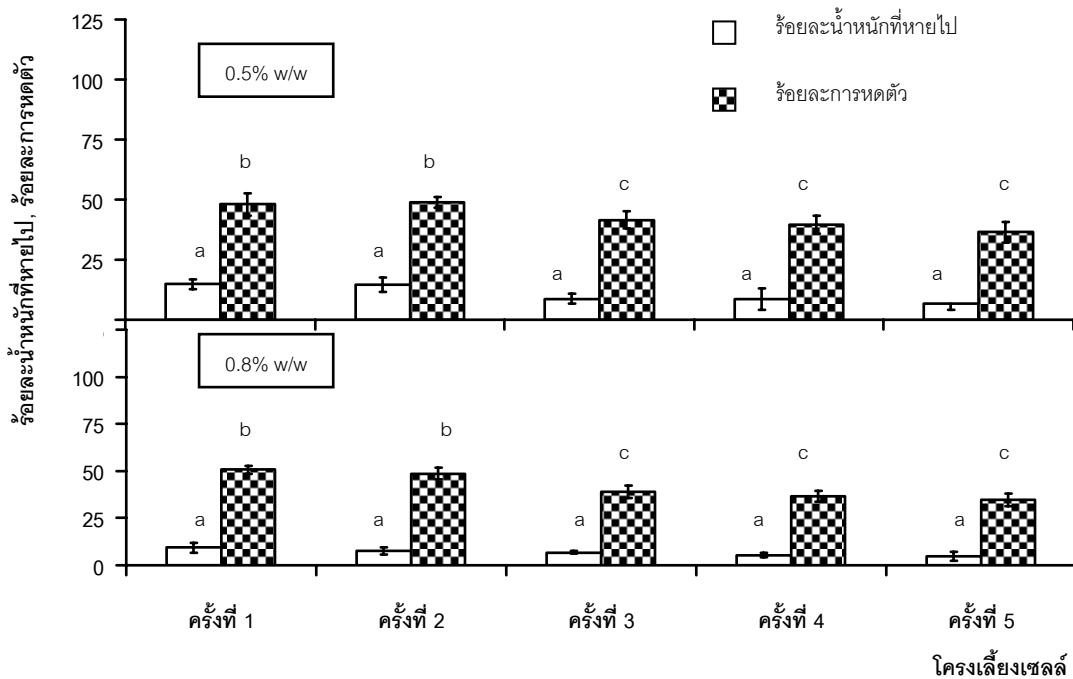
โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA มีลักษณะสมบัติทางกายภาพและลักษณะสมบัติทางเคมีเป็นที่น่าพอใจ เมื่อนำมาเทียบกับการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการอื่นๆ โดยเฉพาะการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่ในสารละลาย GA ดังนั้นจึงได้มีการทดสอบการเชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม การศึกษาผลของการใช้สารละลายซ้ำๆ ทำเพื่อลดปริมาณสารระเหย (อะซีโตน) ของระบบ โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและไคโตซานที่ขึ้นรูปด้วยความหนาแน่นร้อยละ 0.5 และ 0.8 โดยน้ำหนัก มาเชื่อมโยงพันธะแบบ DHT 24 ชั่วโมง แล้วอบไอน้ำ GA สารละลาย 0.06% (v/v) 100 มิลลิลิตร ในภาชนะที่มีปริมาตรรวม 1272 มิลลิลิตร ดังนั้นใช้ความเข้มข้น GA ในการอบไอน้ำ 0.0047 % v/v ต่อโครงเลี้ยงเซลล์น้ำหนัก 127 และ 220 มิลลิกรัม (20 ตัวอย่าง) ตามลำดับที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองเชื่อมโยงพันธะ 5 ครั้งซ้ำในสารละลายเดิม แล้วจึงศึกษาลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละครั้งหลังการอบไอน้ำ ขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อเชื่อมโยงพันธะซ้ำมากขึ้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.24) อยู่ในช่วง 78-98 ไมครอน น้ำหนักที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกตัวอย่าง แต่มีแนวโน้มว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเนื้อสาร 0.8% มีการสูญเสียน้ำหนักต่ำกว่าแบบ 0.5% คือประมาณ 5.5-6.0% (รูปที่ 4.25) ส่วนการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าใกล้เคียงกันใน 2 ครั้งแรก แต่พอเชื่อมโยงพันธะซ้ำในครั้งที่ 3, 4, และ 5 การหดตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทำการเปรียบเทียบการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ 0.5% กับ 0.8% โดยน้ำหนัก ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.25)

เมื่อพิจารณาระดับการเชื่อมโยงพันธะในรูปที่ 4.26 โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 และ 0.8 โดยน้ำหนักสามารถทำการเชื่อมโยงพันธะได้ 2 ครั้งแรกมีระดับการเชื่อมโยงพันธะใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความสามารถในการบวมตัวของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นกับจำนวนครั้งที่เชื่อมโยงพันธะอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.27) ซึ่งมีความสอดคล้องกับระดับการเชื่อมโยงพันธะมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก GA ที่ใช้ในการเชื่อมโยงพันธะมีปริมาณที่ลดลงในแต่ละครั้งที่เชื่อมโยงพันธะ และเมื่อเพิ่มปริมาณของแข็งในโครงเลี้ยงเซลล์จากร้อยละ 0.5 เป็นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ความสามารถในการบวมตัวมีแนวโน้มสูงขึ้นเช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความสามารถในการบวมตัวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 และ 0.8 โดยน้ำหนัก ทุกครั้งที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำ ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อเชื่อมโยงพันธะซ้ำมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.28) แต่มีแนวโน้มลดลงเมื่อเชื่อมโยงพันธะเป็นจำนวนครั้งที่มากขึ้น เนื่องจากระดับการเชื่อมโยงพันธะที่ลดลง



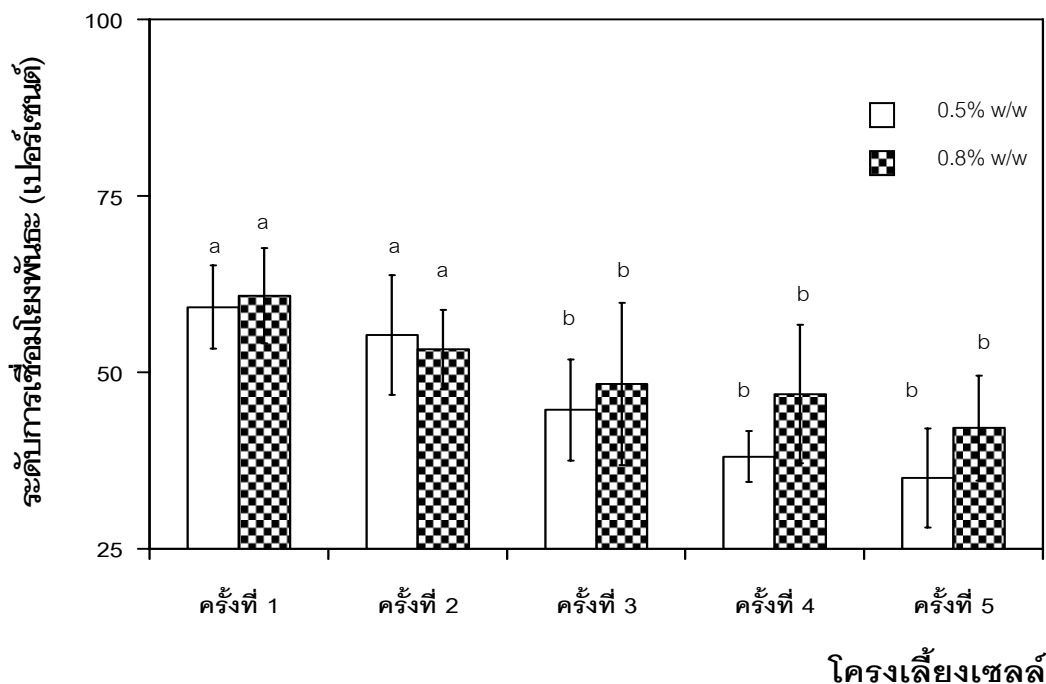
รูปที่ 4.24 ขนาดครุพูนของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม

a-g แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$



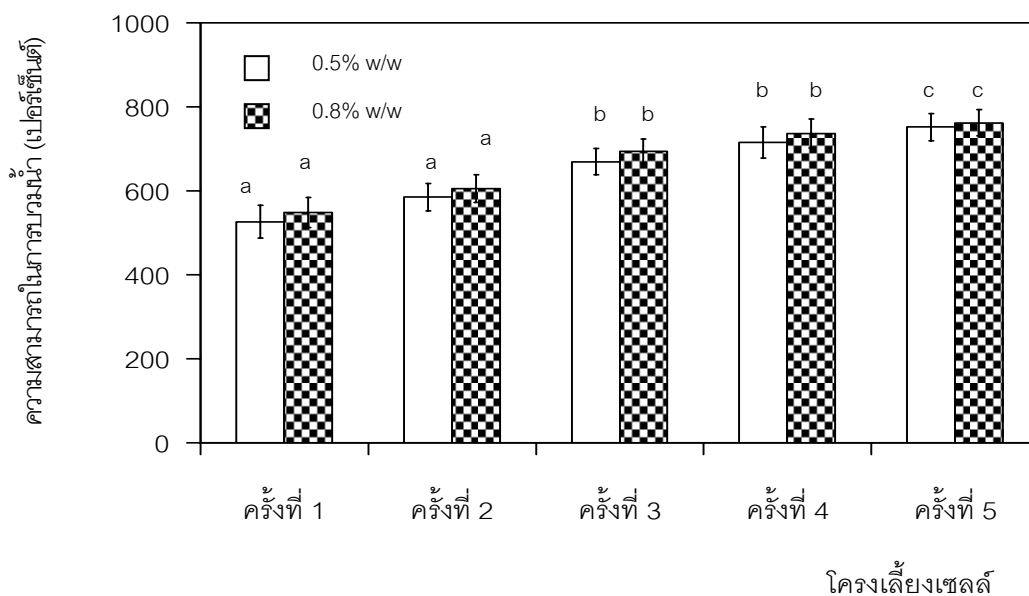
รูปที่ 4.25 ร้อยละน้ำหนักที่หายไปและร้อยละการหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม

a-c แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมงในสารละลายเดิม สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ 0.5% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 127 มิลลิกรัม ความเข้มข้น GA เริ่มต้น 0.0047% v/v ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ 0.8% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 202 มิลลิกรัม ความเข้มข้น GA เริ่มต้น 0.0047% v/v



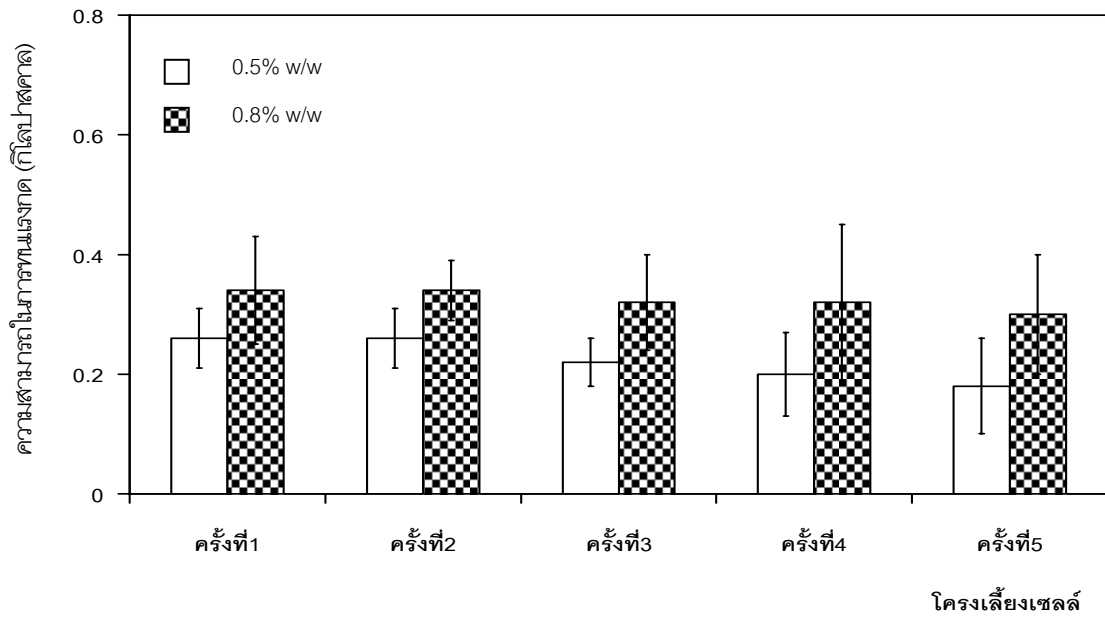
รูปที่ 4.26 ระดับการเชื่อมโยงพันธะและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโครมเล็งเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม

a-b แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครมเล็งเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$



รูปที่ 4.27 ความสามารถในการบวมน้ำของโครมเล็งเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม

a-c แสดงความแตกต่างอย่างเปรียบเทียบกับโครมเล็งเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายถึง DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมงในสารละลายเดิม สำหรับโครมเล็งเซลล์ 0.5% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 127 มิลลิกรัม ส่วนโครมเล็งเซลล์ 0.8% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 202 มิลลิกรัม



รูปที่ 4.28 ความทนต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม

a-c แสดงความแตกต่างเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w กับ 0.8% w/w ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$, หมายเหตุ DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA ที่ความเข้มข้น GA 0.06% v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง ในสารละลายเดิม สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ 0.5% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 127 มิลลิกรัม ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ 0.8% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 202 มิลลิกรัม

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เปรียบเทียบการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 และ 0.8 โดยน้ำหนัก 4 แบบ ได้แก่ การเชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน (DHT), การเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีกลูตารัลดีไฮด์ (GA) แบบแช่ (GAS) และแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอน้ำสารละลาย (DGAV), และการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC โดยใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย (DEDC) เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเหมาะสมในการทำงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งต้องมีขนาดรูพรุนประมาณ 70 ไมครอน ความทนต่อแรงกด 0.029 กิโลปาสคาล การย่อยสลาย 2-4 สัปดาห์ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ กระบวนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์มีผลต่อลักษณะสมบัติเหล่านี้ โดยจากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์นอกจากจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการทำแห้งแข็งแล้ว ยังขึ้นอยู่กับ การสูญเสีย น้ำหนัก, การหดตัว, และความเร็วของปฏิกิริยาเชื่อมโยงพันธะด้วย โดยโครงเลี้ยงเซลล์แบบ DHT และแบบ GAS มีการหดตัวน้อย ประมาณ 5% ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์แบบ DGAV และ DEDC มีการหดตัวมาก ประมาณ 40% ส่วนการย่อยสลายและความทนต่อแรงกดมีผลมาจากระดับการเชื่อมโยงพันธะ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ มีลักษณะสมบัติที่เหมาะสมในการทำงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อทั้งสิ้น

โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีมีลักษณะสมบัติที่ดีกว่าแบบ DHT หลายประการ ได้แก่ ระดับการเชื่อมโยงพันธะ ความทนต่อแรงกด และการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ แม้ว่าผลการทดสอบในเซลล์จะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากระยะเวลาในการทดสอบสั้น สำหรับการใช้งานจริงในร่างกายคาดว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบ DHT จะย่อยสลายไปอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส 32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนการใช้สารเคมีในการเชื่อมโยงพันธะพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบ DEDC มีลักษณะสมบัติใกล้เคียงกับแบบ DGAV และต่ำกว่าแบบ GAS

ในปัจจุบันมีการเชื่อมโยงพันธะด้วย GA เท่านั้นที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาจากประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ให้ใช้ทางการแพทย์ เราจึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการใช้ GA แบบอบไอน้ำเพื่อลดปัญหา ความเป็นพิษและการตกค้างของ GA เนื่องจากใช้งานปริมาณมาก, และการใช้ตัวทำละลายที่มากเกินไป ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานหลังผ่านกระบวนการเชื่อมโยง พันธะแบบแช่ GA และแบบอบไอน้ำ GA มีขนาดรูพรุน, ระดับการเชื่อมโยงพันธะ, และความทนต่อแรงกดใกล้เคียงกัน แต่โครงเลี้ยงเซลล์แบบ GAS มีค่าครึ่งชีวิตสูงกว่าแบบ DGAV นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์แบบ DGAV ได้ผ่านการทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี elution test ตามมาตรฐาน ISO 10993 ด้วย โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมโยงพันธะแบบแช่และแบบอบไอน้ำ GA คือ ใช้ความเข้มข้นของ GA 0.06% โดยปริมาตร อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด และใช้ความเข้มข้นของ GA 0.0047% โดยปริมาตร อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด ตามลำดับ การศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการทดสอบการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ GA กับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-โคโตซานในรายละเอียด

5.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ผลการวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงมีแนวทางปรับปรุงและศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

1. ควรทำการทดลองเพื่อคำนวณหา $GA:NH_2$ ให้ละเอียดขึ้น ในกระบวนการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ โดยการแปรผันปริมาณของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อหาปริมาณ GA ที่เหมาะสม ในการเชื่อมโยงพันธะกับหมู่เอมีนในโครงเลี้ยงเซลล์ และลองทำ scale up ให้ใหญ่ขึ้น เพื่อทดสอบหาปริมาณ GA ต่อหมู่เอมีนในโครงเลี้ยงเซลล์
2. ควรมีการหาปริมาณแอลดีไฮด์ที่ตกค้างหลังผ่านการเชื่อมโยงพันธะว่าเป็นไปตามทฤษฎีหรือไม่ ที่ $GA:NH_2$ เชื่อมโยงพันธะกันในอัตราส่วน 1:2
3. ทำการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอโดยไม่ผ่านกระบวนการ DHT เปรียบเทียบกับกระบวนการที่ผ่าน DHT
4. ทำการเชื่อมโยงพันธะแบบอบไอ EDC/NHS มาเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบอื่นๆด้วย

รายการอ้างอิง

- Adekogbe, I., Granam, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. Biomaterials 26 (2005): 7241-7250.
- Akkus, O., Belaney, R.M., Das, P. Free radical scavenging alleviates the biomechanical important of gamma radiation sterilized bone tissue. Journal of Orthopaedic Research 23 (2005): 838-845.
- Angele, P., Abke, J., Kujal, R., Faltermeier, H., Schumann, D., Nerlich, M., Kinner, B., Englert, C., Ruszezak, Z., Mehrl, R., Mueller, R. Biomaterials (2004): 2831-2841.
- Badylak, SF. Extracellular Matrix As a scaffold for tissue engineering in Verterinary Medicine: Applications to Soft Tissue Healing. Clin Tech Equine Pract 3 (2004): 173-181.
- Carnevali, S., Mio, T., Adachi, Y., Spurzem, J.R., Striz, I. Gamma radiation inhibits fibroblast-mediated collagen gel retraction. Tissue & cell 35 (2003): 459-469.
- Chau, D.Y.S., Colligan, R.J., Verderio, E.A.M., Addy, V.L., Griffin, M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. Biomaterials 26 (2005): 6518-6529.
- Christiaens, P., Vermeeren, V., Wenmackers, S., Daenen, M., Haenen, K., Nesladek, M., Vandeven, M., Ameloot, M., Michiels, L., Wagner, P. EDC-mediated DNA attachment to nanocrystalline CVD diamond films. Biosensors and Bioelectronics (2006).
- Figueiro, S.D., Goes, J.C., Moreira, R.A., Sombra, A.S.B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde cross-linked galactomannan-collagen films. Carbohydrate Polymers 56 (2004): 313-320.
- Figueiro, S.D., Macedo, A.A.M., Melo, M.R.S., Freitas, A.L.P., Morelra, R.A., Olivejra, R.S., Goes, J.C., Somboxa, A.S.B. On the dielectric behaviour of collagen-algal sulfated polysaccharide blends: Effect of glutaraldehyde cross-linking. Biophysical chemistry 120 (2006): 154-159.
- Gerrard, J.A., Sutton, K.H. Addition of transglutaminase to cereal products way generate the epitode responsible for celiac disease. Trends in food science & Technology 16 (2005): 510-512.
- Goissis, G., Yoshioka, SA., Braile, DM. and Ramirez, VDA. The chemical protecting Group concept Applied in Cross-linking of natural Tissues wiyh Glutaraldehyde Acetals. Artificial Organs 22 (1998): 210.

- Jones, I., Curie, L. and Martin, R. A guide to biological skin substitutes. British Journal of Plastic Surgery 55 (2002): 185-193.
- Kaminska, A., Sionkowska, A. Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen. Polymer Degradation and Stability 51 (1996): 19-26.
- Lee, CH., Singla, A. and Lee, Y. Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics 221 (2001): 1-22.
- Lee, C.R., Grodzinsky, A.J., Spector, M. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. Biomaterials 22 (2001): 3145-3154
- Lambardi, S.C., Merce, A.L.R. Properties of complexes of galactomannan of leucaena leucocephala and Al^{3+} , Cu^{2+} and Pb^{2+} . Bioresource Technology 89 (2003): 63-73.
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., Han, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineer. Biomaterials 24 (2003): 4833-4841.
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J. and Shen, J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials 25 (2004): 2997-3004.
- Ma, PX. Scaffolds for tissue fabrication. Materialstoday May (2004).
- Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. Carbohydrate Polymers 48 (2002): 61-72.
- Nagai, N., Yunoki, S.J., Suzuki, M., Salata, Tajima, K., and Munekata, M. Application of cross-linked salmon atelocollagen to the scaffold of human periodontal ligament cells. Bioscience and bioengineering. Vol.97.No.6 (2004): 389-394.
- Neto, C.G.T., Dantas, T.N.C., Fonseca, J.L.C., Pereira, M.R. Permeability studies in chitosan membranes. Effect of cross-linking and poly(ethylene oxide) addition. Carbohydrate Research 340 (2005): 2630-2636.
- Olde Damink, L.H.H., Dijkstra, P.J., Van Luyn, M.J.A. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water soluble carbodiimide. Biomaterials 17 (1996): 765-773.
- Ozeki, M., Tabata, Y. In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various cross-linking methods. Biomater. Sci 16 (2005): 549-561.

- Park, S.N., Lee, N.J., Lee, K.H., Suh, H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. Biomaterial 24 (2003): 1631-1641.
- Pieper, J.S., Oosterhof, A., Dijkstra, P.J., Veerkamp, T.H., Kupperelt, V. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. Biomaterial 20 (1999): 847-858.
- Pieper, J.S., Hafmans, T., Veerkamp, J.H., Van Kuppevelt, T.H. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS cross-linking, and ultrastructural aspects. Biomaterials 21 (2000): 581-593.
- Punakivi, K., Smolander, M., Mattinen, J., Buchert, J. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. Talanta 68 (2006): 1040-1045.
- Richard, F., Walin and Edward F., Arscott. A practical guide to ISO 10993. An MD&DI 1998 column.
- Ruiz, M., Sastre, A.M., Guibal, E. Palladium sorption on glutaraldehyde-crosslinked chitosan. Reactive & Functional Polymer 45 (2002):155-173.
- Sheu, MT., Huang, JC., Yeh, GC. And Ho, HO. Characterization of collagen gel solutions and matrices for cell culture. Biomaterials 22 (2001): 1713-1719.
- Torres, D.S., Freyman, T.M., Yannas, I.V., Spector, M. Tendon cell contraction of collagen-GAG matrices in vitro: Effect of cross-linking. Biomaterial 21 (2000): 1607-1619.
- Ueda, H., Nakamura, T., Yamamota, M., Nagata, N. Repairing of rabbit skull defect by dehydrothermally crosslinked collagen sponges incorporating transforming growth factor β 1. Journal of controlled Release 88 (2005): 256-274.
- U.S. Food and drug Administration, Department of Health and Human Services. (March 3, 2006).
- Wan Ngah, W.S., Fatinathan, S. Chitosan flasks and chitosan-GLA beads for adsorption of p-nitrophenol in aqueous solution. Colloids and Surface A: Physicochem. Eng. Aspects 277 (2006): 214-222.
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Fong, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H., Werf, M.V.D. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. Biomaterials 24 (2003): 3213-3220.

- Wisniak, M.J.B., Beernink, R., Peiper, J.S., Poot, A.A., Engbers, G.H.M., Beugeling, T., Van Aken, W.G., Feijen, J. Immobilization of heparin to EDC/NHS-cross-linked collagen. Characterization and in vitro evaluation. Biomaterials 22 (2001): 151-163.
- Wess, T.J., Orgel, J.P. Change in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. Thermochimica Acta 365 (2000): 119-128.
- Wu, G., Long, D., Chen, S., Yao, S. High efficient fabrication of chitosan micropowder by combination of gamma radiation and jet pulverization. Carbohydrate Polymers 60 (2005): 61-65.
- Yang, Y., Porte, M.C., Marmey, P., El Haj, A.J., Amede, J. Covalent bonding of collagen on poly(L-lactic acid) by gamma irradiation. Nuclear Instruments and methods in Physics Research B 207 (2003):165-174.
- Yannas, I.V., J.F. Burke, D.P. Orgill, and E.M. Skrabut. Regeneration of skin following closure of deep wounds with a biodegradable template. Trans. Soc. Biomater 5 (1982):24-27
- Young, S., Wong, M., Tabata, Y. and Mikos, AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. Journal of Controlled Release 109 (2005): 256-274.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์

ตารางที่ ก.1 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ขนาดรูพรุนเฉลี่ย ± SD (ไมโครเมตร)	น้ำหนักคงเหลือ ± SD (มิลลิกรัม)	ร้อยละน้ำหนัก ที่หายไป ± SD	ปริมาตรคงเหลือ ± SD (มิลลิลิตร)	ร้อยละ การหดตัว ± SD	ความหนาแน่น (มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) ± SD
4 องศาเซลเซียส						
GAS	94.50±22.42	6.34±0.18 a	1.86±1.31 a	0.72±0.09 a	27.98±9.25 a	8.94±1.33 a
DGAV6	86.50±27.93	5.66±0.17 b	12.33±3.74 b	0.55±0.02 b	45.39±2.08 b	10.37±0.38 a
DGAV12	84.17±21.38	5.54±0.11 b	14.18±3.50 b	0.54±0.02 b	45.85±2.18 b	10.24±0.37 a
DGAV24	78.75±21.39	5.50±0.10 b	14.83±2.09 b	0.52±0.05 b	48.08±4.67 b	10.66±0.95 a
DGAV48	75.92±24.34	5.48±0.08 b	15.15±1.69 b	0.44±0.02 c	56.05±2.41 c	12.50±0.71 b
25 องศาเซลเซียส						
GAS	88.26±27.84 a	6.26±0.05 a	3.04±2.99 a	0.60±0.05 a	40.37±5.19 a	10.56±0.93 a
DGAV6	84.23±24.06 a	5.38±0.08 b	16.68±2.44 b	0.27±0.02 b	73.35±2.20 b	20.30±1.71 b
DGAV12	77.72±29.22 a	5.38±0.13 b	16.66±3.51 b	0.25±0.03 b	74.71±2.63 b	21.43±1.94 b
DGAV24	74.32±25.66 a	5.30±0.10 b	17.90±3.14 b	0.24±0.01 b	75.80±1.08 b	21.95±1.39 b
DGAV48	26.53±20.07 b	5.24±0.15 b	18.86±2.68 b	0.23±0.03 b	77.46±2.55 b	23.49±2.82 b

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

หมายเหตุ GAS คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแซนในสารละลาย GA, DGAV6, DGAV12, DGAV24, DGAV48 คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับบอโรสารละลาย GA ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ ก.2 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้น GA 0.06% v/v ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ (ต่อ)

ตัวอย่าง	ขนาดรูพรุนเฉลี่ย ± SD (ไมโครเมตร)	น้ำหนักคงเหลือ ± SD (มิลลิกรัม)	ร้อยละน้ำหนัก ที่หายไป ± SD	ปริมาตรคงเหลือ ± SD (มิลลิลิตร)	ร้อยละ การหดตัว ± SD	ความหนาแน่น (มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) ± SD
37 องศาเซลเซียส						
GAS	84.45±28.29 a	6.24±0.05 a	3.35±2.87 a	0.55±0.08 a	45.42±8.40 a	11.67±1.95 a
DGAV6	82.63±23.98 a	5.32±0.11 b	17.62±2.25 b	0.25±0.03 b	74.88±3.33 b	21.46±2.65 b
DGAV12	81.08±27.72 a	5.28±0.11 b	18.23±2.58 b	0.20±0.02 c	79.55±1.67 b c	26.00±2.75 c
DGAV24	55.48±26.03 a	5.24±0.23 b	18.84±4.33 b	0.19±0.02 c	80.64±1.80 c	27.33±3.65 c
DGAV48	22.34±18.94 b	5.04±0.18 b	21.91±4.21 b	0.18±0.02 c	81.61±2.20 c	27.65±2.53 c

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

หมายเหตุ GAS คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบแซในสารละลาย GA, DGAV6, DGAV12, DGAV24, DGAV48 คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ ก.3 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS, DGAV ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ GA ที่ใช้	ขนาดรูพรุนเฉลี่ย ± SD (ไมโครเมตร)	น้ำหนักคงเหลือ ± SD (มิลลิกรัม)	ร้อยละน้ำหนักที่หายไป ± SD	ปริมาตรคงเหลือ ± SD (มิลลิลิตร)	ร้อยละการหดตัว ± SD	ความหนาแน่น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ± SD
GAS						
0.030%GA	87.67±26.80	6.40±0.07 a	0.90±0.34 a	0.74±0.05 a	25.54±4.98 a	8.63±0.62 a
0.060%GA	94.50±22.42	6.34±0.18 a b	1.86±1.31 a b	0.72±0.09 a	27.98±9.25 a	8.94±1.33 a
0.085%GA	100.25±24.58	6.30±0.10 a b	2.42±1.46 a b	0.65±0.05 b	35.46±4.62 a b	9.80±0.71 b
0.120%GA	105.83±23.83	6.18±0.13 b	4.31±1.96 b	0.57±0.04 c	42.62±3.99 b	10.82±0.84 c
DGAV						
0.030%GA	75.42±21.78	5.66±0.11 a	12.34±2.88 a	0.59±0.03 a	40.99±3.35 a	9.62±0.59 a
0.060%GA	78.75±21.39	5.50±0.10 a b	14.83±2.09 a	0.52±0.05 a	48.08±4.67 a b	10.66±0.95 a b
0.085%GA	84.92±26.92	5.32±0.15 a b	17.60±3.38 b	0.44±0.03 b	56.26±3.49 b c	12.22±0.91 b
0.120%GA	89.12±27.84	5.18±0.16 b	19.75±3.84 b	0.40±0.05 b	60.33±5.03 c	13.28±2.23 b

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

หมายเหตุ GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแซนในสารละลาย GA, DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA

ตารางที่ ก.4 ขนาดรูปวง, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV, และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 0.5 และร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

ตัวอย่าง	ขนาดรูปวงเฉลี่ย ± SD (ไมโครเมตร)	น้ำหนักคงเหลือ ± SD (มิลลิกรัม)	ร้อยละน้ำหนัก ที่หายไป ± SD	ปริมาตรคงเหลือ ± SD (มิลลิลิตร)	ร้อยละ การหดตัว ± SD	ความหนาแน่น (มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) ± SD
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w						
GCH	124.17±25.10	6.46±0.15 *	0.00±0.00	0.84±0.02 *	15.81±1.68 *	7.67±0.15 *
DHT	103.15±28.72	6.34±0.17 *	1.85±1.68 *	0.72±0.04 *	28.17±3.57 *	8.84±0.39 *
GAS	94.50±22.42	6.34±0.18 *	1.86±1.31 *	0.72±0.09 *	27.98±9.25 *	8.94±1.33 *
DGAV	78.75±21.39	5.44±0.27	15.75±4.74	0.52±0.05	48.08±4.67	10.57±1.32
DEDC	75.33±26.47	5.64±0.15	12.67±2.56	0.57±0.08	43.08±7.78	10.04±1.19
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.8% w/w						
GCH	140.37±30.36	10.68±0.13 *	0.00±0.00	0.85±0.03 *	15.24±3.16 *	12.61±0.33 *
DHT	115.28±32.66	10.08±0.26 *	5.60±3.13 *	0.73±0.05 *	27.09±4.91 *	13.88±1.15 *
GAS	102.87±28.77	10.08±0.19 *	5.62±1.48 *	0.72±0.08 *	27.84±7.99 *	14.11±1.60 *
DGAV	90.17±21.39	9.54±0.17	10.67±1.06	0.54±0.03	46.16±3.17	17.76±0.99
DEDC	94.33±27.43	9.56±0.17	10.47±2.32	0.61±0.03 *	39.40±3.27	15.81±0.91

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ DGAV ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

หมายเหตุ GCH ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ, DHT เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อน, GAS เชื่อมโยงพันธะแบบแช่ GA ที่ความเข้มข้น 0.06% GA v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, DGAV แบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA ที่สภาวะเดียวกับ GAS ความเข้มข้น 0.0047% เมื่ออบไอในภาชนะปิด, DEDC เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับแช่สารละลาย EDC

ตารางที่ ก.5 ขนาดรูพรุน, น้ำหนักคงเหลือ, ร้อยละน้ำหนักที่หายไป, ปริมาตรคงเหลือ, ร้อยละการหดตัว, และความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิมของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV

ตัวอย่าง	ขนาดรูพรุนเฉลี่ย ± SD (ไมโครเมตร)	น้ำหนักคงเหลือ ± SD (มิลลิกรัม)	ร้อยละน้ำหนัก ที่หายไป ± SD	ปริมาตรคงเหลือ ± SD (มิลลิลิตร)	ร้อยละ การหดตัว ± SD	ความหนาแน่น (มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) ± SD
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w						
ครั้งที่ 1	78.75±21.39	5.50±0.10 a	14.83±2.09 a	0.52±0.05 a	48.08±4.67 a	11.29±0.59 a
ครั้งที่ 2	82.50±26.18	5.52±0.18 a	14.53±2.92 a	0.51±0.02 a	48.94±2.34 a	10.83±0.69 a b
ครั้งที่ 3	90.65±20.28	5.90±0.16 b	8.66±1.99 b	0.58±0.04 a b	41.56±3.59 b	10.13±0.67 a b
ครั้งที่ 4	96.08±24.84	5.90±0.16 b	8.61±4.33 b	0.61±0.04 a b	39.44±3.71 b	9.77±0.66 a b
ครั้งที่ 5	98.84±27.43	6.02±0.13 b	6.78±2.67 b	0.63±0.04 b	36.50±4.32 b	9.51±0.63 b
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.8% w/w						
ครั้งที่ 1	90.17±21.39	9.68±0.16 a	9.34±2.47 a	0.49±0.02 a	50.62±2.22 a	19.63±0.70 a
ครั้งที่ 2	93.70±21.38	9.88±0.13 a b	7.48±1.92 a b	0.51±0.03 a	48.55±3.04 a	19.26±1.32 a
ครั้งที่ 3	100.74±21.94	9.96±0.17 a b	6.74±0.79 b	0.61±0.03 b	39.16±3.28 b	16.42±1.15 b
ครั้งที่ 4	104.91±35.44	10.10±0.19 b	5.43±1.23 b	0.63±0.03 b	36.79±2.88 b	16.00±0.80 b
ครั้งที่ 5	109.50±27.73	10.16±0.19 b	4.85±2.49 b	0.65±0.03 b	34.70±3.23 b	15.59±0.74 b

a-c แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิมที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

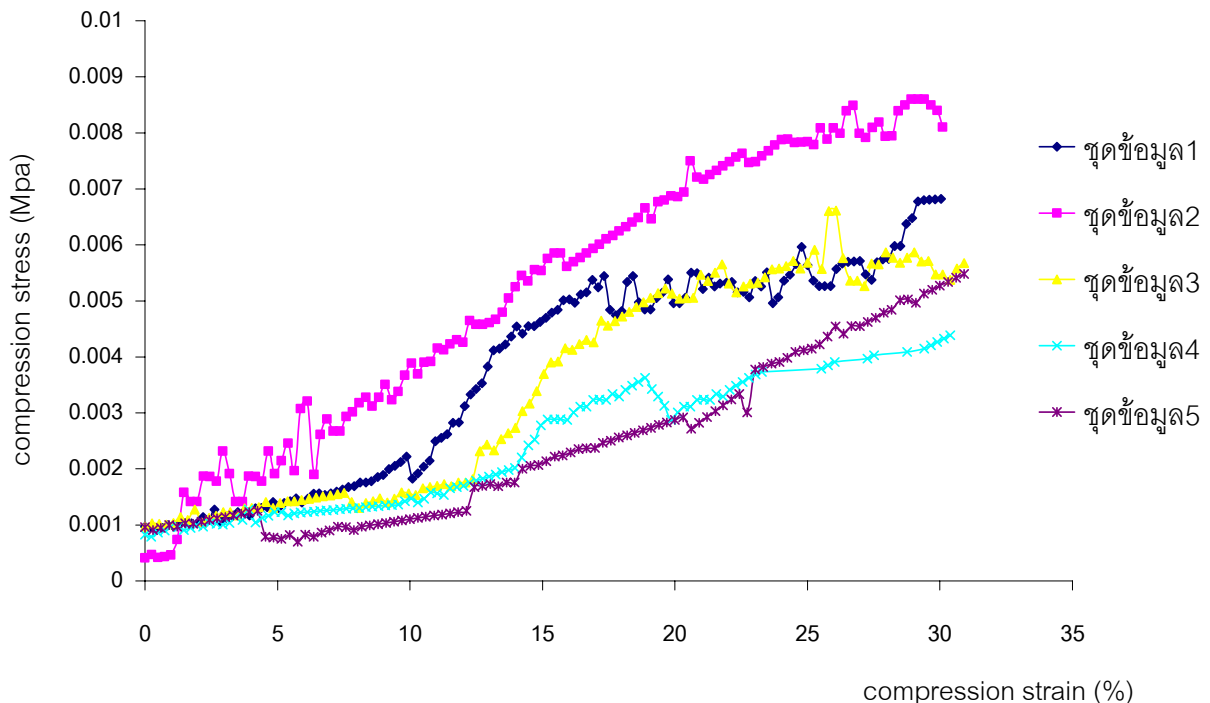
หมายเหตุ DGAV เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอ GA ที่ความเข้มข้น GA 0.06% v/v อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 5 ครั้งในสารละลายเดิม สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ 0.5% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 127 มิลลิกรัม ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ 0.8% w/w เชื่อมโยงพันธะครั้งละ 202 มิลลิกรัม

ภาคผนวก ข การหาค่าความทนต่อแรงกด

การหาค่าความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแบบต่างๆ สามารถหาได้จากค่าความชัน (Compressive modulus) ที่ constant tensile deformation rate 0.5 มิลลิเมตร/นาที่ ในสภาพแห้งที่ 25 องศาเซลเซียส จากสูตร

$$\text{Compressive modulus} = \frac{\text{stress}(kPa)}{\text{strain}(\%)} \times 100$$

การวิเคราะห์ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ทำโดยการหาค่าความชัน (Compressive modulus) ในตอนเริ่มต้นจากกราฟที่ถูก plot ระหว่าง strain (%) และ stress (kPa) โดยเลือกค่า strain (%) ที่ 5 ถึง 20 จากข้อมูล ซึ่งจะได้ค่า Young Modulus = 0.26 kPa เป็นค่าแสดงความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA แสดงดังรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 กราฟแสดงค่า Young Modulus ซึ่งหาได้จากค่าความชันระหว่าง stress กับ strain ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ ข-1 ตัวอย่าง compression stress-strain ของโครงเหล็กเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะแบบใช้ความร้อนร่วมกับอบไอสารละลาย GA ที่ความเข้มข้น 0.06%GA อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

compression stress (Mpa)					Compression strain (%)				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0.000965	0.000409	0.000965	0.000824	0.000961	0	0	0	0	0
0.000961	0.000466	0.001028	0.000788	0.000909	0.215695	0.247374	0.271313	0.242647	0.301948
0.000909	0.000418	0.00102	0.000862	0.000947	0.439849	0.48687	0.53917	0.490021	0.605844
0.000947	0.000433	0.001007	0.000904	0.001	0.658364	0.740546	0.803571	0.735819	0.90974
0.001	0.000462	0.001032	0.000965	0.000965	0.87406	0.981617	1.080069	0.980042	1.211688
0.000965	0.000737	0.001141	0.000961	0.001028	1.096804	1.222689	1.346197	1.22584	1.517532
0.001028	0.001575	0.001084	0.000909	0.00102	1.313909	1.473214	1.60887	1.468487	1.815584
0.001032	0.001412	0.001274	0.000947	0.00106	1.536653	1.719012	1.881912	1.720587	2.127272
0.001031	0.001414	0.00104	0.001	0.001087	1.753759	1.961659	2.151497	1.960083	2.425323
0.001032	0.001868	0.001125	0.000965	0.001115	1.969454	2.205881	2.421082	2.20273	2.723375
0.001141	0.001858	0.001165	0.001028	0.001143	2.195018	2.448528	2.687211	2.453255	3.035064
0.001084	0.001778	0.001229	0.00102	0.00117	2.414942	2.699053	2.955068	2.700629	3.338959
0.001274	0.002314	0.001228	0.001007	0.001198	2.627818	2.944852	3.228109	2.938549	3.637011
0.00104	0.001913	0.001169	0.001032	0.001225	2.851972	3.182772	3.497694	3.185923	3.938959
0.001125	0.001412	0.001293	0.001141	0.001253	3.070487	3.434872	3.760367	3.431721	4.242855
0.001165	0.001414	0.001302	0.001084	0.000791	3.287592	3.679095	4.035136	3.675944	4.546751
0.001229	0.001868	0.00132	0.001274	0.000773	3.507517	3.918591	4.302993	3.921742	4.850647
0.001228	0.001858	0.001406	0.00104	0.000756	3.726032	4.16754	4.567394	4.162813	5.148699
0.001169	0.001778	0.001303	0.001125	0.000819	3.950186	4.413338	4.840435	4.41649	5.460387
0.001293	0.002314	0.001394	0.001165	0.000703	4.165882	4.659136	5.106565	4.657561	5.760387
0.001302	0.001913	0.00142	0.001229	0.000824	4.382987	4.901784	5.379606	4.898632	6.05649
0.00132	0.002142	0.001423	0.001228	0.000788	4.607141	5.144431	5.645735	5.149157	6.366231
0.001406	0.002458	0.001444	0.001169	0.000862	4.827065	5.396531	5.910135	5.396531	6.670127
0.001303	0.001969	0.001465	0.00121	0.000904	5.041351	5.640754	6.186633	5.636027	6.970127
0.001394	0.003072	0.001487	0.001219	0.000965	5.262685	5.880249	6.456218	5.880249	7.274022
0.00142	0.003213	0.001508	0.001229	0.000961	5.48261	6.129199	6.717162	6.126048	7.574022
0.001476	0.001902	0.001529	0.001239	0.000909	5.699715	6.373421	6.990204	6.373421	7.881814
0.001403	0.002611	0.001551	0.001248	0.000972	5.92105	6.616068	7.259789	6.619219	8.18571
0.001465	0.00289	0.001572	0.001258	0.000993	6.138155	6.863442	7.525918	6.858715	8.481814
0.001558	0.00267	0.001406	0.001267	0.001015	6.362309	7.107665	7.797231	7.112391	8.793502
0.001566	0.002677	0.001303	0.001277	0.001036	6.578005	7.356614	8.06336	7.353463	9.093502
0.001535	0.002937	0.001394	0.001287	0.001058	6.7937	7.597685	8.33813	7.594534	9.391554
0.001565	0.003018	0.00142	0.001296	0.00108	7.019264	7.840332	8.60253	7.845059	9.699347
0.001597	0.003181	0.001476	0.001306	0.001101	7.239189	8.092433	8.866931	8.090858	10.00324
0.001629	0.003274	0.001403	0.001316	0.001123	7.453474	8.338231	9.143429	8.333504	10.30519

0.001673	0.00312	0.001465	0.001325	0.001144	7.674809	8.576152	9.413014	8.577727	10.60519
0.00169	0.003273	0.001578	0.001335	0.001166	7.893323	8.825101	9.675687	8.820374	10.90714
0.001759	0.00351	0.001566	0.001344	0.001187	8.113248	9.069324	9.945271	9.0709	11.21688
0.001759	0.003234	0.001535	0.001354	0.001209	8.333173	9.313545	10.21486	9.315122	11.51883
0.001782	0.003381	0.001655	0.001364	0.001231	8.548868	9.56092	10.48271	9.554618	11.81493
0.001851	0.003673	0.001672	0.00142	0.001252	8.775842	9.801991	10.75403	9.806718	12.12467
0.001894	0.003887	0.001695	0.001476	0.001672	8.991537	10.05409	11.01843	10.05094	12.42662
0.001994	0.003691	0.001728	0.001403	0.001695	9.205823	10.29516	11.29665	10.29044	12.72662
0.002057	0.0039	0.00169	0.001465	0.001728	9.429976	10.53623	11.55933	10.53938	13.03246
0.002119	0.003914	0.001759	0.001578	0.00169	9.6499	10.78833	11.82373	10.78518	13.33246
0.002218	0.004158	0.001759	0.001566	0.001759	9.867006	11.03413	12.10022	11.03098	13.64025
0.001822	0.004122	0.001814	0.001535	0.001759	10.08552	11.27363	12.36981	11.27363	13.94025
0.001923	0.004228	0.002318	0.001655	0.002003	10.30545	11.51943	12.63248	11.51628	14.24025
0.002037	0.004306	0.002433	0.001672	0.002058	10.52678	11.76522	12.90207	11.76838	14.54999
0.002143	0.004262	0.002331	0.001695	0.002071	10.74671	12.00945	13.17165	12.01417	14.85389
0.002494	0.004643	0.002533	0.001746	0.002133	10.9624	12.25682	13.44124	12.2521	15.14804
0.002556	0.00458	0.002635	0.001785	0.002218	11.18796	12.49789	13.71082	12.50104	15.45584
0.002619	0.004583	0.002732	0.001824	0.00224	11.40366	12.74999	13.97522	12.74684	15.76168
0.002825	0.004609	0.003034	0.001863	0.002297	11.61936	12.99107	14.25345	12.98791	16.05973
0.002833	0.004672	0.003167	0.001902	0.002354	11.8421	13.23214	14.51785	13.23529	16.36558
0.003122	0.004792	0.003389	0.001941	0.00237	12.06202	13.48266	14.78052	13.47793	16.66558
0.003325	0.005048	0.003691	0.00198	0.002378	12.28054	13.73004	15.05529	13.72846	16.97532
0.003425	0.005249	0.0039	0.002019	0.002465	12.49764	13.97111	15.3266	13.96953	17.27337
0.003526	0.005451	0.003914	0.002206	0.0025	12.71616	14.21533	15.59101	14.21218	17.57142
0.003827	0.005351	0.004158	0.002421	0.002562	12.94031	14.45955	15.85886	14.46428	17.88506
0.004118	0.005553	0.004122	0.002521	0.0026	13.16024	14.70693	16.12845	14.71008	18.18895
0.004149	0.00554	0.004228	0.002778	0.002645	13.37311	14.95272	16.39976	14.948	18.48311
0.00422	0.005755	0.004306	0.002883	0.002691	13.59868	15.19222	16.66935	15.19695	18.78895
0.004365	0.005855	0.004262	0.002884	0.002736	13.81719	15.4459	16.93202	15.44275	19.09285
0.004545	0.005855	0.004643	0.002891	0.002782	14.03148	15.68854	17.20852	15.68539	19.3948
0.004416	0.005617	0.004556	0.002875	0.002827	14.25422	15.92804	17.47465	15.93119	19.69869
0.004546	0.005696	0.004639	0.003007	0.002873	14.47274	16.17856	17.73905	16.17384	19.99674
0.004547	0.005774	0.004722	0.00311	0.002919	14.69407	16.42279	18.01209	16.42594	20.31038
0.004627	0.005853	0.004806	0.003113	0.002716	14.91118	16.66701	18.28167	16.66701	20.60843
0.004698	0.005932	0.004889	0.003235	0.00282	15.12828	16.91123	18.54953	16.90808	20.90648
0.004789	0.00601	0.004972	0.003242	0.002924	15.35244	17.15545	18.81566	17.16018	21.21622
0.004837	0.006109	0.005056	0.003229	0.003028	15.57236	17.4044	19.08352	17.40598	21.52012
0.005014	0.006168	0.005139	0.003335	0.003132	15.78665	17.6502	19.35829	17.64547	21.81817
0.005024	0.006246	0.005222	0.003288	0.003236	16.00939	17.8897	19.62614	17.89127	22.12012
0.004965	0.006325	0.005131	0.003414	0.003339	16.22791	18.1418	19.88882	18.13707	22.42402
0.005115	0.006403	0.005039	0.003486	0.003007	16.44501	18.38445	20.16531	18.38287	22.72986
0.005153	0.006482	0.005047	0.00355	0.003775	16.66635	18.62394	20.43317	18.62867	23.03376

0.005378	0.006656	0.005056	0.003627	0.003821	16.88345	18.87289	20.69584	18.86974	23.32986
0.005239	0.006464	0.005464	0.003428	0.003878	17.1076	19.11869	20.96888	19.12341	23.64349
0.00544	0.006772	0.00535	0.003288	0.003911	17.3233	19.36449	21.23674	19.36291	23.94155
0.004841	0.006797	0.005502	0.003129	0.003984	17.54041	19.60714	21.50805	19.60398	24.2396
0.004741	0.006875	0.00565	0.002875	0.004088	17.76456	19.84978	21.77418	19.85451	24.54934
0.004815	0.006859	0.005312	0.003007	0.004118	17.9859	20.10188	22.04031	20.10188	24.85324
0.005342	0.006937	0.005153	0.00311	0.004149	18.19877	20.34611	22.31508	20.34295	25.15323
0.005444	0.007502	0.005254	0.003113	0.00422	18.42151	20.5856	22.58467	20.58717	25.45518
0.004975	0.007209	0.005313	0.003235	0.004365	18.64003	20.83613	22.84561	20.8314	25.75713
0.004844	0.007172	0.005324	0.003242	0.004545	18.85854	21.08035	23.12038	21.07877	26.06492
0.004845	0.00725	0.005424	0.003229	0.004416	19.07847	21.32142	23.38824	21.32457	26.36687
0.005045	0.007329	0.005559	0.003335	0.004546	19.29557	21.57037	23.65437	21.56564	26.66297
0.005146	0.007407	0.005578	0.003288	0.004547	19.52114	21.81301	23.92568	21.81932	26.97466
0.005385	0.007485	0.005625	0.003414	0.004627	19.73542	22.06196	24.19181	22.06039	27.27466
0.004957	0.007563	0.005708	0.003486	0.004698	19.95253	22.30304	24.46658	22.29988	27.57272
0.004955	0.007634	0.005577	0.00355	0.004789	20.17668	22.54568	24.73098	22.55041	27.88051
0.005055	0.007472	0.005684	0.003627	0.004837	20.39802	22.79778	24.99538	22.79778	28.1844
0.005502	0.00748	0.005909	0.003686	0.005014	20.6123	23.04358	25.27188	23.03885	28.4883
0.005496	0.007588	0.00557	0.003728	0.005024	20.83223	23.2815	25.54319	23.28308	28.7883
0.005212	0.00768	0.006604	0.003788	0.004965	21.05215	23.53203	25.80413	25.5273	29.0883
0.005415	0.00778	0.006611	0.003848	0.005129	21.27208	23.77625	26.07545	25.77625	29.39804
0.005254	0.007881	0.005762	0.003908	0.005199	21.492	24.0189	26.34503	26.02205	29.70193
0.005313	0.007882	0.005362	0.003967	0.00527	21.7077	24.26627	26.61289	27.26154	29.99609
0.005324	0.007827	0.005363	0.004027	0.00534	21.93326	24.50734	26.88248	27.51207	30.30583
0.005342	0.007835	0.005264	0.004087	0.00541	22.14895	24.75944	27.14688	28.75629	30.60973
0.005156	0.007842	0.005665	0.004147	0.00548	22.36465	25.00051	27.4251	29.41543	30.90778
0.005158	0.007785	0.005655	0.004207		22.58739	25.24158	27.6895	29.65492	
0.005064	0.008086	0.005866	0.004267		22.80873	25.49368	27.95218	29.9023	
0.005357	0.007887	0.005767	0.004327		23.02443	25.74106	28.2304	30.1481	
0.005258	0.008087	0.005678	0.004387		23.24435	25.97898	28.49998	30.39074	
0.005511	0.007988	0.005769			23.46286	26.22635	28.76266		
0.004959	0.008389	0.005869			23.68561	26.47215	29.03224		
0.00506	0.00849	0.005702			23.90413	26.71638	29.30183		
0.005361	0.007991	0.005709			24.11982	26.96217	29.57141		
0.005462	0.007913	0.005475			24.34538	27.20324	29.841		
0.005662	0.008092	0.005473			24.56108	27.45692	30.10367		
0.005963	0.008193	0.005373			24.77678	27.69799	30.3819		
0.005639	0.007936	0.005574			24.99952	27.93749	30.6463		
0.005365	0.007944	0.005675			25.21944	28.18959	30.9107		
0.005265	0.008395				25.43937	28.43539			
0.005266	0.008496				25.65647	28.67646			
0.005267	0.008597				25.87358	28.92068			

0.005568	0.008598				26.09773	29.16648			
0.005669	0.008598				26.31766	29.41385			
0.005694	0.008499				26.53053	29.65965			
0.005702	0.0084				26.7561	29.89914			
0.005709	0.008101				26.97461	30.0961			
0.005472					27.19031				
0.005373					27.41164				
0.005687					27.63016				
0.005741					27.85149				
0.005749					28.06859				
0.005976					28.2857				
0.005976					28.51126				
0.006377					28.72978				
0.006478					28.94407				
0.006779					29.16681				
0.006795					29.38674				
0.006803					29.60243				
0.006811					29.82376				
0.006819					30.04087				

ภาคผนวก ค

การหาระดับการเชื่อมโยงพันธะจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

การหาระดับการเชื่อมโยงพันธะจากการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระแล้วคำนวณค่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงเป็นร้อยละการวิเคราะห์หมู่เอมีนอิสระทำได้โดยปฏิกิริยาของ 2,4,6-trinitro-benzen sulfonic acid (TNBS) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ลงไปในสารละลายที่ประกอบด้วย 1 มิลลิลิตรของสารละลาย NaHCO₃ (ความเข้มข้น ร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นที่ pH 8.5) และ 1 มิลลิลิตรของสารละลาย TNBS (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่น) ซึ่งสารละลาย TNBS นี้ไม่สามารถทำเก็บไว้ใช้ได้เนื่องจากสารประเภทนี้มีความไวต่อแสงสูง จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอ่างให้ความร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. เติมนอร์คไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N (6N HCl) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที
3. นำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (KUBOTA, ประเทศญี่ปุ่น) เพื่อแยกสารละลายใสกับตะกอน เนื่องจากโคโคซานไม่ละลายในสารละลาย TNBS
4. นำสารละลายส่วนที่ใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning) เพื่อวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน β -alanine จากนั้นจึงนำปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ได้ ไปคำนวณหาระดับการเชื่อมโยงพันธะจากสูตร

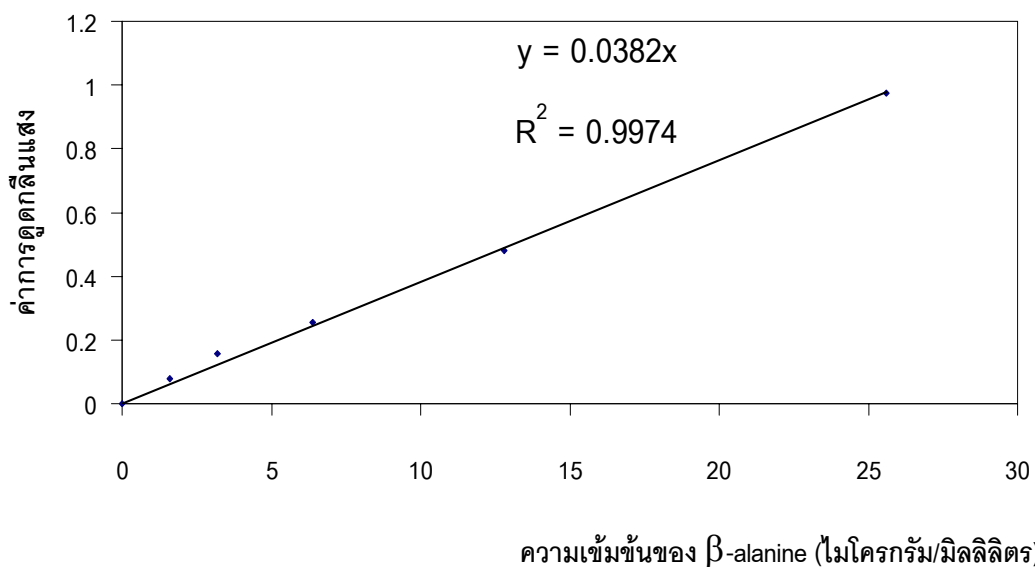
$$\text{ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้น} - \text{ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสุดท้าย}}{\text{ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้น}} \times 100$$

หรือจากสูตร

$$\text{ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนเชื่อมโยงพันธะ x ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนเชื่อมโยงพันธะ

B คือ น้ำหนักโครงเลี้ยงเซลล์หลังเชื่อมโยงพันธะ x ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระหลังเชื่อมโยงพันธะ



รูปที่ ค.1 กราฟแสดงสมการที่ใช้ในการหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ β -alanine กับค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ ค-1 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV (0.06% v/v) ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ก่อนเชื่อมโยงพันธะ		หลังเชื่อมโยงพันธะ		ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (เปอร์เซ็นต์)
	น้ำหนักเริ่มต้น (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักสุดท้าย (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
4 องศาเซลเซียส					
GAS	6.46±0.15	139.12±2.82	6.34±0.18	56.43±5.13	60.19±5.13
DGAV6	6.46±0.15	139.12±2.82	5.66±0.17	89.53±3.85	43.62±3.85
DGAV12	6.46±0.15	139.12±2.82	5.54±0.11	76.30±2.78	52.97±2.78
DGAV24	6.46±0.15	139.12±2.82	5.50±0.10	66.60±5.88	59.24±5.88
DGAV48	6.46±0.15	139.12±2.82	5.48±0.08	55.05±3.09	66.43±3.09
25 องศาเซลเซียส					
GAS	6.46±0.15	139.12±2.82	6.26±0.05	61.92±3.83	56.87±3.83
DGAV6	6.46±0.15	139.12±2.82	5.38±0.08	94.20±4.98	43.61±4.98
DGAV12	6.46±0.15	139.12±2.82	5.38±0.13	82.46±7.23	50.64±7.23
DGAV24	6.46±0.15	139.12±2.82	5.30±0.10	78.06±3.62	53.97±3.62
DGAV48	6.46±0.15	139.12±2.82	5.24±0.15	70.68±3.75	58.79±3.75
37 องศาเซลเซียส					
GAS	6.46±0.15	139.12±2.82	6.24±0.05	64.08±6.41	55.51±6.41
DGAV6	6.46±0.15	139.12±2.82	5.32±0.11	99.15±4.94	41.31±4.94
DGAV12	6.46±0.15	139.12±2.82	5.28±0.11	92.75±5.18	45.51±5.18
DGAV24	6.46±0.15	139.12±2.82	5.24±0.23	80.14±4.30	53.27±4.30
DGAV48	6.46±0.15	139.12±2.82	5.04±0.18	70.05±2.52	60.72±2.52

ตารางที่ ค-2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GAS และ DGAV (0.06% v/v) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ของ GA ที่ใช้	ก่อนเชื่อมโยงพันธะ		หลังเชื่อมโยงพันธะ		ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (เปอร์เซ็นต์)
	น้ำหนักเริ่มต้น (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักสุดท้าย (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
GAS					
0.030%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	6.40±0.07	63.57±5.99	54.73±5.99
0.060%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	6.34±0.18	56.43±5.13	60.19±5.13
0.085%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	6.30±0.10	39.82±8.01	72.09±8.01
0.120%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	6.18±0.13	29.92±5.42	73.43±5.42
DGAV					
0.030%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	5.66±0.11	83.36±6.86	47.50±6.86
0.060%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	5.50±0.10	66.60±5.88	59.24±5.88
0.085%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	5.32±0.15	49.79±11.55	70.53±11.55
0.120%GA	6.46±0.15	139.12±2.82	5.18±0.16	43.43±8.27	74.97±8.27

ตารางที่ ค-3 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ GCH, DHT, GAS, DGAV และ DEDC ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w และ 0.8% w/w

ตัวอย่าง	ก่อนเชื่อมโยงพันธะ		หลังเชื่อมโยงพันธะ		ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (เปอร์เซ็นต์)
	น้ำหนักเริ่มต้น (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักสุดท้าย (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5%w/w					
GCH	6.46±0.15	139.12±2.82	6.46±0.15	139.12±2.82	0.00±2.82
DHT	6.46±0.15	139.12±2.82	6.34±0.17	99.46±5.23	29.84±5.23
GAS	6.46±0.15	139.12±2.82	6.34±0.18	56.43±5.13	60.19±5.13
DGAV	6.46±0.15	139.12±2.82	5.44±0.27	66.60±5.88	59.69±5.88
DEDC	6.46±0.15	139.12±2.82	5.64±0.15	72.13±5.91	54.73±5.91
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.8%w/w					
GCH	10.68±0.13	138.26±3.35	10.68±0.13	138.26±3.35	0.00±3.35
DHT	10.68±0.13	138.26±3.35	10.08±0.26	85.37±7.75	41.72±7.75
GAS	10.68±0.13	138.26±3.35	10.08±0.19	48.30±7.09	67.03±7.09
DGAV	10.68±0.13	138.26±3.35	9.54±0.17	59.73±6.73	61.41±6.73
DEDC	10.68±0.13	138.26±3.35	9.56±0.17	68.95±3.41	55.36±3.41

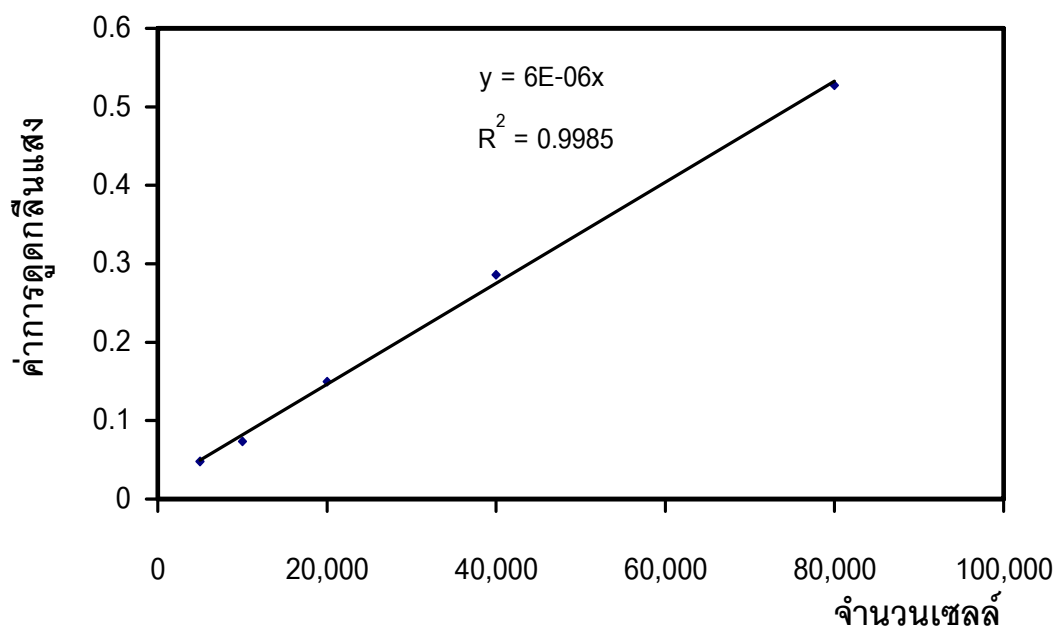
ตารางที่ ค-4 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการเชื่อมโยงพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์ DGAV ที่เชื่อมโยงพันธะซ้ำในสารละลายเดิม ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5% w/w และ 0.8% w/w

ตัวอย่าง	ก่อนเชื่อมโยงพันธะ		หลังเชื่อมโยงพันธะ		ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (เปอร์เซ็นต์)
	น้ำหนักเริ่มต้น (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักสุดท้าย (มิลลิกรัม)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.5%w/w					
ครั้งที่ 1	6.46±0.15	139.12±2.82	5.50±0.10	66.60±5.88	59.24±5.89
ครั้งที่ 2	6.46±0.15	139.12±2.82	5.52±0.18	72.76±8.46	55.31±5.90
ครั้งที่ 3	6.46±0.15	139.12±2.82	5.90±0.16	84.27±7.19	44.68±5.91
ครั้งที่ 4	6.46±0.15	139.12±2.82	5.90±0.16	94.32±3.58	38.08±5.92
ครั้งที่ 5	6.46±0.15	139.12±2.82	6.02±0.13	97.03±7.02	35.00±5.93
ปริมาณของแข็งทั้งหมด 0.8%w/w					
ครั้งที่ 1	10.68±0.13	138.26±3.35	9.68±0.16	59.73±6.73	60.84±6.73
ครั้งที่ 2	10.68±0.13	138.26±3.35	9.88±0.13	69.86±5.59	53.26±5.59
ครั้งที่ 3	10.68±0.13	138.26±3.35	9.96±0.17	76.53±11.51	48.38±11.51
ครั้งที่ 4	10.68±0.13	138.26±3.35	10.10±0.19	77.59±9.81	46.93±9.81
ครั้งที่ 5	10.68±0.13	138.26±3.35	10.16±0.19	84.11±7.42	42.13±7.42

ภาคผนวก ง

การทดสอบจำนวนเซลล์สัมผัสในห้องปฏิบัติการ

1. ใส่เชื้อโครงเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม โดยการแช่ใน ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 นาที
2. ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 รอบ รอบละ 15 นาที
3. แช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน PBS buffer (pH 7.4) 24 ชั่วโมง เพื่อปรับ pH โครงเลี้ยงเซลล์
4. บีบ PBS buffer ออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ปริมาตรหลุมละ 350 ไมโครลิตร
5. ใส่เซลล์ L929 จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อ 1 หลุม ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม แล้วนำไปบ่ม (incubate) ภายในตู้ที่มี 5% CO₂ แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่ 5, 48, และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay [Liu, H. และคณะ 2004]
6. หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ภายในตู้ที่มี 5% CO₂ แล้ว จากนั้นล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS buffer เพื่อที่จะล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออก
7. เติมสารละลาย MTT ใน DMEM ที่ปราศจาก phenol red ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุม และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที
8. สาร (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ใน MTT ซึ่งมีสีเหลืองจะทำปฏิกิริยากับ enzyme mitochondria dehydrogenase ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้ม
10. ทำการล้างผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ผสมกับ glycine buffer ในอัตราส่วน 9:1
11. ทำการวัดปริมาณเซลล์สัมผัส โดยการวัดจากการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตกับกราฟมาตรฐานในรูปแบบที่ ง.1 [Liu, H., และคณะ 2004]



รูปที่ 1.1 กราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 mouse fibroblast (n = 4)

ภาคผนวก จ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทำการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10993-5 โดยสำนักงานยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข


1. นำเซลล์ L929 mouse fibroblast มาตัดเอาโปรตีนออก (trypsinized) อย่างระมัดระวัง จากนั้นนำไปเจือจางกับอาหารเลี้ยง (Minimum Essential Medium, MEM) ซึ่งประกอบด้วยซีรัมจากลูกวัว (fetal bovine serum) ร้อยละ 5 โดยมีความเข้มข้นของเซลล์ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
2. ใส่เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยง 750 ไมโครลิตรต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 24 หลุม จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเพาะเชื้อ (incubator) CO₂ ร้อยละ 5 ที่ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 จนเซลล์กระจายตัวไปทั่วๆ
3. เติมลำดับการเจือจางลงในแต่ละหลุมของตัวอย่างที่สกัด, ตัวควบคุมเชิงลบ(สารละลาย Zinc acetate ความเข้มข้น 2 ppm) , ตัวควบคุมเชิงบวก(สารละลาย Zinc acetate ความเข้มข้น 8 ppm)
4. นำทุกหลุมไปบ่มในเครื่องเพาะเชื้อ ที่ 37 องศาเซลเซียส CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. เซลล์ในแต่ละหลุมถูกนำมาตรวจสอบด้วย inverse microscope เพื่อดูการตายของเซลล์ และนำไปประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์

ตารางที่ จ.1 ระดับการรอดชีวิตของเซลล์

ระดับ	กระบวนการ	สภาวะของการเลี้ยง
0	ไม่มี	ไม่มีเซลล์ตาย
1	เล็กน้อย	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมด
2	ไม่รุนแรง	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด
3	ปานกลาง	เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 70 ของเซลล์ทั้งหมด
4	รุนแรง	เซลล์ตายเกือบทั้งหมด

[Biological Reactivity Tests, *in vitro*, 87, ISO 10993-5, 1999]

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 โดยสำนักงานยาและวัตถุเสพติด
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

No. 0622.1/50/ 1760		Department of Medical Sciences Ministry of Public Health Nonthaburi 11000, Thailand
CYTOTOXICITY TEST (Test on extracts)		
1. Test Items		
Sample No. :	2250-101749	
Product Name :	Gelatin-chitosan scaffold	
Lot No. :	-	
Manufacturer :	Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University	
2. Test Method		
The test was performed according to Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5: 1999).		
3. Period of test		
Date received:	13 July 2007	
Date prepared:	16 July 2007	
Date terminated:	20 July 2007	
4. Materials		
The sample was identified and handled as follows:		
Storage condition:	Room temperature	
Cell line:	L-929 mouse fibroblast (ATCC CCL1, NCTC Clone 929)	
Extraction vehicle:	Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum.	
Sample preparation:	33.94 cm ² of the sample was covered with 27.15 ml of extraction vehicle. The mixture was subjected to extraction in an incubator at 37°C for 24 hours. The resulting extract was diluted by using dilution factor of 1.5 with the medium.	
Negative chemical control:	MEM containing 5% of fetal bovine serum and zinc acetate equivalent to zinc 2 ppm	
Positive chemical control:	MEM containing 5% of fetal bovine serum and zinc acetate equivalent to zinc 8 ppm	
Reagent control:	MEM containing 5% of fetal bovine serum	
Page 1 of 4 pages		

Sample No. 2250-101749

5. Test Procedure

- 5.1 The L-929 mouse fibroblasts from stock cultures were used. They were trypsinized carefully, diluted with MEM containing 5% of fetal bovine serum to a concentration of 2×10^5 cells/ml.
- 5.2 The cell suspension (750 μ l / well) was added into 24-well plates and incubated in CO₂ incubator at 37°C with 5% CO₂ and approximately 95% of relative humidity for appropriate time for cell monolayer confluent.
- 5.3 The medium from each well was discarded. The wells were filled with the dilution series of the sample extract, negative chemical control, positive chemical control and reagent control. Triplicate of every dilution series of sample extract and controls were tested in different wells.
- 5.4 All wells were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 48 hours.
- 5.5 Cell cultures from each well were examine microscopically for reactivity grades.

Grade	Reactivity	Condition of Cultures
0	None	Discrete intracytoplasmic granules; no cell lysis
1	Slight	Not more than 20% of the cells are round, loosely attached, and without intracytoplasmic granules; occasional lysed cells are present
2	Mild	Not more than 50% of the cells are round and devoid of intracytoplasmic granules; no extensive cell lysis and empty areas between cells
3	Moderate	Not more than 70% of the cell layers contain rounded cells or are lysed
4	Severe	Nearly complete destruction of the cell layers

For the suitability of the system to be confirmed, the negative chemical control and reagent control must have been a grade of 0 (reactivity: none) and the positive chemical control must have been a grade 3 or 4 (reactivity: moderate or severe). The test would have been repeated if the controls did not perform as anticipates and/ or if all three test wells did not yield the same conclusion.

Sample No. 2250-101749

6. Results

The observations and scores obtained were as follows :

Well	Confluent Monolayer	Percent Rounding	Percent Cells Without Intracytoplasmic Granules	Percent Lysis	Grade	Reactivity
Test (1A) 100%	+	0	0	0	0	None
Test (1B)	+	0	0	0	0	None
Test (1C)	+	0	0	0	0	None
Test (1A) 66%	+	0	0	0	0	None
Test (1B)	+	0	0	0	0	None
Test (1C)	+	0	0	0	0	None
Test (1A) 44%	+	0	0	0	0	None
Test (1B)	+	0	0	0	0	None
Test (1C)	+	0	0	0	0	None
Test (1A) 30%	+	0	0	0	0	None
Test (1B)	+	0	0	0	0	None
Test (1C)	+	0	0	0	0	None
Test (1A) 20%	+	0	0	0	0	None
Test (1B)	+	0	0	0	0	None
Test (1C)	+	0	0	0	0	None
Test (1A) 13%	+	0	0	0	0	None
Test (1B)	+	0	0	0	0	None
Test (1C)	+	0	0	0	0	None
Test (1A) 9%	+	0	0	0	0	None
Test (1B)	+	0	0	0	0	None
Test (1C)	+	0	0	0	0	None
Positive Control (1A)	-	100	100	100	4	Severe
Positive Control (1B)	-	100	100	100	4	Severe
Positive Control (1C)	-	100	100	100	4	Severe
Negative Control (1A)	+	0	0	0	0	None
Negative Control (1B)	+	0	0	0	0	None
Negative Control (1C)	+	0	0	0	0	None
Reagent Control (1A)	+	0	0	0	0	None
Reagent Control (1B)	+	0	0	0	0	None
Reagent Control (1C)	+	0	0	0	0	None

Sample No. 2250-101749

7. **Conclusion :** The sample was found to be nontoxic when sample extract was tested at concentrations of 100% or below.

Criteria : The sample meets the requirements of the test if the cultures treated with samples show not greater than a mild reactivity (Grade 2)

Name of Authorized Person:



Mr. Daweesapya Chaisomboonpan

Head of Laboratory

Date issued

- 2 AUG 2007
.....

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐนาท ไชยถาวร เกิดที่จังหวัดสงขลา ในวันที่ 2 กันยายน 2526 จบการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในปี พ.ศ.2544 จากโรงเรียนแสงทองวิทยา สงขลา ในปี พ.ศ.2547 จบการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต จาก สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หลังจากจบการศึกษาในระดับปริญญาบัณฑิต ได้เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานที่มีการเผยแพร่

- ณัฐนาท ไชยถาวร, ไศรดา กนกพานนท์, ผลของการเชื่อมโยงพันธะที่มีผลต่อลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน, การประชุมผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 7 วันที่ 4-5 เมษายน พ.ศ. 2550 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี (อยู่ในระหว่างการจัดทำหนังสือรวบรวมบทความ)
- ณัฐนาท ไชยถาวร, ไศรดา กนกพานนท์, ผลของการเชื่อมโยงพันธะที่มีผลต่อลักษณะสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน-ไคโตซาน, การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์แห่งชาติ ครั้งที่ 5, วันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2550, กรุงเทพมหานคร หน้า, 152-156