

การดัดแปรพันธุวิศวกรรมเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

นายถนอม วงศ์พุทธรักษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

SURFACE MODIFICATION OF THAI SILK FIBROIN SCAFFOLDS WITH GELATIN AND
CHITTOOLIGOSACCHARIDE

Mr. Tanom Wongputtaraksa

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์
โดย	นายถนอม วงศ์พุทธรักษา
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศศิริวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ธัญรัตน์ ฤกษ์พัฒนาพิพัฒน์)

ถนอม วงศ์พุทธรักษา : การดัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วย
 เจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (SURFACE MODIFICATION OF THAI SILK
 FIBROIN SCAFFOLDS WITH GFLATIN AND CHITOOIGOSACCHARIDE)
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล,
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.รัฐ พิษญากร, 123 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการคอนจุกต์สารผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยกำหนดอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ คือ 100/0, 90/10, 80/20 และ 70/30 และใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมขวาง จากผลการศึกษาพบว่า โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกเตรียมด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก มีพื้นผิวเรียบ และมีรูพรุนเชื่อมต่อกัน เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยมาคอนจุกต์ด้วยสารผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% โดยปริมาตร พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.1% สารผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกคอนจุกต์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย ประมาณร้อยละ 28-29 ทำให้ค่าความหนาแน่นและค่ามอดุลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ค่าความพรุนลดน้อยลง ผลการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า เมื่ออัตราส่วนไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้ในการคอนจุกต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดีขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณแคลเซียม และลักษณะของเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ ผลการศึกษาสรุปได้ว่า สารผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกคอนจุกต์ภายในรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย สามารถช่วยกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดี โดยเฉพาะที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็น 70 ต่อ 30

ภาควิชา..... วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา..... วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา..... 2554..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5270305521 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : GELATIN / CHITOOLOGOSACCHARIDE / BONE TISSUE
ENGINEERING

TANOM WONGPUTTARAKSA : SURFACE MODIFICATION OF THAI SILK
FIBROIN SCAFFOLDS WITH GFLATIN AND CHITOOLOGOSACCHARIDE

ADVISOR : ASSOC.PROF.SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D.,

CO-ADVISOR : ASST.PROF.RATH PICHYANGKURA, Ph.D., 123 pp.

This research aimed to investigate the effects of gelatin and chitooligosaccharide conjugation into Thai silk fibroin scaffolds on the physical and biological properties of the scaffolds. Thai silk fibroin scaffolds were prepared via salt-leaching method resulting in smooth surface and interconnected porous network. The scaffolds were conjugated with blended gelatin and chitooligosaccharide solution. The weight blend ratios of gelatin and chitooligosaccharide were 100/0, 90/10, 80/20 and 70/30. Glutaraldehyde (GA) was used as the crosslinking agent at the concentration of 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2% v/v. At 0.1% GA, the amount of gelatin and chitooligosaccharide conjugated into Thai silk fibroin scaffold was 28-29% leading to an increase in density and compressive modulus and a reduction in the porosity of scaffolds. The results of *in vitro* cell culture using rat bone-marrow derived mesenchymal stem cells showed that the conjugated gelatin and chitoologosaccharide into the scaffolds effectively enhanced osteogenic differentiation as evaluated from alkaline phosphatase activity, calcium content and cell morphology. From these results, it could be concluded that Thai silk fibroin scaffolds modified by gelatin and chitooligosaccharide conjugation could promote osteogenic differentiation of bone marrow-derived stem cells, especially at the weight blending ratio of gelatin/chitooligosaccharide 70/30.

Department : ..Chemical Engineering..... Student's Signature

Field of Study : ..Chemical Engineering..... Advisor's Signature

Academic Year : 2011..... Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษา, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย วางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ คณะกรรมการ ซึ่งได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ ประธานกรรมการ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไศรดา กนกพานนท์ และ ดร.ธัญรัตน์ ฤกษ์พัฒนาพิพัฒน์ กรรมการ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณทุนพัฒนาวิชาการจุฬาฯ 100 ปี ที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ห้องปฏิบัติการ i-Tissue Lab คณะแพทยศาสตร์ สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ในการทำการทดลองรวมทั้งเชื้อเพื่อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือด้านความรู้ทางด้านการทดลองทางชีวภาพ และ คุณชัชววรรณ ตริตานีภากุล สำหรับขอแนะนำและการให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลอง

ขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ.....	5
2.2 โครงเลี้ยงเซลล์.....	5
2.3 กระดูก.....	6
2.4 ชีววัสดุ	10
2.4.1 ไหม.....	10
2.4.2 ไคโตซาน.....	16
2.4.3 เจลาติน	18
2.5 Porogen leaching.....	22
2.6 การเชื่อมขวาง.....	23
2.6.1 การเชื่อมขวางทางเคมี.....	23
2.6.1.1. การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์.....	24
2.6.1.2. การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์.....	25
2.6.1.3. การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide.....	26

บทที่	หน้า
2.6.2 การเชื่อมขวางทางกายภาพ.....	28
2.6.2.1. การเชื่อมขวางด้วยความร้อน.....	28
2.6.2.2.การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	29
2.7 Mesenchymal stem cells.....	29
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	32
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	37
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	37
3.2 อุปกรณ์.....	38
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	40
3.3.1 การวิเคราะห์คุณลักษณะของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	41
3.3.2 การเตรียมไฟโบรอินใหม่ไทย.....	44
3.3.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย.....	44
3.3.4 การตัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย โดยการคอนจูเกตด้วย สารละลายเจลาติน/โคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	45
3.3.5 การวิเคราะห์คุณลักษณะและทดสอบสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์	47
3.3.5.1 คำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักเจลาติน/โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน โครงเลี้ยงเซลล์.....	47
3.3.5.2 คำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักเจลาติน/โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน โครงเลี้ยงเซลล์ที่หายไปหลังแช่ใน PBS.....	47
3.3.5.3 ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์.....	48
3.3.5.4 ศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ รวมถึงลักษณะรูพรุน....	48
3.3.5.5 ศึกษาสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์.....	48
3.3.5.6 ศึกษาความพรุนและการเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์...	49
3.3.6 การทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์.....	49
3.3.6.1 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก.....	49
3.3.6.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์.....	50
3.3.6.3 ทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์	51

บทที่	หน้า
3.3.6.4 ทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์.....	52
3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	53
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	54
4.1 คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์.....	54
4.1.1 ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์.....	55
4.1.2 โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์.....	63
4.1.3 สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์.....	72
4.2 สมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์.....	76
4.2.1 การทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์.....	76
4.2.2 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์	81
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	93
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	93
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	94
รายการอ้างอิง	96
ภาคผนวก	105
ภาคผนวก ก	106
ภาคผนวก ข	107
ภาคผนวก ค	108
ภาคผนวก ง	109
ภาคผนวก จ	111
ภาคผนวก ฉ	112
ภาคผนวก ช	113
ภาคผนวก ซ	114
ภาคผนวก ณ	117

	ญ
บทที่	หน้า
ภาคผนวก ญ	119
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	123

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเส้นใยไฟโบรอิน.....	14
2.2	แสดงองค์ประกอบในเจลาติน.....	20
2.3	ตารางแสดงสมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B.....	22
3.1	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	42
3.2	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน N-acetyl-D-glucosamine.....	43
4.1	ตัวอย่างและสัญลักษณ์ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	54
4.2	ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์	67
4.3	ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	69
4.4	ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	71
4.5	ค่าการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดกระดูก (%), เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์	79
4.6	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก	83
4.7	ปริมาณธาตุ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ตรวจสอบด้วย EDX ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	92

ตาราง	หน้า
ข.1	ค่าเฉลี่ยเลขคณิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย..... 107
ค.1	ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่หายไปหลังจากแช่ในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 108
ง.1	ค่าเฉลี่ยเลขคณิตและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ามอดูลัสของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ (ในสภาวะแห้ง)..... 109
ง.2	ค่าเฉลี่ยเลขคณิตและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ามอดูลัสของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ (ในสภาวะเปียก)..... 110

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ส่วนหัวของกระดูกต้นขาของมนุษย์ตัดตามยาว	7
2.2	ภาพแสดงภาคตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก....	9
2.3	ขั้นตอนการเจริญพัฒนาของกระดูก แบบ Endochondral ossification	10
2.4	วงจรรีชีวิตของไหม	11
2.5	โครงสร้างของเส้นใยไหม	12
2.6	โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน	13
2.7	การประยุกต์ใช้งานของไหม	16
2.8	โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน โดยจำแนกจากจำนวนหมู่ฟังก์ชัน	17
2.9	กระบวนการเตรียมไคโตซานจากไคติน	18
2.10	โครงสร้างของเจลาติน	19
2.11	แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin	21
2.12	กระบวนการSalt-leaching.....	22
2.13	กลไกกระบวนการSalt-leaching	23
2.14	การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์	24
2.15	โครงสร้างของไคโตซานถูกเชื่อมโยงพันธะด้วยกลูตารัลดีไฮด์	25
2.16	การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยฟอร์มัลดีไฮด์	26
2.17	การเชื่อมขวางด้วย EDC	27
2.18	การเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางโดยการใช้องค์เชื่อมขวาง ไวโอเลต.....	29
2.19	แสดงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปร่างของ MSCs	30
2.20	แผนผังการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก	31
2.21	แผนผังแสดงสารที่หลั่งออกมาระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก.....	31
3.1	แสดงแผนการดำเนินการวิจัย.....	40
3.2	กราฟแสดงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	41
3.3	การเตรียมไฟโบรอินไหมไทยและการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย.....	45
3.4	การตัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย โดยการคอนจูเกตด้วยสารละลาย ผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	46

ภาพที่	หน้า	
4.1	ลักษณะภายนอกของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100:0 (G100C0), 90:10 (G90C10), 80:20 (G80C20) และ 70:30 (G70C30).....	55
4.2	ร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกคอนจูเกตในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย.....	60
4.3	ร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่หายไปหลังเสร็จสิ้นกระบวนการการคอนจูเกตโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย.....	61
4.4	สเปกตรัมการดูดกลืนของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ	62
4.5	ลักษณะโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย	63
4.6	ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100:0 (G100C0), 90:10 (G90C10), 80:20 (G80C20) และ 70:30 (G70C30), สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร.....	65
4.7	ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100:0 (G100C0), 90:10 (G90C10), 80:20 (G80C20) และ 70:30 (G70C30), สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร.....	66
4.8	ความสามารถในการทนแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน สภาวะแห้ง (A) และสภาวะเปียก (B).....	74
4.9	จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ G0C0, G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	78

ภาพที่	หน้า	
4.10	ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย G0C0 (a-b), และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทน์ที่คอบนจุเกิดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0, G90C10, G80C20 และ (G70C30) ภายหลังกการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วันที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	80
4.11	การเจริญเติบโตของเซลล์ของต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย G0C0 และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทน์ที่คอบนจุเกิดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	82
4.12	กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย G0C0 และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทน์ที่คอบนจุเกิดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 ภายหลังกการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	85
4.13	ปริมาณแคลเซียมบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย G0C0 (A-B) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทน์ที่คอบนจุเกิดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0 (C-D), G90C10 (E-F), G80C20 (G-H) และ (G70C30) (I-J) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂	87
4.14	ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย G0C0 และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอบนจุเกิดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0, G90C10, G80C20 และ (G70C30) โดยเปรียบเทียบ 2 สภาวะ.....	88

ภาพที่	หน้า	
4.15	ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย G0C0 (A-B) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0 (C-D), G90C10 (E-F), G80C20 (G-H) และ (G70C30) (I-J) ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) เป็นเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก, ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร).....	89
จ.1	กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์โดยวิธี DNA.....	111
ข.1	กราฟมาตรฐานของการวัด p-nitrophenyl phosphate	112
ช.1	กราฟมาตรฐานของการวัด O-cresolphythale.....	113
ช.1	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0).....	114
ช.2	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 100/0 (G100C0)	115
ช.3	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 90/10 (G90C10)	115
ช.4	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 80/20 (G80C20)	116
ช.5	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 (G70C30)	116
ณ.1	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0).....	117
ณ.2	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 100/0 (G100C0)	118
ณ.3	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 90/10 (G90C10)	118
ณ.4	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 80/20 (G80C20)	119
ณ.5	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 (G70C30)	119
ญ.1	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0).....	120

ภาพที่	หน้า
ญ.2	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอบนจุเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและ ไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 100/0 (G100C0) 121
ญ.3	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอบนจุเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและ ไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 90/10 (G90C10) 121
ญ.4	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอบนจุเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและ ไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 80/20 (G80C20) 122
ญ.5	โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอบนจุเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและ ไคโตโอสิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 (G70C30) 122

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันนี้ปัญหากระดูกบาดเจ็บจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการรักษา หรืออาจต้องรอรับบริจาคกระดูกจากผู้อื่น จึงมีการใช้วัสดุทดแทนกระดูกเพื่อทดแทนและซ่อมแซมเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ การปลูกถ่ายกระดูกที่ใช้โดยทั่วไปมี 3 วิธี คือ การปลูกถ่ายด้วยกระดูกจากตัวผู้ป่วยเอง (autograft) การปลูกถ่ายด้วยกระดูกจากผู้อื่น (allograft) และการปลูกถ่ายด้วยวัสดุเลียนแบบชีวภาพ (biomimetic materials) [Zhang, Z.Y. และคณะ 2009] การรับบริจาคกระดูกจากผู้อื่นมีผลเสียคือ บางครั้งกระดูกนั้นถูกต่อต้านโดยระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับบริจาค จากเหตุผลนี้จึงมีการพัฒนาเลือกใช้วัสดุสังเคราะห์และวัสดุธรรมชาติมาผลิตเป็นกระดูกทดแทน

โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffolds) เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โครงเลี้ยงเซลล์ผลิตจากชีววัสดุ อาทิเช่น คอลลาเจน ไนโพลีเอทิลีน ไลซีน และโคไลซีน อีกทั้งยังสามารถผลิตได้จากวัสดุสังเคราะห์ อาทิเช่น พอลิแลคติกแอซิด (PLA) ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) และเบตาไตรแคลเซียมฟอสเฟต (β -TCP) ซึ่งมีลักษณะและสมบัติที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ ได้แก่ มีความพรุนที่ต่อเนื่อง มีขนาดของรูพรุนที่เหมาะสม มีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย มีความแข็งแรง และมีความสามารถในการย่อยสลายภายในร่างกายที่เหมาะสมกับลักษณะการเกิดของเนื้อเยื่อใหม่ และต้องมีสมบัติเชิงกลที่ดี เช่น ความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ [Takahashi, Y. และคณะ 2005] เซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงอาจเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อจำเพาะ เช่น เซลล์ผิวหนังแท้ เซลล์กระดูก เซลล์ประสาท เป็นต้น หรือ เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อจำเพาะต่างๆได้ ซึ่งจากรายงานในต่างประเทศในช่วงที่ผ่านมาพบว่า มีความสนใจในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อใช้งานในวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง [Meinel, L. และคณะ 2005]

วัสดุธรรมชาติที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพซึ่งมีรายงานการนำมาพัฒนาผลิตโครงเลี้ยงเซลล์มีหลายประเภท อาทิ เส้นใยไฟโบรอินไหมไทย คอลลาเจน เจลาติน และ โคไลซีน ไนโพลีเอทิลีน โปรตีนธรรมชาติที่ถูกนำมาวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยนำส่วนของ

ไฟโบรอินมาทำการศึกษา เพราะมีสมบัติเชิงกลที่ดี มีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพ มีความสามารถในการซึมผ่านของน้ำและออกซิเจนได้ดี รวมทั้งเซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไฟโบรอินจึงเป็นวัสดุที่นิยมนำมาผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ [Wang, Y. และคณะ 2006] อย่างไรก็ตาม โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินมีความแข็งแรงพอๆ ดังนั้นจึงมีการผสมสารสังเคราะห์ หรือ พอลิเมอร์ตัวอื่นร่วมด้วย เพื่อให้สมบัติดีขึ้น วัสดุที่นำมาใช้ร่วมได้แก่ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA) และมีวัสดุชีวภาพที่ช่วยให้สมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินดีขึ้นได้แก่ เจลาติน [She, Z. และคณะ 2008]

จากผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยเกี่ยวกับการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก โดยใช้รังสีแกมมาของประเทศไทยพ่นรังสีขนาด 1 แล้วทำการศึกษาผลกระทบจากการคอนจุกต์เจลาตินที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย โดยพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจุกต์เจลาติน ช่วยให้โครงสร้างมีความแข็งแรงมากขึ้น โดยมีค่ามอดุลัสของการกดสูงขึ้น 93% และมีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008]

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ที่ได้มาจากไคติน ซึ่งพบมากในสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู ปลาหมึก โดยมีโครงสร้างเป็นพอลิแซคคาไรด์ ไคโตซานมีสมบัติที่ดีในด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพ แต่มีข้อเสียในเรื่องการควบคุมการย่อยสลายซึ่งทำได้ยาก และมีบางรายงานอ้างว่าไคโตซานมีความเป็นพิษต่อเซลล์ [She, Z. และคณะ 2008] จากผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยเกี่ยวกับผลกระทบของการผสมไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ต่อโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากโปรตีนกลุ่มคอลลาเจนและเจลาติน พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานส่งผลโดยตรงกับสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนผสมไคโตซานด้วยกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น โดยพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนและไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (13 กิโลดาลตัน) สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929) ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนและไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (264 กิโลดาลตัน) โดยเฉพาะที่สัดส่วนการผสมของไคโตซาน 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก [Tangsadthakun, C และคณะ 2007]

ในทำนองเดียวกัน มีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน และสัดส่วนการผสมระหว่างเจลาตินกับไคโตซาน โดยจุฑามาศ รัตนวราภรณ์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (1,000 กิโลดาลตัน) มีสมบัติทางกายภาพ

และทางกลที่ดีเยี่ยม แต่ไม่ส่งเสริมกิจกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดไขมันและเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ทั้งทางด้านการยึดเกาะและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ในทางตรงข้าม โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก เจลาตินและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หรือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (1.4 กิโลดาลตัน) มีความเหมาะสมสำหรับการยึดเกาะ และการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 70/30 ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน [Ratanavaraporn, J. และคณะ 2009]

ดังนั้นเห็นได้ว่า ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำหรือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีความสามารถในการช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ รวมถึงชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดี ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการปรับปรุงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยโดยการคอนจุกต์ด้วยเจลาตินและไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำหรือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีการคอนจุกต์ด้วยเจลาติน เพื่อการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลการเชื่อมขวางด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ ไฟโบรอินใหม่ไทยจากรังไหมพันธุ์ “นางน้อยศรีสะเกษ 1” ด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก (Salt-leaching)

1.3.2 ดัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยมีตัวแปรที่จะศึกษาได้แก่

- ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง ได้แก่ 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 %โดยปริมาตร
- อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินกับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ได้แก่ 100/0, 90/10, 80/20 และ 70/30

1.3.3 วิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย ก่อนและหลังการดัดแปร ได้แก่

- โครงสร้างพื้นฐานและขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์
- ความพรุน (Porosity)
- ความสามารถในการทนแรงกด (Compression modulus)

1.3.4 ทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู (rat bone marrow-derived stem cell) โดย

- ทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยวิธี DNA assay ซึ่งเป็นการหาจำนวนเซลล์โดยวิธีวัดปริมาณ DNA
- ทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก โดยตรวจสอบสารที่ใช้บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ได้แก่ค่า Alkaline phosphatase activity (ALP) และแคลเซียม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไทยที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยสารละลายเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เป็นศาสตร์ที่นำหลักการของวิศวกรรมและชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูรักษา และพัฒนาหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อ (Tissue Function) [Bronzino, J.D. และคณะ 2006, Langer, R. และคณะ 2000] ซึ่งในปัจจุบันนี้ปัญหากระดูกบาดเจ็บเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น โรคทางกระดูก การผ่าตัด และอุบัติเหตุ โดยมีวิธีการรักษาได้หลายรูปแบบ ด้วยการปลูกถ่ายกระดูกซึ่งโดยทั่วไปมี 3 วิธีคือการปลูกถ่ายด้วยวัสดุจากตัวผู้ป่วยเอง (autograft) การปลูกถ่ายด้วยวัสดุจากผู้อื่น (allograft) และการปลูกถ่ายด้วยวัสดุเลียนแบบชีวภาพ (biomimetic materials) [Zhang, F. และคณะ 2009] แต่ทั้ง 3 วิธีก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายด้าน เช่น ด้านวัสดุ พื้นที่ผิวที่รับการปลูกถ่ายกระดูก ปัญหาภาวะภูมิคุ้มกัน และการติดเชื้อ จึงมีการพัฒนาวัสดุสังเคราะห์และวัสดุชีวภาพเพื่อมาแก้ปัญหาดังกล่าว วัสดุทดแทนหรือที่เรียกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) นี้ทำงานโดยการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มายึดเกาะได้ดีรวมถึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระดูกได้ นอกจากนี้จะต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อร่างกายอีกด้วย โดยจะต้องศึกษาพัฒนาองค์ความรู้ที่สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffolds) สารโปรตีนกระตุ้นการเจริญ (growth factors) และเซลล์ (cells) ทั้ง 3 ส่วนมีความเกี่ยวข้องซึ่งกันและกัน มีส่วนในการส่งเสริมกัน เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อสู่นานาชาติได้

2.2 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold)

โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) หรือ Artificial extracellular matrices คือ โครงสร้างทรงสามมิติที่สร้างขึ้นชั่วคราวเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตภายในโครงเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ โดยอาจทำการเพาะเซลล์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์และเซลล์จะเจริญเติบโตอยู่ภายในซึ่งต้องมีสารอาหารและการควบคุมโมเลกุลที่ต้องแพร่ผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ (โปรตีนและ growth factor เป็นต้น) สิ่งกระตุ้นทางกายภาพและเชิงกล อุณหภูมิ ความดันและการขนส่งมวล

สารต้องเหมาะสมกับการแบ่งเซลล์และการเกิดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่ โดยหลักที่ต้องคำนึงถึงในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ไป คือ [Peter, X.M. และคณะ 2004]

1. โครงสร้างเป็นสามมิติ เพื่อเป็นโครงสร้างค้ำจุนให้เซลล์สามารถเจริญเติบโต
2. มีความพรุนสูง โดยมีความพรุนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และรูพรุนต้องมีขนาดที่เหมาะสม โดยทั่วไปขนาดรูพรุนประมาณ 100-200 ไมโครเมตร และรูพรุนควรเชื่อมต่อกัน (Interconnected pore) เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ สารอาหารและของเสียต่างๆ สามารถส่งผ่านภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างสะดวก
3. มีโครงสร้างทางกายภาพหรือสมบัติทางเคมีสำหรับให้เซลล์สามารถยึดเกาะ (Attachment) เจริญเติบโต (Proliferation) และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการได้
4. สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย โดยไม่ทิ้งสารที่เป็นพิษไว้ ร่างกายสามารถกำจัดได้ตลอดเวลา และมีอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสมกับอัตราการเกิดขึ้นของเนื้อเยื่อใหม่
5. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible)

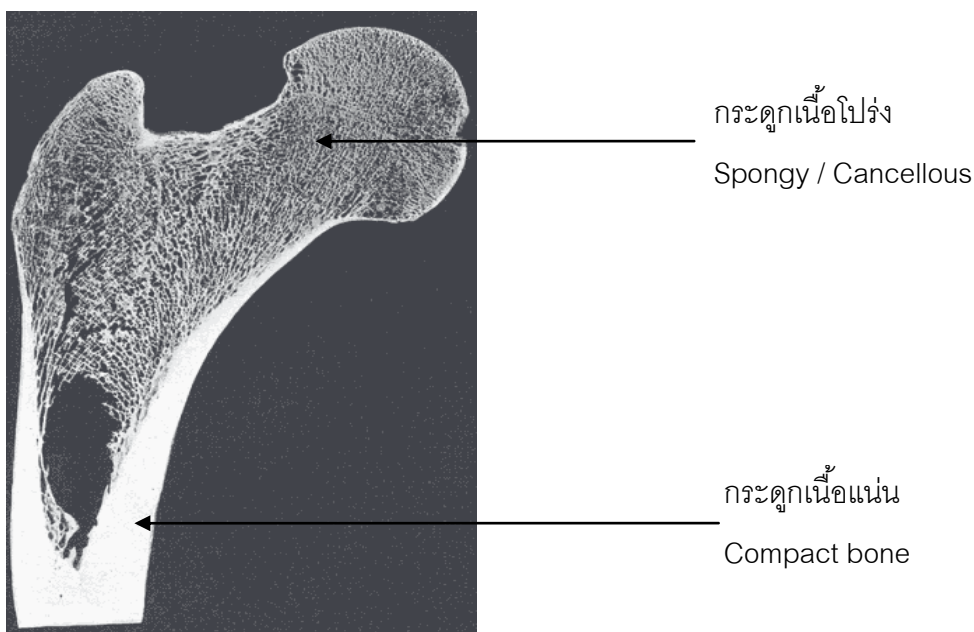
นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Palsson B. ได้รายงานว่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปร่างโค้งช่วยให้ปฏิกิริยาตอบสนองกับเซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี รวมทั้งโครงสร้างของรูพรุนควรมีความเชื่อมโยงกันเพื่อให้เส้นเลือดสามารถเข้าไปหล่อเลี้ยงเซลล์ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้ดี [Palsson, B. และคณะ 2003] และงานวิจัยของ Chang B.S. ได้รายงานว่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนเชื่อมโยงกันสามารถช่วยให้เกิดการสร้างกระดูกได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนแบบไม่เชื่อมโยง [Chang, B.S. และคณะ 2002]

2.3 กระดูก (Bone)

กระดูก (Bone) เป็นอวัยวะที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างแข็งภายใน (endoskeleton) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง หน้าที่หลักของกระดูกคือการค้ำจุนโครงสร้างของร่างกาย การเคลื่อนไหว การสะสมแร่ธาตุและการสร้างเซลล์เม็ดเลือด กระดูกประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ สารอินทรีย์ และน้ำ โดยสัดส่วนทั้งสามนี้จะแปรเปลี่ยนไปตามอายุของกระดูก สำหรับกระดูกที่เจริญเต็มที่แล้วในผู้ใหญ่จะมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ประมาณร้อยละ 25 สารอินทรีย์ร้อยละ 65 และน้ำร้อยละ 10 ซึ่งส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ (organic matrix) จะประกอบไปด้วยคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ถึงประมาณร้อยละ 93 ที่เหลือจะเป็น proteoglycan และโปรตีนอื่นๆ ซึ่งไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagen proteins) สำหรับส่วนที่เป็นสารอินทรีย์คือ เกลือแร่ต่างๆ ที่จับอยู่กับเนื้อเยื่อที่สำคัญคือแคลเซียมและฟอสเฟต เนื้อเยื่อส่วนนี้จะทำให้กระดูกมีความแข็งแรง (rigidity) และ

สามารถทนต่อแรงอัด ในขณะที่ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์จะช่วยให้กระดูกสามารถต้านทานต่อแรงดึงและแรงบิด (tractional and torsional forces) นอกจากนั้นการจัดเรียงตัวที่เหมาะสมเป็นระเบียบของคอลลาเจน การผสมผสานกันอย่างพอเหมาะของคอลลาเจนและแร่ธาตุต่างๆ ในเนื้อเยื่อมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการที่กระดูกมีอัตราส่วนของความแข็งแรงต่อน้ำหนักสูง (strength to weight ratio) เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างอื่นๆ ในร่างกาย [Duthie, R.B. และคณะ 1983] การพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูกในรูปแบบที่แตกต่างกัน ทำให้กระดูกเป็นอวัยวะที่มีหลายรูปร่างลักษณะ เพื่อให้สอดคล้องกันกับการทำงานของกระดูกในแต่ละส่วน เช่น กะโหลกศีรษะ (skull) ที่มีลักษณะแบนแต่แข็งแรงมากเพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนของสมอง หรือกระดูกต้นขา (femur) ที่มีลักษณะยาวเพื่อเป็นจุดเกาะของกล้ามเนื้อต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกาย เป็นต้น

กระดูกไม่ได้เป็นโครงสร้างที่แข็งทึบเพียงอย่างเดียว หากแต่มีช่องว่างที่อยู่ระหว่างโครงสร้างแข็งในกระดูกแบบยาว จะพบว่าด้านนอกของกระดูกจะมีเนื้อกระดูกที่แข็งมาก ๆ ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า กระดูกเนื้อแน่น (compact bone) ซึ่งมีช่องว่างของเนื้อกระดูกน้อยมาก และคิดเป็นประมาณ 80% ของเนื้อกระดูกในผู้ใหญ่ ส่วนชั้นในของกระดูกจะมีลักษณะที่โปร่งคล้ายเส้นใยสานกัน เรียกว่า กระดูกเนื้อโปร่ง (spongy/cancellous bone) ซึ่งทำให้กระดูกมีความเบา และเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดและไขกระดูก (marrow) ดังรูปที่ 2.1 ด้านนอกสุดของกระดูกจะมีเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) หุ้มอยู่โดยรอบ และมีหลอดเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยงเนื้อกระดูก ยกเว้นที่บริเวณข้อต่อจะไม่มีเยื่อหุ้มกระดูกอยู่ [Elaine, N. และคณะ 2006]



รูปที่ 2.1 ส่วนหัวของกระดูกต้นขาของมนุษย์ตัดตามยาว (<http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>)

เนื้อเยื่อพื้นฐานของกระดูกคือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษ เรียกว่า เนื้อเยื่อกระดูก (osseous tissue) ประกอบด้วยกระดูกคอมโพสิตที่มีความแข็งแรงแต่มีน้ำหนักน้อย ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (calcium hydroxyapatite) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความแข็งเกร็ง (rigidity) โดยมีค่า Compressive Strength 130-180 MPa [Paul, K.C. และคณะ 2008] และต่อต้านแรงกดได้มาก นอกจากนี้ยังมีคอลลาเจน (collagen) เป็นโปรตีนเส้นใยที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกระดูก เมื่อดูโครงสร้างของกระดูกเนื้อแน่นใต้กล้องจุลทรรศน์ จากรูปที่ 2.2 จะพบว่าเนื้อเยื่อกระดูกมีลักษณะที่เป็นวงซ้อนๆกัน โดยมีมีศูนย์กลางเป็นช่องขนาดใหญ่ที่เรียกว่า ช่องฮาเวอร์เซียน (Haversian canal) ซึ่งเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูก และวงรอบๆจะเป็นที่อยู่ของเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่แล้ว ในเนื้อเยื่อกระดูกจะประกอบด้วยเซลล์กระดูก (bone cells) ที่มีส่วนสำคัญในการสร้างและการก่อกำเนิดของกระดูกอีกด้วย

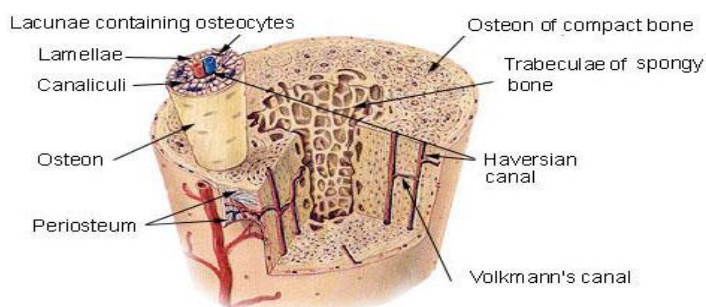
เซลล์กระดูกมีสามชนิด ได้แก่

ออสติโอเบลาสต์ (Osteoblast) เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) เซลล์นี้จะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติออยด์ (osteoid) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้จะมีสารอนินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก นอกจากนี้ออสติโอเบลาสต์ยังสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อกระดูก รวมทั้งสารนอกเซลล์อื่นๆอีกด้วย

ออสติโอไซต์ (Osteocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจากออสติโอเบลาสต์ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว รอบๆเซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลากูนา (lacuna) และแต่ละลากูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็กๆที่เรียกว่า คานาlikuไล (canaliculi) ซึ่งทำให้แต่ละออสติโอไซต์มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาเวอร์เซียนเข้ามาถึงแต่ละเซลล์ผ่านทางช่องดังกล่าวนี้ แต่ออสติโอไซต์จะเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่ แต่มันยังมีหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียมและสารนอกเซลล์อื่นๆด้วย

ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโมโนไซต์ (monocyte stem cells) เซลล์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการก่อกำเนิดกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์แอซิด ฟอสฟาเทส (acid phosphatase) ในการกร่อนเนื้อกระดูก และทำให้กระดูก มีลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้กระบวนการดังกล่าวยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย [Netter F.H. และคณะ 1987]

Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)



รูปที่ 2.2 ภาพแสดงภาคตัดขวางของกระดูกแบบยาว แสดงโครงสร้างภายในของกระดูก

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>)

การสร้างกระดูก (Bone formation)

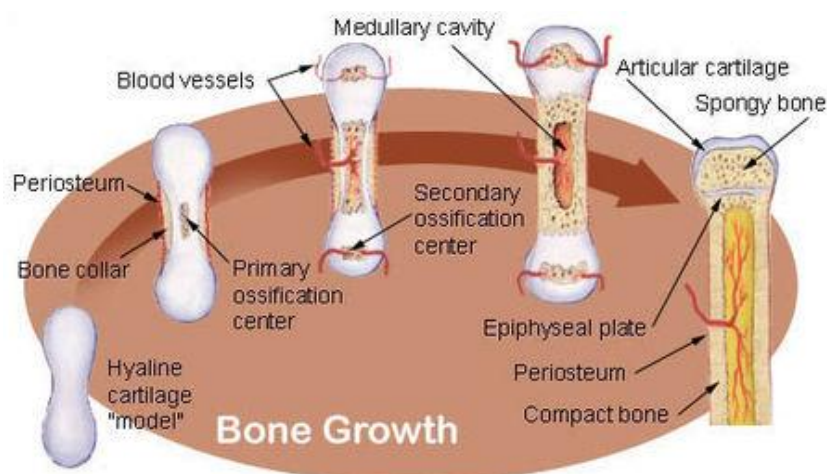
การเจริญพัฒนาของกระดูกจะเริ่มโดยกระบวนการสร้างเนื้อกระดูก (ossification) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

Intramembranous ossification เป็นการสร้างเนื้อกระดูกจากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์ชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดต่างๆ การรวมตัวของเซลล์ดังกล่าวจะทำให้เกิดจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ (primary ossification center) และตามด้วยการสะสมแคลเซียมในบริเวณดังกล่าว การสร้างเนื้อกระดูกในลักษณะนี้มักพบในกระดูกแบบแบน (flat bone)

Endochondral ossification เป็นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีแบบมาจากกระดูกอ่อน (cartilage) ที่มีการเจริญมาก่อนแล้ว โดยที่กลุ่มเซลล์มีเซนไคม์จะเข้าไปแทนที่เซลล์กระดูกอ่อนผ่านทางหลอดเลือดเริ่มจากส่วนกลางของกระดูกซึ่งเป็นจุดการสร้างกระดูกปฐมภูมิ เมื่อเซลล์มีเซนไคม์มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูกจึงมีการสะสมของเนื้อกระดูกมากขึ้น นอกจากนี้พบว่าจะมีจุดการสร้างกระดูกทุติยภูมิ (secondary ossification center) การสร้างกระดูกในทั้งสองจุดจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งมาบรรจบกันที่แนวแผ่นอีพิไฟเซียล (epiphysial plate) ซึ่งเป็นแนวของกระดูกอ่อนที่ยังสามารถทำให้เกิดการยืดของกระดูกได้จนกระทั่งเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ ซึ่งจะถูกแทนที่ด้วยกระดูกทั้งหมด ดังรูปที่ 2.3

แม้กระบวนการเจริญพัฒนาของกระดูกจะหยุดไปแล้ว แต่ยังคงมีกระบวนการก่อรูปของกระดูกอย่างต่อเนื่อง เพื่อซ่อมแซมความเสียหายเล็กๆน้อยๆของกระดูกและเป็นการรักษาระดับแคลเซียมในกระแสเลือดอีกด้วย [Bryan, H. และคณะ 2005] การศึกษาการเกิดแร่ธาตุจากเซลล์

osteoblastic ที่ได้จากการแยกจากเนื้อเยื่อกระดูกของมนุษย์และหนูนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่แยกออกมาได้จะสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในกระดูก เช่น alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin และคอลลาเจน type I ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ primary จากกระดูกของมนุษย์สามารถเลี้ยงไว้ได้นาน 30 วัน และมีปุ่มเล็กที่สร้างขึ้นเซลล์ ซึ่งปุ่มนี้บรรจุไปด้วย matrix ที่หนาแน่น ประกอบไปด้วยผลึกของ calcium phosphate ฝังอยู่ใน matrix กระบวนการปลดปล่อยถุงบรรจุ matrix นี้ก็ออกมาจากเซลล์เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นในการเกิดแร่ธาตุของกระดูก ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องมีการชักนำเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์กระดูกที่ประกอบไปด้วยแร่ธาตุโดยใช้ β -glycerophosphate, glucocorticoids, sodium β -glycerophosphate, calcium hexose monophosphate และ dexamethasone [Kim, U.J. และคณะ 2005]



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเจริญพัฒนาของกระดูก แบบ Endochondral ossification

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>)

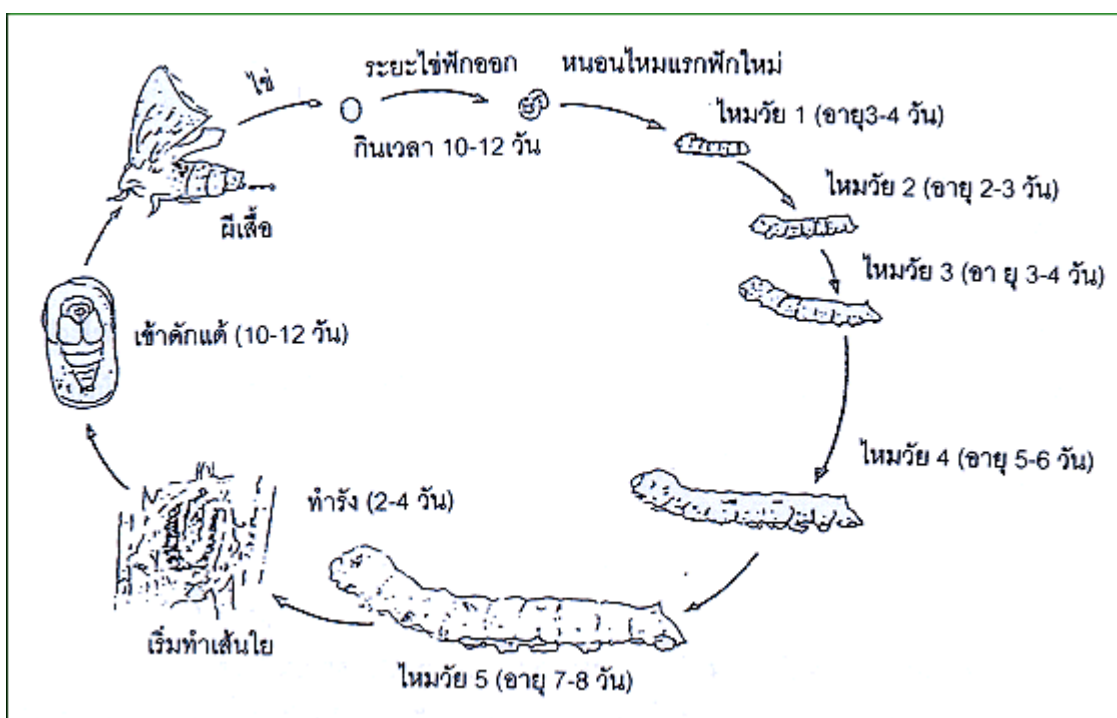
2.4 ชีววัสดุ (Biomaterial)

2.4.1 ไหม [Lv, Q. และคณะ 2005]

ไหม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* อยู่ในวงศ์ *Bombycidae* ตัวอ่อนเรียกว่า ตัวไหม หรือ หนอนไหม ไหมมีการเจริญเติบโต 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่, ระยะตัวหนอน, ระยะดักแด้ และ ระยะตัวเต็มวัยหรือผีเสื้อ

วงจรชีวิตของไหม เริ่มต้นตั้งแต่ผีเสื้อวางไข่ หลังจากวางไข่แล้วประมาณ 10-12 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวหนอนในไข่ไหมชนิดฟักออกธรรมชาติ สำหรับไข่ไหมชนิดฟักออกปีละครั้งจะต้องนำมา

ฟักเทียม เมื่อไข่ฟักออกเป็นตัวหนอน ตัวหนอนจะเริ่มตักกินใบหม่อน ซึ่งตัวหนอนจะมี 5 วัย ใช้เวลาประมาณ 20-25 วัน จากนั้นหนอนไหมจะเริ่มสุก และทำรังห่อหุ้มตัวเอง หนอนไหมจะทำรังเสร็จภายใน 2-4 วัน เมื่อทำรังเสร็จจะกลายเป็นดักแด้อยู่ภายในรังไหมประมาณ 10-12 วัน ก็กลายเป็นผีเสื้อเจาะทะลุรังออกมา หลังจากนั้นผีเสื้อผสมพันธุ์ ตัวเต็มวัยจะเริ่มวางไข่ทันที หลังจากวางไข่เสร็จแล้ว 2-3 วัน จะตาย ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วงจรชีวิตของไหม <http://b.1asphost.com/4592010175/HTML/mai3.html>

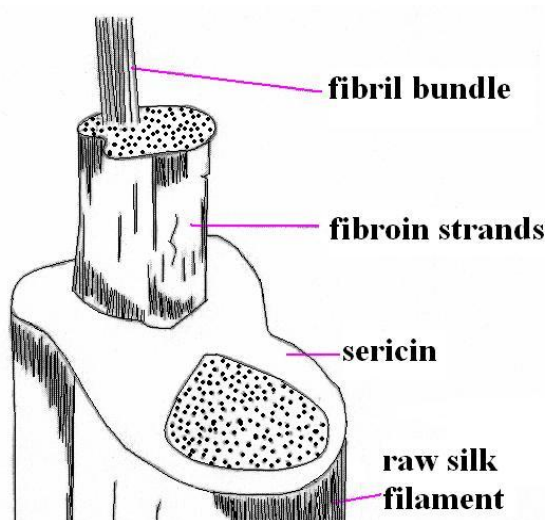
โดยทั่วไปสามารถจำแนกไหมออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1.ไหมป่า (Wild Silk หรือ *Non mulberry silk*) เป็นไหมที่มนุษย์ไม่ได้เพาะเลี้ยง มีหลายชนิด เช่น ไหมป่าทาร์ซา ไหมป่าอีรี

2.ไหมเลี้ยง (Silkworm Silk หรือ *Bombyx mori*) เป็นหนอนไหมที่มนุษย์เพาะเลี้ยงโดยจัดหาอาหาร คือ ใบหม่อนสด ซึ่งไหมชนิดนี้จะมีสีค่อนข้างขาวและหลังการลอกกาวแล้วจะมีความมันเงาเพิ่มขึ้น

ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนที่ได้จากหนอนไหม (Silkworm silk) เส้นใยไหมประกอบด้วย 2 ส่วน คือ เส้นใยไฟโบรอิน (fibroin) ประมาณร้อยละ 70-75 โดยน้ำหนัก และกาวไหมหรือเซริซิน

(sericin) ประมาณร้อยละ 25-30 โดยน้ำหนัก [Vepari, C. และคณะ 2007] ไฟโบรอินที่เป็นองค์ประกอบในเส้นใยไหมสองเส้นจะถูกเคลือบติดกันด้วยเซเรซิน (sericin) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 นอกจากนี้เส้นไหมยังมีไขมันและน้ำมันประมาณร้อยละ 0.5-1 โดยน้ำหนัก และสารสีธรรมชาติอีก ร้อยละ 1-1.4 โดยน้ำหนัก



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเส้นใยไหม

(http://www.en.rmut.ac.th/prd/Journal/Silk_with_figuresnew.pdf)

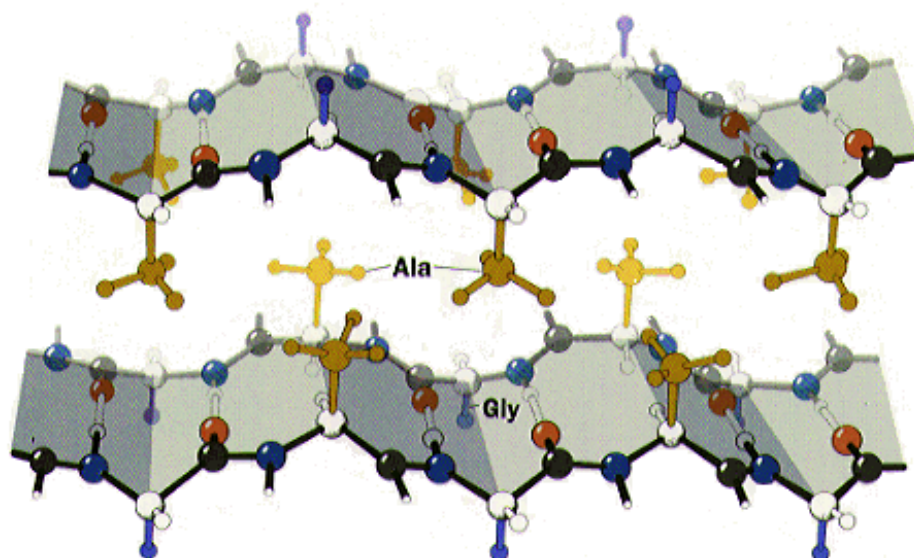
เซรีซิน (sericin)

เซรีซินหรือที่รู้จักกันดีในชื่อของกาวเคลือบเส้นใยไหม ทำหน้าที่ยึดเส้นใยไฟโบรอิน 2 เส้นเข้าไว้ด้วยกัน เซเรซินประกอบด้วยกรดอะมิโนทรีโอนีน (threonine) เซรีซิน (sericin) กรดกลูตามิก (glutamic acid) กรดแอสพาติก (aspartic acid) กรดอาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) เซรีซินจะทำให้เส้นใยไหมมีความแข็ง ขาดความเงางาม มีลักษณะเป็นยางเหนียวคล้ายกาว เนื่องจากสายโซ่โมเลกุลของพอลิเพปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าไฟโบรอิน (น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10-300 kDa) จึงทำให้เซเรซินง่ายต่อการถูกไฮโดรไลซ์หรือทำลายพันธะเพปไทด์ให้เป็นโมเลกุลเล็กๆที่ละลายน้ำได้

เส้นใยไฟโบรอิน (Silk fibroin)

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ ไฟโบรอินมีโครงสร้างเป็นแผ่นพับหรือโครงรูปการเรียงตัวเบตาพลีทเตดซีทแบบไม่ขนาน (β -sheet) และมีทิศทางตรงข้ามกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.6 เส้นใยไฟโบรอินมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 ไมโครเมตร เนื่องจากสายโซ่ของ

พอลิเพปไทด์ที่ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลกับหมู่อะมิโนระหว่างกรดอะมิโนสองตัวและมีน้ำ 1 โมเลกุลเกิดขึ้น ทำให้เส้นใยไฟโบรอินมีความแข็งแรงสูงและไม่ละลายน้ำ โดยที่แต่ละสายโซ่ของเพปไทด์มีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สูง



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน

(<http://www.cem.msu.edu>)

กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบภายในเส้นใยไฟโบรอิน

กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในเส้นใยไฟโบรอิน มีอยู่ 18 ชนิด ซึ่งแต่ละตัวประกอบไปด้วยหมู่ฟังก์ชัน ไฮดรอกซิล คาร์บอนิล และอะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ไฟโบรอินไหมไทย (Thai Silk Fibroin) [She, Z และคณะ 2008]

ไหมไทยจัดอยู่ในไหมเลี้ยงสายพันธุ์ *Bombyx mori* แต่ไหมไทยแตกต่างจากไหม *Bombyx mori* อื่นๆ คือ รังไหมไทยจะมีสีเหลือง และมีกาวไหม (sericin) มากกว่าไหมเลี้ยงชนิดอื่น ตัวอย่างรังไหมพันธุ์ไหมไทย พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.96 กรัม/รัง ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร พันธุ์นางลายมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.68-1.64 กรัม/รัง นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ไหมไทยลูกผสม เช่น พันธุ์ผสมอุบลราชธานี 60-35 (ดอกบัว) ซึ่งมาจากการผสมพันธุ์ระหว่างไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 กับไหมไทยพันธุ์อุบลราชธานี 60 รังไหมมีสีเหลืองหนักประมาณ 1.4 กรัม/รัง

ตารางที่ 2.1 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเส้นใยไฟโบรอิน
(<http://dspace.library.drexel.edu/retrieve/4251/CHAPTER2.pdf>)

Amino Acid	Symbol	Charge	Hydrophobic/ Hydrophilic	Amount (g/100 g silk fibroin)
Alanine	Ala	neutral	hydrophobic	32.4
Glycine	Gly	neutral	hydrophilic	42.8
Tyrosine	Tyr	neutral	hydrophilic	11.8
Serine	Ser	neutral	hydrophilic	14.7
Aspartate	Asp	negative	hydrophilic	1.73
Arginine	Arg	positive	hydrophilic	0.9
Histidine	His	positive	hydrophilic	0.32
Glutamate	Glu	negative	hydrophilic	1.74
Lysine	Lys	positive	hydrophilic	0.45
Valine	Val	neutral	hydrophobic	3.03
Leucine	Leu	neutral	hydrophobic	0.68
Isoleucine	Ile	neutral	hydrophobic	0.87
Phenylalanine	Phe	neutral	hydrophobic	1.15
Proline	Pro	neutral	hydrophobic	0.63
Threonine	Thr	neutral	hydrophilic	1.51
Methionine	Met	neutral	hydrophobic	0.1
Cysteine	Cys	neutral	hydrophobic	0.03
Tryptophan	Trp	neutral	hydrophilic	0.36

การลอกกาวยไหม (Silk degumming) [Kaeyanon, C. และคณะ 2005]

การลอกกาวยไหมเป็นกระบวนการแรกที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อกำจัดกาวยไหม หลักการลอกกาวยไหมคือ การไฮโดรไลซ์กาวยไหมหรือทำลายพันธะเพปไทด์ของกาวยไหมให้เป็นโมเลกุลเล็กๆที่ละลายน้ำได้ เช่น กรดอะมิโนและโพลิโกเมอร์ของกรดอะมิโน การไฮโดรไลซ์กาวยไหมทำได้หลายวิธีเช่น การใช้กรด ต่าง เอนไซม์ หรือแม้กระทั่งการใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงภายใต้ความดัน สบู่ก็เป็นสารที่นำมาใช้ในการลอกกาวยไหมได้ วิธีลอกกาวยไหมได้แก่

1. การลอกกาวยไหมด้วยกรด (Acid degumming)

ในการลอกกาวยไหมด้วยสารละลายกรดที่ pH น้อยกว่า 2.5 หรือระหว่าง 1.5-2 กาวยไหมจะถูกกำจัดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ กรดแร่ (mineral acids) ได้แก่ กรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริกจะมีประสิทธิภาพในการลอกกาวยไหมมากกว่ากรดอินทรีย์ (organic acids) pH ของสารละลายกรดจะมีผลต่อระดับการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ของเส้นใยไฟโบรอินด้วย [Gulrajani M.L. และคณะ 1992] อย่างไรก็ตาม การทดลองลอกกาวยไหมเลี้ยงพันธุ์ *Bombyx mori* ด้วยกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น tartaric acid, succinic acid เป็นต้น พบว่ากรดอินทรีย์ต่างๆ จะให้ผลใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาความสามารถในการกำจัดกาวยไหมโดยดูจากร้อยละของน้ำหนักไหมที่หายไป แต่หากพิจารณาร้อยละของน้ำหนักไหมสูญหายไปและความเหนียวของเส้นใย (tenacity) ภายหลังกลอกกาวย พบว่า succinic acid จะให้ผลดีที่สุด รองลงมาได้แก่ tartaric acid จากผลการวิจัยพบว่าหากลอกกาวยไหมด้วย tartaric acid สูตรที่ได้ผลสูงสุดคือ tartaric acid 8 กรัม/ลิตร

2. การลอกกาวยไหมด้วยด่าง (Alkaline degumming)

ในการลอกกาวยไหมด้วยสารละลายด่างนั้น ต้องคำนึงถึง pH และอุณหภูมิ โดยหากลอกกาวยไหมด้วยสารละลายที่ pH มากกว่า 9 กาวยไหมจะถูกกำจัดออกได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ หลังจากทำการลอกกาวยได้เพียง 30 นาทีเท่านั้น อุณหภูมิที่ใช้ไม่ควรเกิน 90 องศาเซลเซียส เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เส้นไหมเปื่อย และ pH ของสารละลายด่างจะมีผลต่อระดับการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ของเส้นใยไฟโบรอิน อย่างไรก็ตามสารละลายด่างที่ใช้ในการลอกกาวยไหมไม่ควรใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (caustic soda, NaOH) และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (caustic potash, KOH) เพราะจะทำลายเส้นไหมได้ ต่างที่ใช้ในการลอกกาวยไหมจึงมักเป็นโซเดียมคาร์บอเนต (โซดาแอช)

คุณสมบัติของไหม [Zhang, F. และคณะ 2009]

เส้นใยไหมโดยธรรมชาตินั้นมีคุณสมบัติในการต้านแรงดึงได้สูง (High tensile strength) มีความเหนียวและยืดหยุ่นสูง (อาจสูงได้ถึง 35%) และสามารถคงรูปได้ในอุณหภูมิสูงถึง 250 องศาเซลเซียส ไหมเป็นสารพอลิเมอร์ที่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพและสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและไม่นำไฟฟ้า

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากไหม [Biman, B. และคณะ 2009]

จากสมบัติของไหมดังกล่าวในข้างต้น ทำให้มีการนำไหมมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น สิ่งทอ เครื่องสำอาง รวมทั้งมีการนำไหมมาประยุกต์ใช้ในงานทางการแพทย์และทางวิศวกรรม เนื้อเยื่อ อาทิเช่น ไหมละลาย ผ้าปิดแผล โครงเลี้ยงเซลล์ ตัวนำส่งยา เป็นต้น ดังรูปที่ 2.7

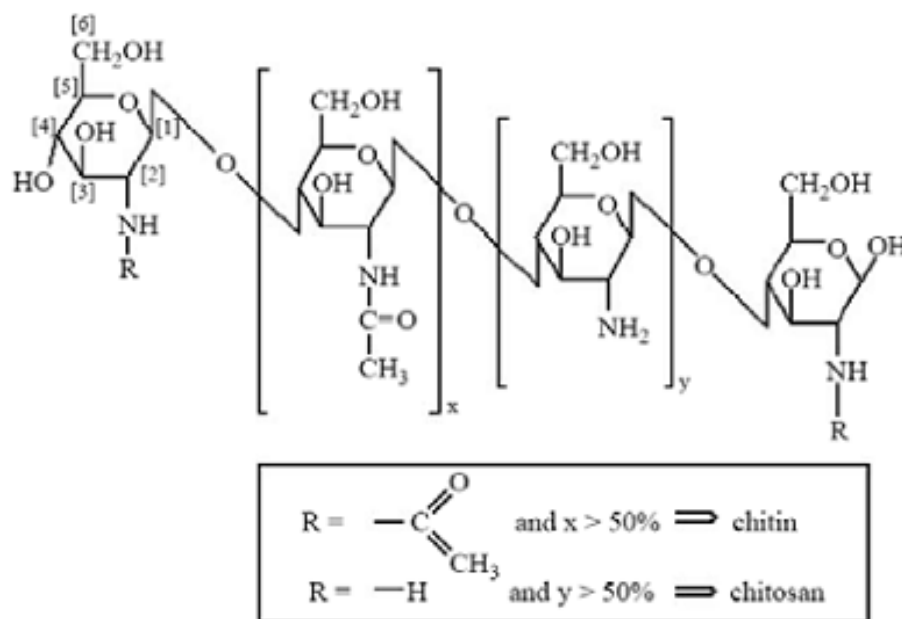


รูปที่ 2.7 การประยุกต์ใช้งานของไหม

(http://www.sumitomo.gr.jp/english/discoveries/special/images/silk_p16.jpg)

2.4.2 ไคโตซาน [Crini, G. และคณะ 2008]

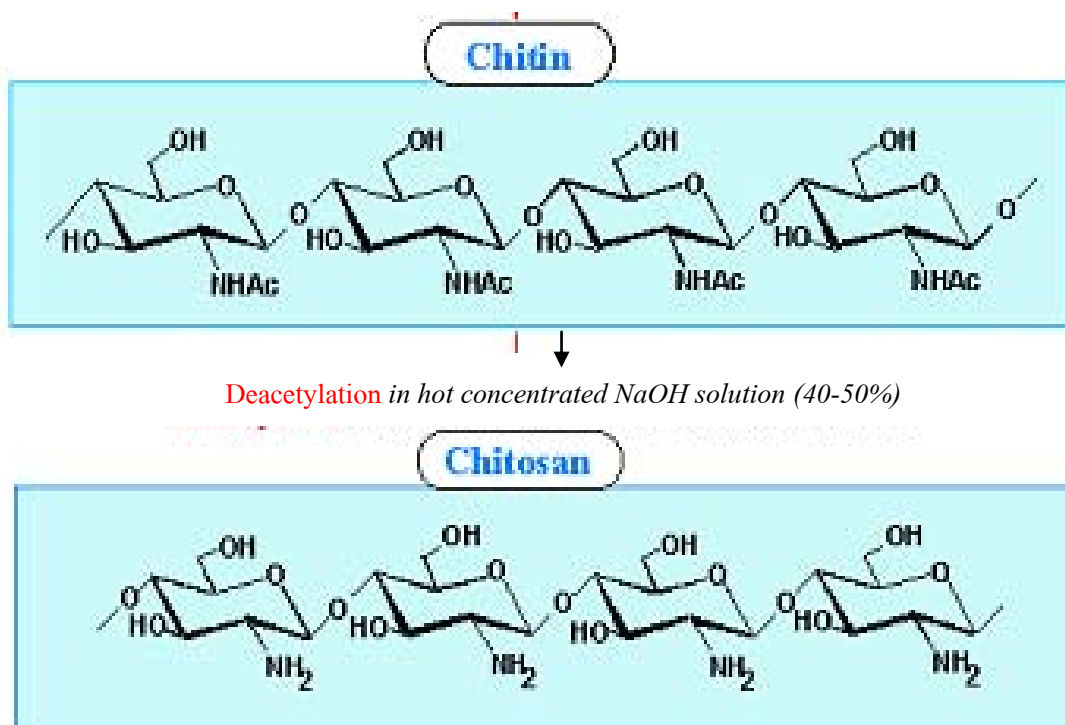
ไคตินและไคโตซานเป็นพอลิแซคคาไรด์ มีองค์ประกอบสำคัญในรูปของ 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose (or N-acetyl-glucosamine) สำหรับไคติน และ 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose (or N-glucosamine) สำหรับไคโตซาน ไคตินได้มาจากเปลือกของสัตว์จำพวก กุ้ง ปู และ แคนปลาหมึก การแบ่งแยกระหว่างไคตินกับไคโตซาน พิจารณาจากค่า “degree of deacetylation (DD)” โดยที่ degree of deacetylation คือ เปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation เป็นการเปลี่ยนน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine เป็น glucosamine คือถ้า %DD มีค่ามากกว่า 50% จะจัดอยู่ในประเภทไคโตซาน แต่ถ้า %DD มีค่าต่ำกว่า 50% จะจัดอยู่ในประเภทไคติน ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน โดยจำแนกจากจำนวนหมู่ฟังก์ชัน

[Suh, J. K. F. และคณะ 2000]

ไคโตซาน เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้จากการนำไคตินไปผ่านกระบวนการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) ทำให้ acetamide group ของไคติน ถูกเปลี่ยนเป็น amino group (-NH₂) ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ไคโตซานมีประจุบวก สามารถละลายในกรดที่มีค่า pH ต่ำกว่า 6 มีลักษณะโดดเด่นเฉพาะตัว คือ เป็นวัสดุชีวภาพที่ย่อยสลายตามธรรมชาติ ไม่ไวไฟ ไม่เป็นพิษต่อพืช (non-phytotoxic) และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของเซลล์ โดยมีรายงานว่า Deacetylation degree จะส่งผลต่อการชอบน้ำของไคโตซานและความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพ [Suh, J. K. F. และคณะ 2000] ส่วนน้ำหนักโมเลกุลจะส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายของไคโตซาน สมบัติเชิงกลและสมบัติทางชีวภาพของไคโตซานอีกด้วย โดยไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929) ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง [Tangsadthakun, C. และคณะ 2007] ไคโตซานมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งานโดยเฉพาะกับการนำไปใช้งานในร่างกายมนุษย์ เนื่องจากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงจะไม่ละลายน้ำที่ pH เป็นกลาง (7.4) [Bhatnagar, A. และคณะ 2009]



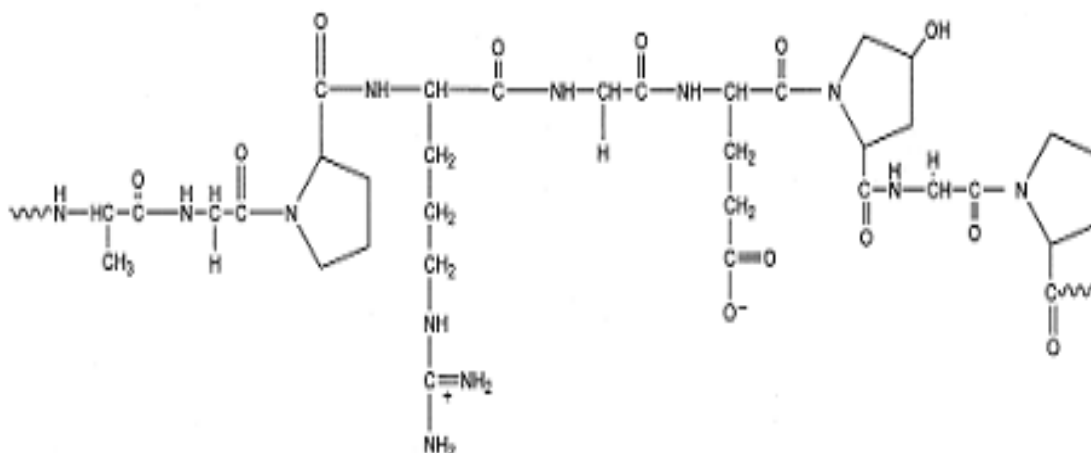
รูปที่ 2.9 กระบวนการเตรียมไคโตซานจากไคติน

[Pillai, C.K.S. และคณะ 2009]

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ได้มาจากการไฮโดรไลซิส ไคโตซาน ด้วยเอนไซม์หรือกรด ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างเช่นเดียวกับไคโตซานแต่ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและละลายน้ำที่ pH เป็นกลาง (7.4) จากการนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มาทำการศึกษา มีการรายงานพบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกสามารถเจริญเติบโตได้ดี [Ratanavaraporn, J. และคณะ 2010] และเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย [Chen, Y.J. และคณะ 2009]

2.4.3 เจลาติน (Gelatin) [Tabata, Y. และคณะ 1998]

เจลาตินเป็นสารอินทรีย์เคมีประเภทโปรตีนสายเดี่ยว โครงสร้างของเจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆประมาณ 18 ชนิด ที่เชื่อมกันด้วยพันธะเพปไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.10



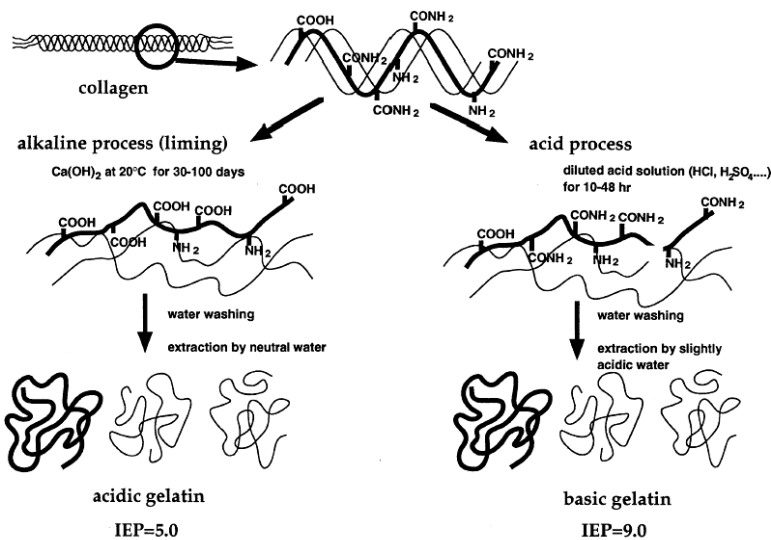
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเจลาติน (www.lsbu.ac.uk/water/hygel.html)

เจลาตินมีโครงสร้างเป็นแบบ random coil ละลายน้ำ เนื่องจากเจลาตินสกัดมาจากคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อ ผิวหนัง และกระดูกของมนุษย์และสัตว์ ทำให้สายโซ่โมเลกุลของคอลลาเจนแตกออกกลายเป็นสายโซ่ที่สั้นลง จึงทำให้โครงสร้างพื้นฐานของเจลาตินเหมือนกับคอลลาเจน การแตกของสายโซ่ทำให้เจลาตินมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลที่กว้างมากคือตั้งแต่ 2,000 จนถึงหลายแสนอะตอม ในแต่ละสายโซ่ของพอลิเพปไทด์ประกอบด้วยหน่วยที่ซ้ำกันของ Gly-Pro-Pro และ Gly-Pro-hydroxypro เป็นส่วนใหญ่ [Segtnan, V. และคณะ 2004] ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในเจลาตินสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.2

ขั้นตอนในการผลิตเจลาตินเริ่มจาก การสกัดเจลาตินจากคอลลาเจนด้วยกระบวนการ acidic หรือ alkaline process แล้วจึงผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (Purification) เพิ่มความเข้มข้นและการทำให้แห้ง เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ Basic gelatin หรือ เจลาตินชนิด A และ Acidic gelatin หรือเจลาตินชนิด B ดังแสดงได้ในรูปที่ 2.11

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบในเจลาติน [Tabata, Y. และคณะ 1998]

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



รูปที่ 2.11 แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin

[Tabata, Y. และคณะ 1998]

Acidic gelatin

Acidic gelatin (ชนิด B) ได้มาจาก alkaline process ซึ่งเป็นกระบวนการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจนโดยใช้เบส ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลปริมาณมากทำให้เจลาตินมีประจุลบ และมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0 เหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส

Basic gelatin

Basic gelatin (ชนิด A) ได้มาจาก acid process โดยใช้กรดในการไฮโดรไลต์ สกัดได้ยากกว่าแบบ alkaline process เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดกับกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจนมีน้อยจึงทำให้เจลาตินมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนและเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด สมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B สรุปดังตารางที่ 2.3

โดยทั่วไปเจลาติน ถูกนำไปใช้งานทางด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการช่วยสนับสนุนให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี พร้อมทั้งช่วยในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยาและส่วนประกอบภายในอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ [Young, S. และคณะ 2005]

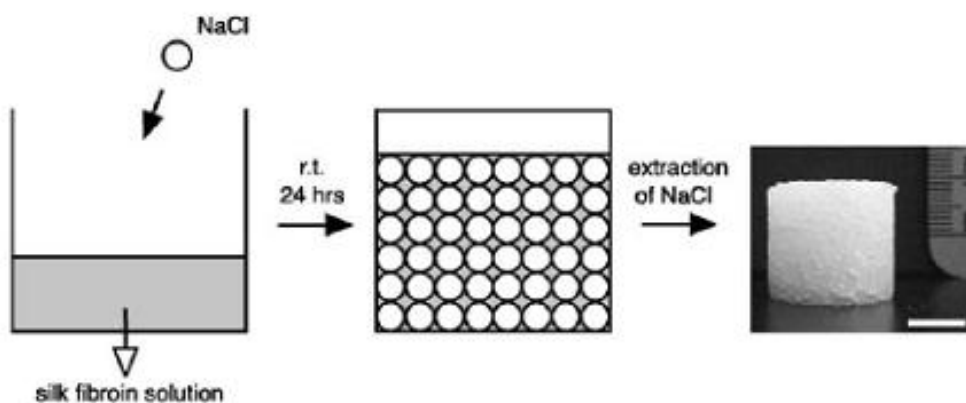
ตารางที่ 2.3 ตารางแสดงสมบัติของเจลาติน ชนิด A และ B [Tabata, Y. และคณะ 1998]

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

2.5 Porogen leaching [Sang, B.L. และคณะ 2005]

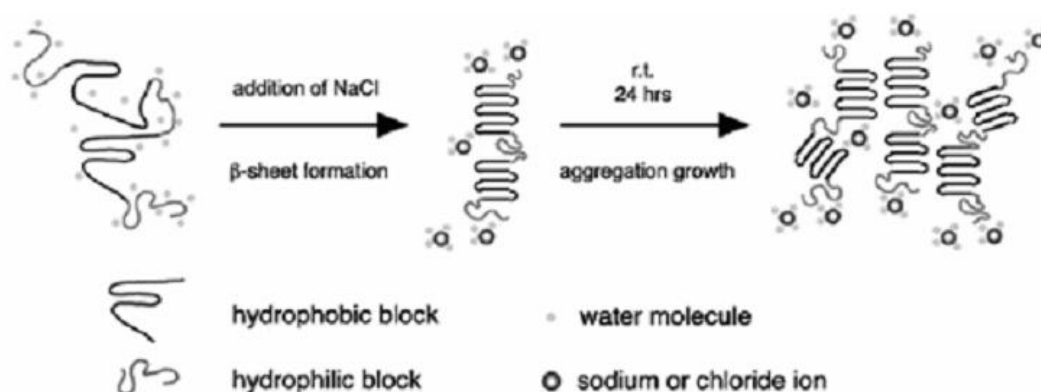
Porogen leaching เป็นเทคนิควิธีการอย่างหนึ่งในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) โดยการทำให้เกิดรูพรุนขึ้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยใช้วัสดุที่ทำให้เกิดรูพรุน เช่น เกลือ, น้ำตาล, รวมทั้งพอลิเมอร์ก็สามารถนำมาใช้ได้ เช่น poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) และ poly caprolactone (PCL) [Guang, C. และคณะ 2005] จากนั้นทำการกำจัดอนุภาคของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนออกด้วยน้ำ หรือสารละลายต่างๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ข้อดีสำหรับวิธี porogen leaching คือสามารถควบคุมขนาดของรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ เนื่องจากสามารถกำหนดขนาดอนุภาคของวัสดุที่นำมาใช้ในการเตรียมให้เกิดรูพรุนได้

การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินด้วยวิธี porogen leaching นิยมใช้เกลือเป็นวัสดุที่ทำให้เกิดรูพรุนขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ จึงเรียกรูปวิธีการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์นี้ว่า Salt-leaching [Kim, U.J. และคณะ 2005, Lee, S.B. และคณะ 2005] โดยมีขั้นตอนในการขึ้นรูปดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 กระบวนการ Salt-leaching [Kim, U.J. และคณะ 2005]

การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ (Silk fibroin scaffold) ทำได้โดยการเติมผลึกเกลือที่มีการคัดขนาดอนุภาคลงในสารละลายไหมไฟโบรอิน (Silk fibroin solution) หลังจากที่ทำกรเติมเกลือลงไปแล้ว เกลือจะเกิดการแตกตัว Na^+ และ Cl^- โดยที่ Na^+ จะเข้าไปรวมตัวกับน้ำ และไปสอดแทรกอยู่ภายในพื้นผิวของโปรตีน ซึ่งโมเลกุลของน้ำจะถูกกำจัดออกมาได้ง่ายจากโปรตีนเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงมากขึ้น จะเกิดการเชื่อมพันธะระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้น ทำให้ไหมเกิดการเจลดัวเกิดเป็นโครงสร้าง beta-sheet แสดงได้ในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 กลไกกระบวนการ Salt-leaching [Kim, U.J. และคณะ 2005]

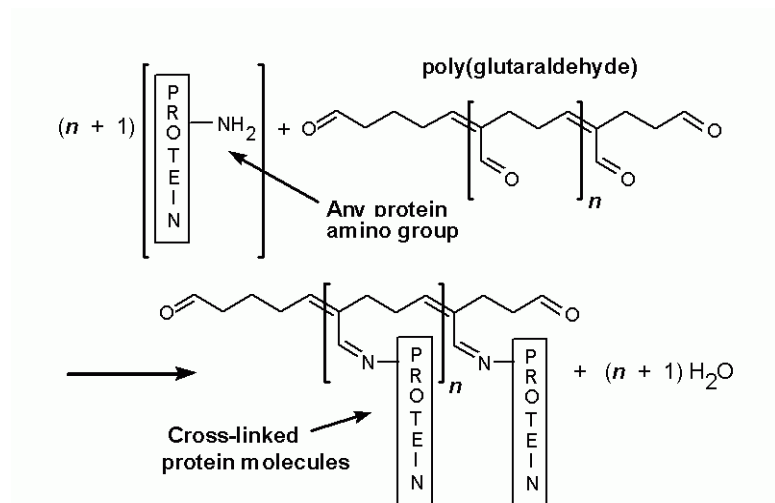
2.6 การเชื่อมขวาง (crosslinking) [Yunoki, S. และคณะ 2003]

การเชื่อมขวางเป็นวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญมากในการปรับปรุงสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ประเด็นหลักคือการเชื่อมขวางพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำทำให้ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้ช้าลง เนื่องจากการเชื่อมขวางนั้นเป็นการทำให้สมบัติเชิงกล (mechanical properties) อัตราการย่อยสลาย (degradation rate) และความสามารถในการบวมน้ำ (swelling capacity) ของโครงเลี้ยงเซลล์มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น ซึ่งกระบวนการเชื่อมขวางนั้นมีหลายวิธี โดยจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือการเชื่อมขวางทางกายภาพและการเชื่อมขวางทางเคมี

2.6.1 การเชื่อมขวางทางเคมี เป็นกระบวนการเชื่อมขวางที่ใช้สารเคมีในการเชื่อมขวาง ซึ่งสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ สารที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (เช่น Glutataldehyde (GA), formaldehyde), N-hydroxysuccinimide (NHS และ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) เป็นต้น [Zhang, Y. และคณะ 2006]

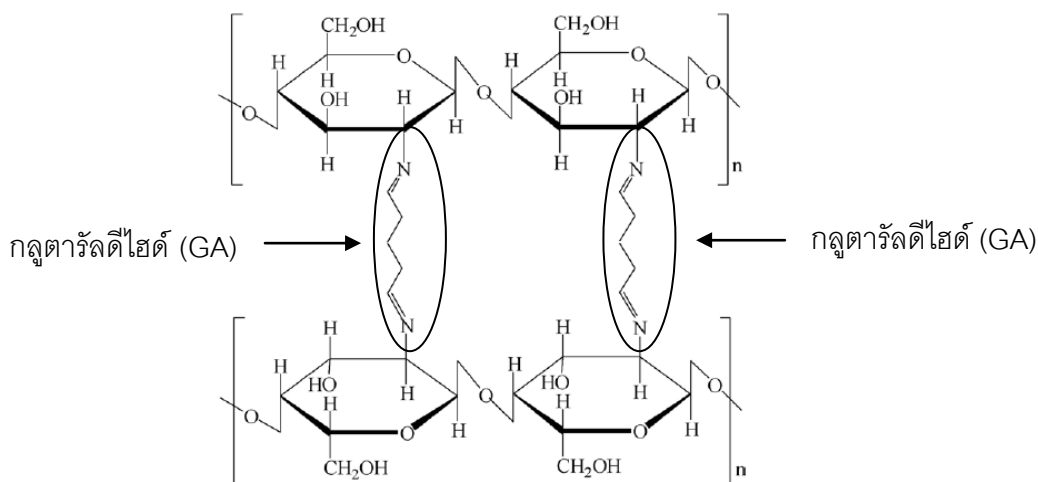
2.6.1.1. การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutataldehyde)[Ma, L และคณะ 2003]

Glutataldehyde (GA) เป็นคาร์บอนห้าอะตอมสายโซ่ตรงซึ่งมีจุดเด่นที่ปลายโซ่ทั้งสองข้าง กล่าวคือ จะมีหมู่แอลดีไฮด์อยู่ที่ปลายสายโซ่ และการที่มีหมู่แอลดีไฮด์อยู่จะช่วยทำหน้าที่ในการเชื่อมขวางหมู่อะมิโนของโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (<http://publish.uwo.ca>)

ตัวอย่างการเชื่อมขวางโปรตีนคอลลาเจนจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA และหมู่เอมีน (-NH₂) ของคอลลาเจน เมื่อความเข้มข้นของ GA เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการบวมตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงเนื่องจากการเชื่อมขวางเป็นการทำให้สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น จึงทำให้ความชอบน้ำ (hydrophilic) ของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันจะมีระดับของการย่อยสลายทางชีวภาพที่ไม่เท่ากัน พบว่าเมื่อทำการเชื่อมขวางด้วย GA จะช่วยลดระดับของการย่อยสลายทางชีวภาพให้ช้าลง โดยพบว่าถ้าใช้คอลลาเจนเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว จะเกิดการย่อยสลายที่รวดเร็ว จึงมีการทำการศึกษาเพื่อปรับปรุงสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำวัสดุชีวภาพตัวอื่นมาผสมรวมเข้ากับคอลลาเจน ซึ่งไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพตัวหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ ช่วยด้านทานการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยไคโตซานสามารถใช้หมู่เอมีน (-NH₂) ในการเชื่อมขวางกับหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในรูปที่ 2.15 [Ma, L. และคณะ 2003]

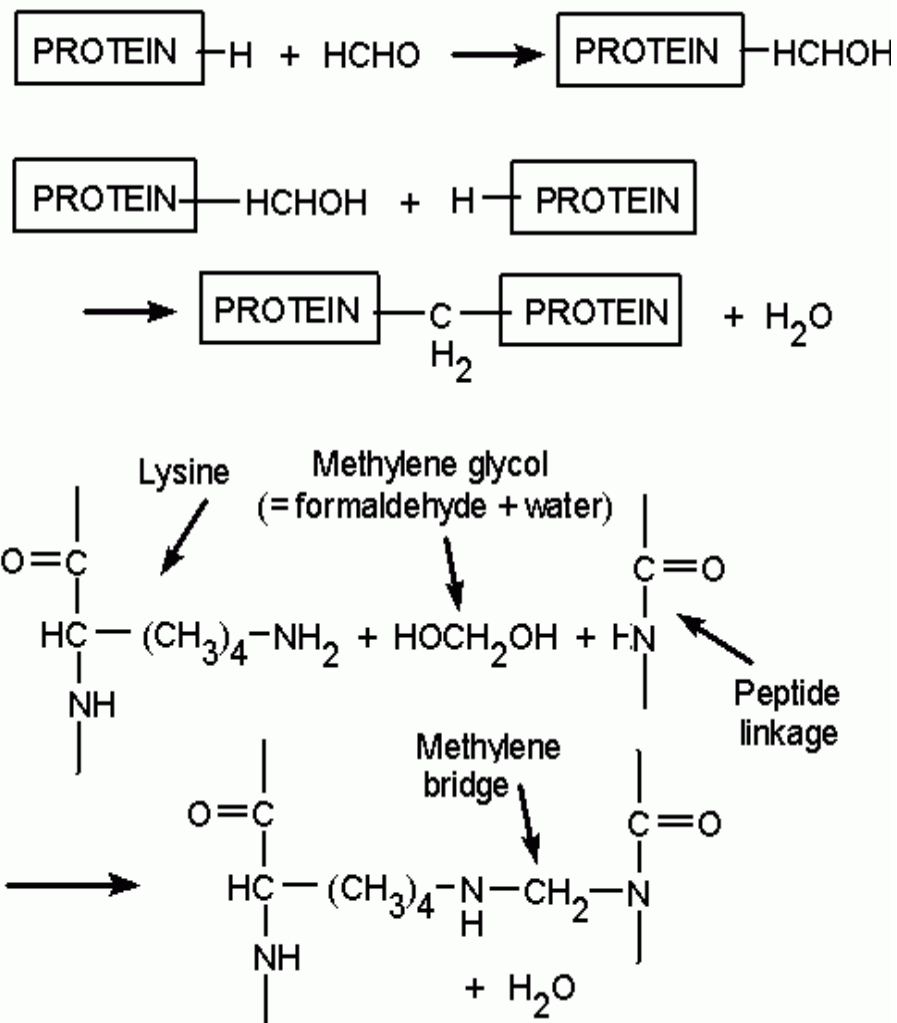


รูปที่ 2.15 โครงสร้างของไคโตซานถูกเชื่อมโยงพันธะด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [Ma, L. และคณะ 2003]

การใช้กลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมขวางพันธะมีข้อดีคือ การเชื่อมขวางจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง แต่ก็มีข้อเสียที่สำคัญก็คือ กลูตารัลดีไฮด์ เป็นสารที่มีพิษต่อร่างกายและเซลล์ ดังนั้นเมื่อทำการเชื่อมขวางเสร็จสิ้นแล้วต้องทำการกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ที่เหลือออก มิฉะนั้นแล้วจะเกิดอันตรายได้ เมื่อนำไปใช้งาน

2.6.1.2. การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde)

เป็นการเชื่อมขวางอีกวิธีที่ใช้หลักการเดียวกันกับการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ คือ หมู่อัลดีไฮด์ จะทำหน้าที่ในการเชื่อมขวางพันธะหมู่อะมิโนของโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 2.16 โดยมีข้อแตกต่างคือการเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ จะมีความเป็นพิษต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และมีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์

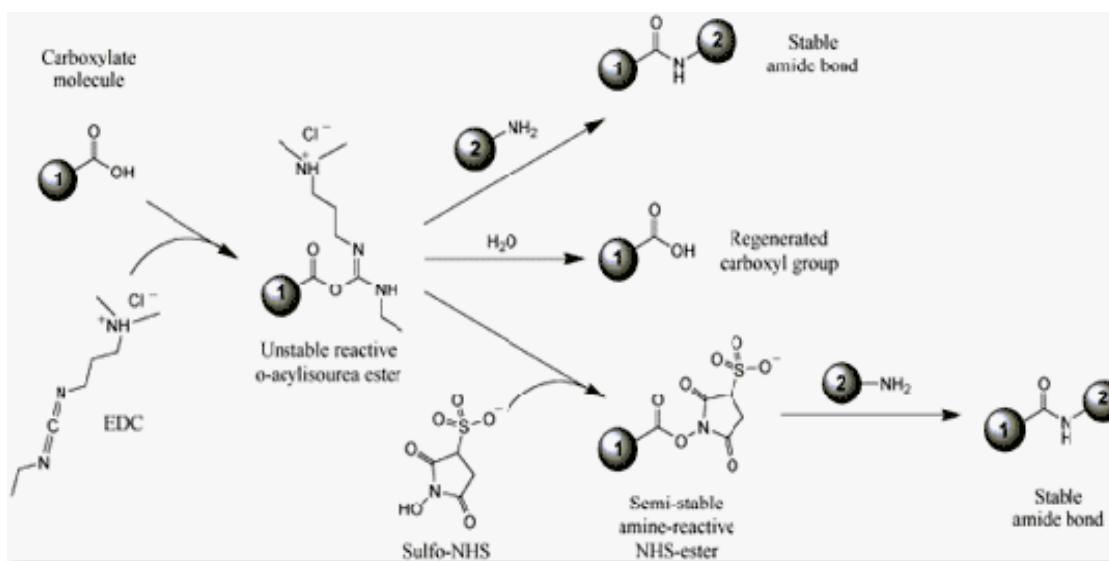


รูปที่ 2.16 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (<http://publish.uwo.ca>)

2.6.1.3. การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)

[Pieper, J. และคณะ 2000]

การเชื่อมขวางด้วย EDC เป็นวิธีการที่น่าสนใจ และได้รับความนิยมเป็นอันมาก เนื่องจากจุดเด่นของการเชื่อมขวางด้วย EDC คือ ภายหลังสิ้นสุดกระบวนการเชื่อมขวางจะได้อนุพันธ์ของยูเรียหรือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea ซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และสามารถกำจัดออกได้ง่ายด้วยน้ำ ซึ่งการเชื่อมขวางด้วย EDC เป็นการเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 การเชื่อมขวางด้วย EDC

(http://www.piercenet.com/media/edc_coupling)

ความแตกต่างระหว่างการใช้สารเคมี EDC และ GA

ความแตกต่างระหว่างการใช้สารเคมี EDC และ GA ในการเชื่อมขวางคือ โมเลกุลของ EDC จะไม่ตกค้างอยู่ในโมเลกุลที่ถูกเชื่อมขวาง เนื่องจากผลิตภัณฑ์หลังการเชื่อมขวาง คือ อนุพันธ์ของยูเรีย หรือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea ที่สามารถกำจัดออกได้โดยการละลายน้ำ ทำให้ไม่มีสารตกค้างในโมเลกุลของโปรตีน ด้วยเหตุนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย EDC จึงมีความเป็นพิษต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม EDC กำลังอยู่ในระหว่างกระบวนการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา [Lee, J.M. และคณะ 1996] ส่วนการเชื่อมขวางโดยใช้ GA จะมี GA อยู่ที่หมู่ที่ถูกเชื่อมขวาง ซึ่งมักจะมีกระบวนการกำจัดหมู่ aldehyde ที่ตกค้างอยู่ได้โดยการล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย glycine เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับ GA ที่เหลืออยู่และล้างออกด้วยน้ำ [Carmen, A.C. และคณะ 2003] นอกจากนี้ GA ยังได้รับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาจากประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วในปัจจุบัน [U.S. Food and Drug Administration. March 3, 2006]

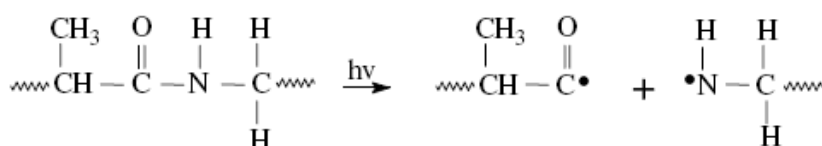
2.6.2 การเชื่อมขวางทางกายภาพ ได้แก่ การใช้ความร้อน (dehydrothermal treatment; DHT) การใช้รังสี เช่น Ultraviolet Irradiation เป็นต้น

2.6.2.1. การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment; DHT)

การเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนหรือที่เรียกว่า DHT เป็นการเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีน (amine) ของสายโซ่โปรตีน และหมู่คาร์บอกซิลิกของสายโซ่โปรตีนที่อยู่ใกล้กัน โดยอาศัยความร้อนและจะมีการขับน้ำออกมา 1 โมเลกุล ส่งผลทำให้ความสามารถในการทนแรงดึงเพิ่มขึ้น และความสามารถในการกักเก็บน้ำลดลง [Wess, T. และคณะ 2000] และจุดเด่นข้อหนึ่งของการใช้ความร้อนในการเชื่อมขวางคือ เป็นวิธีการเชื่อมขวางที่ไม่ใช้สารเคมี ทำให้ไม่มีสารเคมีตกค้างหลังการเชื่อมขวาง แต่การเชื่อมขวางด้วยความร้อนจะเกิดขึ้นได้เฉพาะหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ใกล้กันเท่านั้น ทำให้การเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีขอบเขตที่จำกัด และประเด็นที่สำคัญคือ ความร้อนอาจทำให้โปรตีนเสียสภาพ (denature) ได้ ดังนั้นจึงมักใช้การเชื่อมขวางด้วยความร้อนควบคู่กับการเชื่อมขวางด้วยวิธีการอื่นๆ [Friess, W. และคณะ 1998] ตัวอย่างการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนเช่น โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตมาจากคอลลาเจนถูกปรับปรุงให้มีความแข็งแรงมากขึ้น และมีการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้าลงด้วยการเชื่อมขวางระหว่างสายโซ่ (inter chain crosslinks) ด้วยปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) ในการเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT ซึ่งจะทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงและปริมาณการดูดน้ำในโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงด้วย ส่งผลให้ความต้านทานแรงดึงเพิ่มขึ้น แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของคอลลาเจน ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนมีขนาดเล็กลง [Pieper, J. และคณะ 2000] นอกจากนี้ได้มีการนำวิธี DHT ไปใช้ร่วมกับการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี EDC/NHS สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากคอลลาเจนผสมกับ chondroitin-6-sulfate โดยผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนคอลลาเจน 92% และ chondroitin-6-sulfate 8% ด้วยเทคนิคการทำแห้งแข็ง (freeze-drying) ก่อนแล้วจึงนำมาเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT ในตู้อบสูญญากาศ ที่สภาวะ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความร้อนภายใต้สูญญากาศจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์ที่อยู่ติดกันของหมู่ $-NH_2$ และ $-COOH$ ของคอลลาเจนและหมู่ $-OH$ ของ chondroitin-6-sulfate ซึ่งสามารถเพิ่มความสามารถในการบวมน้ำสูงขึ้น 1.5 เท่า และเพิ่มความแข็งแรงทางกลสูงขึ้น 3 เท่าให้กับโครงเลี้ยงเซลล์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี EDC/NHS ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว [Pek, Y.S. และคณะ 2004]

2.6.2.2. การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสีอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Irradiation, UV)

เป็นกระบวนการนำเอารังสีมาใช้ในการเชื่อมขวางอิเล็กตรอนอิสระของหมู่อะโรมาติก และ อิเล็กตรอนอิสระของหมู่อะมิโนในเจลาตินและคอลลาเจน เช่น ไทโรซีนและฟีนิลอะลานีน ซึ่งจะทำให้ ปริมาณความหนาแน่นของการเชื่อมขวางที่สูงมาก ระยะเวลาในการเชื่อมขวางสั้น และไม่ ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้าง แต่ถ้ระยะเวลาในการฉายรังสีนานเกินไปจะทำให้สายโซ่โปรตีนของ เจลาตินถูกตัดให้สั้นลง [Wess, T. และคณะ 2000] ตัวอย่างการเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสี UV เกิดจากการป้อนรังสี UV โดยกระบวนการ photodegradation เข้าไปตัดโซ่ระหว่างพันธะภายใน โมเลกุลของคอลลาเจนเกิดเป็นฟรีเรดิคัล (free radical) ของหมู่เอมีนอิสระขึ้น ซึ่งหมู่เอมีนอิสระ ที่เกิดขึ้นนี้จะไปเชื่อมขวางกับหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนโมเลกุลอื่นทำให้เกิดการเชื่อมขวาง ระหว่างหมู่เอมีนขึ้น ดังรูปที่ 2.18 [Sionkowska, A. และคณะ 2006]



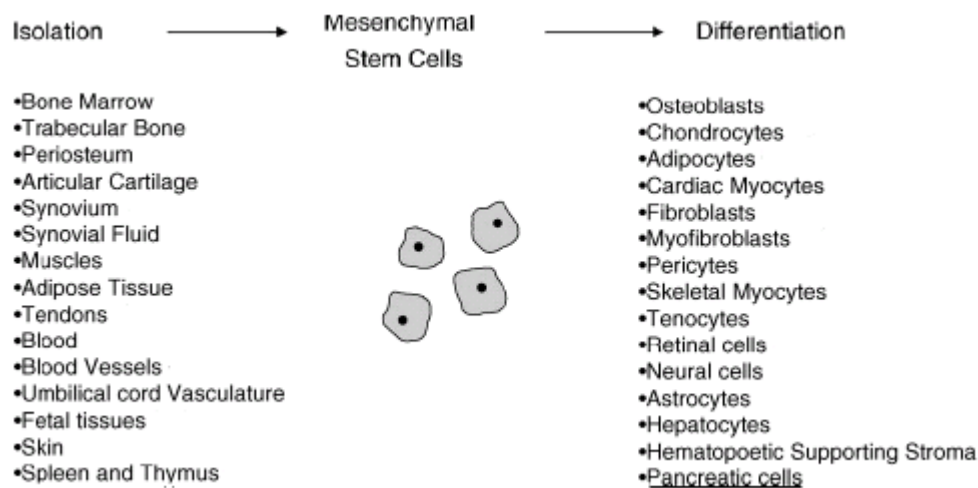
รูปที่ 2.18 การเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางโดยการใช้อัลตราไวโอเล็ต

[Sionkowska, A. และคณะ 2006]

2.7 Mesenchymal stem cell (MSC)

Mesenchymal stem cell เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อ ชนิดต่างๆ ได้ เช่น กระดูก, กระดูกอ่อน, เนื้อเยื่อไขมัน, เส้นเอ็นและกล้ามเนื้อ ดังแสดงในรูปที่ 2.19 MSC สามารถแยกออกมาจากไขกระดูก เนื้อเยื่อไขมันและเลือดสายสะดือ (cord blood) เป็นต้น ในปี 1995 Lennon และคณะ แยก MSC จากไขกระดูกของ Fisher F-344 rat อายุ 2-4 เดือน [Lennon, D.P. และคณะ 1995] เซลล์ MSC เมื่อนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์ยึดเกาะ บนจานเลี้ยงเซลล์และเริ่มเจริญเติบโตรวมกันเป็นกลุ่มหรือเรียกว่า fibroblastic-like cell cluster (fibroblast colony forming units: CFU-F) [Sautier, J.M. และคณะ 1993] การควบคุมให้ MSC เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ สามารถทำได้โดยการใส่ growth factor และ cytokines เป็นต้น นอกจากนี้การกำหนดให้เซลล์ MSC เปลี่ยนรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดใดนั้น ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ โดยหลังจากการแยก MSC จากไขกระดูกและ ต้องการเลี้ยงเซลล์ MSC ให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กระดูกควรใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี

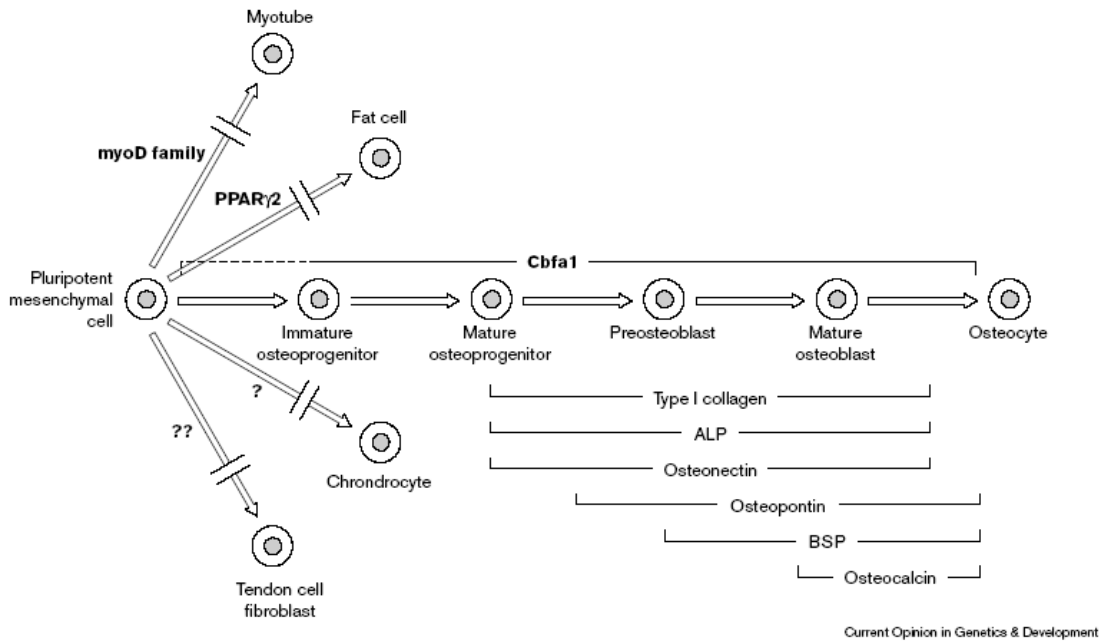
ส่วนประกอบของ dexamethasone, ascorbic acid และ β -glycerolphosphate (osteogenic supplements) [Donzelli, E. และคณะ 2007]



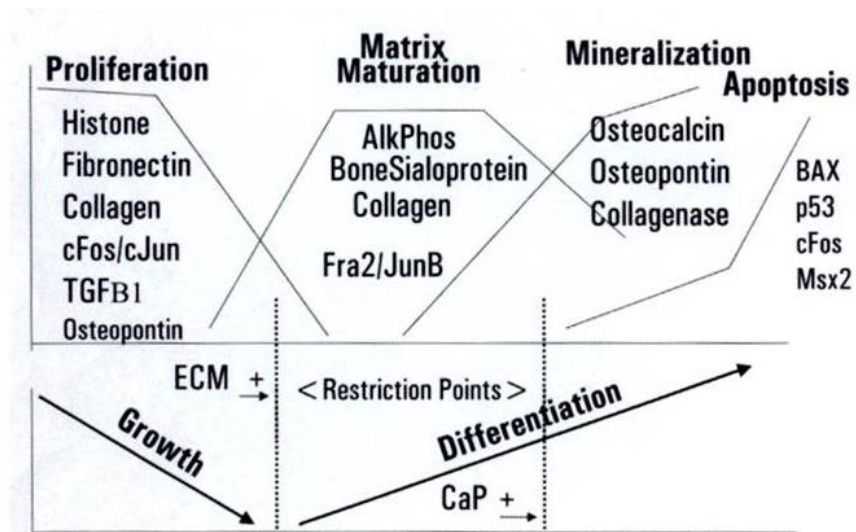
รูปที่ 2.19 แสดงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปร่างของ MSCs

[Pörtner, R. และคณะ 2005]

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูกจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆ ตามขั้นตอนแสดงในรูปที่ 2.20 โดยเซลล์ต้นกำเนิด (Mesenchymal stem cell) เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ Immature osteoprogenitor จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น Mature osteoprogenitor แล้วจึงเปลี่ยนแปลงเป็น Preosteoblast จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นเซลล์ Mature osteoblast แล้วจึงเปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่ (Osteocyte) ในที่สุด และมีการหลั่งสารต่างๆ ตามช่วงการเปลี่ยนแปลงดังแสดงในรูปที่ 2.21 กิจกรรมการเปลี่ยนแปลงจะแบ่งเป็น 3 ช่วง คือ การเจริญเติบโต (Proliferation) การสร้างแมทริกซ์ (Matrix Maturation) และการสะสมแร่ธาตุ ก่อนที่เซลล์จะตาย (Apoptosis) ในที่สุด โดยในช่วงต้น เซลล์ต้นกำเนิดจะมีการเจริญเติบโตสูง จนถึงช่วงเวลานึง การเจริญเติบโตจะลดลง Extra cellular matrix (ECM) จะเริ่มมีการสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการหลั่งสาร คือ เอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) คอลลาเจน Bonesialoprotien ซึ่งเป็น early marker ในช่วงนี้ หลังจากนั้น การสร้าง ECM จะลดลง จะมีการสะสมแร่ธาตุเพื่อให้กลายเป็นเซลล์กระดูก ช่วงนี้จะมีสารซึ่งถือเป็น late marker คือ ออกซิไอ แคลซิน คอลลาจีเนส และแคลเซียม [Komori, T. และคณะ 1998, Lian, J.B. และคณะ 1992]



รูปที่ 2.20 แผนผังการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก
 [Lian, J.B. และคณะ 1992]



รูปที่ 2.21 แผนผังแสดงสารที่หลั่งออกมาระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก
 [Komori, T. และคณะ 1998]

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mao, J. และคณะ (2003) ได้ศึกษาสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาติน ที่ถูกปรับปรุงโดยการเชื่อมขวางด้วย N,N(3 dimethylamino-propyl)-N'-ethyl carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ใน 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) โคโตซานที่นำมาใช้ในงานนี้มี viscosity average molecular weight (M_v) เท่ากับ 2.0×10^5 และ deacetylation degree เท่ากับ 85% ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ถูกเตรียมโดยวิธีการทำแห้งด้วยความเย็น (freeze drying) จากงานวิจัยพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ได้รับการเชื่อมขวาง พื้นผิวจะมีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กและมีลักษณะเป็นเส้นใย ความสามารถในการดูดซับน้ำมากขึ้น ยืดหยุ่นได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ไม่ได้มีการเชื่อมขวาง และโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ได้รับการเชื่อมขวาง มีการสนับสนุนการเจริญเติบโตของ fibroblasts แต่จะทำให้อัตราการย่อยสลายของโครงสร้างโคโตซาน/เจลาตินลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์โคโตซาน/เจลาตินที่ไม่ได้มีการเชื่อมขวาง

Meinel, L. และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน 3 ชนิด ได้แก่ 1.ไฟโบรอิน 2.ไฟโบรอินที่มีการปรับปรุงด้วยการคอนจูเกตกับลำดับหมู่อะมิโน RGD (silk-RGD) และ 3.โครงเลี้ยงเซลล์คอลลลาเจน ทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร osteogenic medium พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการปรับปรุงด้วยการคอนจูเกตหมู่อะมิโน RGD (silk-RGD) แสดงผลการยึดเกาะของเซลล์ที่ดี อีกทั้งสามารถตรวจวัดสัญญาณการเกิดกระดูกได้อย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและคอลลลาเจน

Tabata, Y. และคณะ (2004) ได้ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินและเบตา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (β -tricalcium phosphate: β -TCP) ในปริมาณต่างๆ และนำไปทดสอบเลี้ยงเซลล์ mesenchymal stem cell (MSC) ที่แยกจากไขกระดูกของหนูวิสตา เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูก เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสม β -TCP ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งมีขนาดรูพรุน 180-200 ไมโครเมตร ความพรุน 96% ทดสอบเลี้ยงเซลล์ MSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 15% FBS ที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากการเพาะเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า เซลล์สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี β -TCP อัตราส่วนต่าง ๆ ได้ดีเท่ากัน และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาการ

สร้างเนื้อเยื่อกระดูก พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย β -TCP 50% โดยน้ำหนักสามารถชักนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูกมากที่สุด

Donzelli, E. และคณะ (2007) ได้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน type I จากบริษัท Gingistat เพื่อเลี้ยงเซลล์ MSC ที่แยกออกจากไขกระดูกของ Sprague-Dawley rat เพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ 1×10^6 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ เปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดา (CTRL) และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ osteogenic supplement (OS medium) ได้แก่ dexamethasone, β -glycerolphosphate และ 2-phosphate-ascorbic acid ผลการทดลอง พบว่า ในวันที่ 7 หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน OS medium มีเซลล์เจริญเติบโตทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน และเซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่ม (colony) ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดา (CTRL) เซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่มในวันที่ 21 หลังจากการเพาะเซลล์ และขนาดของกลุ่มเซลล์มีขนาดเล็กกว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium ผลการวิเคราะห์ ALP activity assay พบว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม CTRL เมื่อทดสอบย้อมสีด้วย alizarin red พบว่ามีการสะสมของแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นในการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium ช่วยกระตุ้นให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้

Gil, E.S. และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาผลจากการผลิตแผ่นเยื่อโปรตีน (Protein membranes) โดยใช้สารละลายผสมไฟโบรอินไหมและเจลาติน และใช้เมทานอลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไฟโบรอินไหมให้เป็นผลึก (Crystallization) จากการศึกษาด้วย Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy พบว่าการเกิดผลึกของสารละลายไฟโบรอินไหมที่ผสมกับเจลาตินไม่แตกต่างกับการเกิดผลึกของสารละลายไฟโบรอินไหม

Tangsadthakun, C. และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของมวลโมเลกุลของไคโตซานต่อสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนผสมไคโตซาน โดยการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยความเย็นแล้วเชื่อมขวางด้วยความร้อน (dehydrothermal crosslinking) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนผสมของคอลลาเจนต่อไคโตซานโดยน้ำหนัก 5 สูตรคือ 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90 และ 0/100 และทำการเปลี่ยนค่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (weight-averaged

molecular weight) 3 ค่าคือ LMW (13 กิโลดาลตัน), MMW (140 กิโลดาลตัน), HMW (264 กิโลดาลตัน) จากการทดสอบพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่ผสมไคโตซานมวลโมเลกุลสูง (HMW) ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 30 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่ามอดูลัสเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ผลการทดสอบทางชีวภาพพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่ผสมไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ (LMW) สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929) ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่ผสมไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (HMW) โดยเฉพาะที่สัดส่วนการผสมของไคโตซาน 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

Chamchongkaset, J. และคณะ (2008) ได้ทำการทดลองเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก โดยใช้รังไหมไทยพื้นฐานงน้อยศรีสะเกษ 1 แล้วทำการศึกษาผลกระทบจากการคอนจุกต์เจลาตินที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจุกต์เจลาติน มีการเชื่อมต่อของโครงสร้างที่แข็งแรง โดยดูจากค่าความต้านทานแรงกด ซึ่งมีค่าสูงขึ้น 93% และสามารถส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี

Ma, L. และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นจากคอลลาเจนและไคโตซานด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยความเย็น (freeze-drying) และทำการเชื่อมโยงพันธะด้วย Glutaraldehyde ไคโตซานที่นำมาใช้ในงานนี้มี viscosity average molecular weight (M_v) เท่ากับ $1.0 \times 10^5 - 1.7 \times 10^5$ และ deacetylation degree เท่ากับ 75-85% จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Glutaraldehyde ส่งผลให้ความสามารถในการบวมน้ำลดลง สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น สามารถลดอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพให้ช้าลงได้ โดยพบว่าถ้าใช้คอลลาเจนเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเพิ่มไคโตซานเข้าไปสามารถช่วยลดอัตราการย่อยสลายลงได้เล็กน้อย แต่ถ้ามีการเชื่อมโยงพันธะด้วย Glutaraldehyde จะทำให้อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพลดลงอย่างมาก

Ratanavaraporn, J. และคณะ 2009 ได้ทำการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดไขมันและเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนแผ่นฟิล์ม 3 ชนิด ได้แก่ ฟิล์มเจลาติน ฟิล์มไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (1,000 กิโลดาลตัน) และฟิล์มไคโตซานที่มีน้ำหนัก

โมเลกุลต่ำหรือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (1.4 กิโลดาลตัน) โดยพบว่า ฟิล์มเจลาติน และฟิล์มไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและแบ่งตัวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้อย่างดีเยี่ยม แต่ฟิล์มไคโตซานไม่ส่งเสริมการยึดเกาะและแบ่งตัวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด และยังพบอีกว่า เซลล์ต้นกำเนิดไขมันสามารถยึดเกาะและแบ่งตัวได้เร็วกว่าเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก แต่เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดไขมัน

Tritanipakul, S. (2009) ได้ศึกษาผลกระทบจากการคอนจูเกตเจลาติน และการสะสมสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่ถูกเตรียมด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก จากการศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์แสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์มีพื้นผิวเรียบ และมีรูพรุนเชื่อมต่อกัน ความเข้มข้นของสารละลายเจลาตินที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมีผลต่อปริมาณเจลาตินที่มาคอนจูเกตบนโครงเลี้ยงเซลล์ ลักษณะพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวโดยใช้สารละลายเจลาตินที่มีความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนัก มีประสิทธิภาพในการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดี ส่วนการสะสมไฮดรอกซีอะพาไทต์บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการแช่สลับในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าการมีไฮดรอกซีอะพาไทต์มาสะสมอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีพื้นผิวขรุขระ มีความพรุนลดลง และช่วยในการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดี

Zhending, S. และคณะ (2009) ได้ทำการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/ไคโตซาน ด้วยวิธีการ freeze-dry แล้วได้ทำการศึกษการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยความสามารถในการบวมน้ำนี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของสารทั้งสอง จากการศึกษาสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/ไคโตซาน พบว่าเมื่อความเข้มข้นโดยรวมของสารละลายไฟโบรอินกับไคโตซานต่ำกว่า 6% โดยน้ำหนัก จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุนสูงกว่า 95% ในการทดสอบความสามารถทางชีวภาพ โดยใช้ HepG2 cells (human hepatoma cell line) พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนโครงเลี้ยงเซลล์

Ratanavaraporn, J. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน และสัดส่วนการผสมระหว่างเจลาตินกับไคโตซานที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของฟิล์มที่ผลิตจากเจลาตินและไคโตซาน พบว่าฟิล์มที่ผลิตจากเจลาตินและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (1,000 กิโลดัลตัน) มีสมบัติทางกายภาพและทางกลที่ดี แต่ไม่ส่งเสริมกิจกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ทั้งทางด้านการยึดเกาะและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ในทางตรงข้าม ฟิล์มที่ผลิตจากเจลาตินและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หรือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (1.4 กิโลดัลตัน) มีความเหมาะสมสำหรับการยึดเกาะและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขมันและเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก นอกจากนี้ยังพบว่า ฟิล์มที่ผลิตจากเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 70/30 ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาติน

บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 รังไหม *Bombyx mori* (พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา)

3.1.2 ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (น้ำหนักมวโมเลกุล 5900 ดาลตัน, เตรียมจากการไฮโดรไลซิสไคโตซานที่ทำมาจากแกนปลาหมึกโดยใช้เอนไซม์ไคตินเนส) [Kachanechai, T. และคณะ 2008]

3.1.3 เจลาติน ชนิดเอ (พีไอ 9, บริษัท Nitta Gelatin Inc., โตเกียว ญี่ปุ่น)

3.1.4 โซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส (Na_2CO_3 , บริษัท Ajax Finechem, Pty'Ltd, ออสเตรเลีย)

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

3.1.6 สารละลายกลูตาอัลดีไฮด์ (25% GA, บริษัท Fluka, เยอรมัน)

3.1.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, สหรัฐอเมริกา)

3.1.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.02 N NaOH, บริษัท Analar, อังกฤษ)

3.1.9 โซเดียมอะไซด์ (บริษัท Labchem, APS, ออสเตรเลีย)

3.1.10 ถุงไดอะไลซิส (MWCO 12000-16000, Viskase Companies, Inc., ญี่ปุ่น)

3.1.11 ไกลซีน (บริษัท Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

3.1.12 Alpha-modified eagle powder medium (α -MEM(s), Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

3.1.13 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone or Biochrom or ICP)

3.1.14 แอลกอฮอล์ (99.9%, บริษัท VWR International Ltd., อังกฤษ)

3.1.21 สารละลาย Penicillin-Streptomycin (10,000 units/ml, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

3.1.15 Dulbecco's phosphate buffer saline without calcium and magnesium (PBS (-) powder, บริษัท Nissui Pharmaceutical Co. Ltd)

3.1.16 Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin in EDTA.4Na, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

3.1.17 แอล-กลูตามีน (200 mM, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

- 3.1.18 ไดมethylซัลฟอกไซด์ (Cell culture tested DMSO, บริษัท Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.19 SDS lysis buffer
- 3.1.20 Hoechst 33258 (1 mg/ml DMSO)
- 3.1.21 สารละลายมาตรฐาน p-Nitrophenol (10 mM, บริษัท Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.22 p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (pNPP, บริษัท Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.23 CaCO₃ standard
- 3.1.24 O-cresolphythalein complex substrate (OCPC, มวลโมเลกุล 636.62)
- 3.1.25 เตาโนลามีน บัฟเฟอร์ (0.88 mol/l, pH 11)

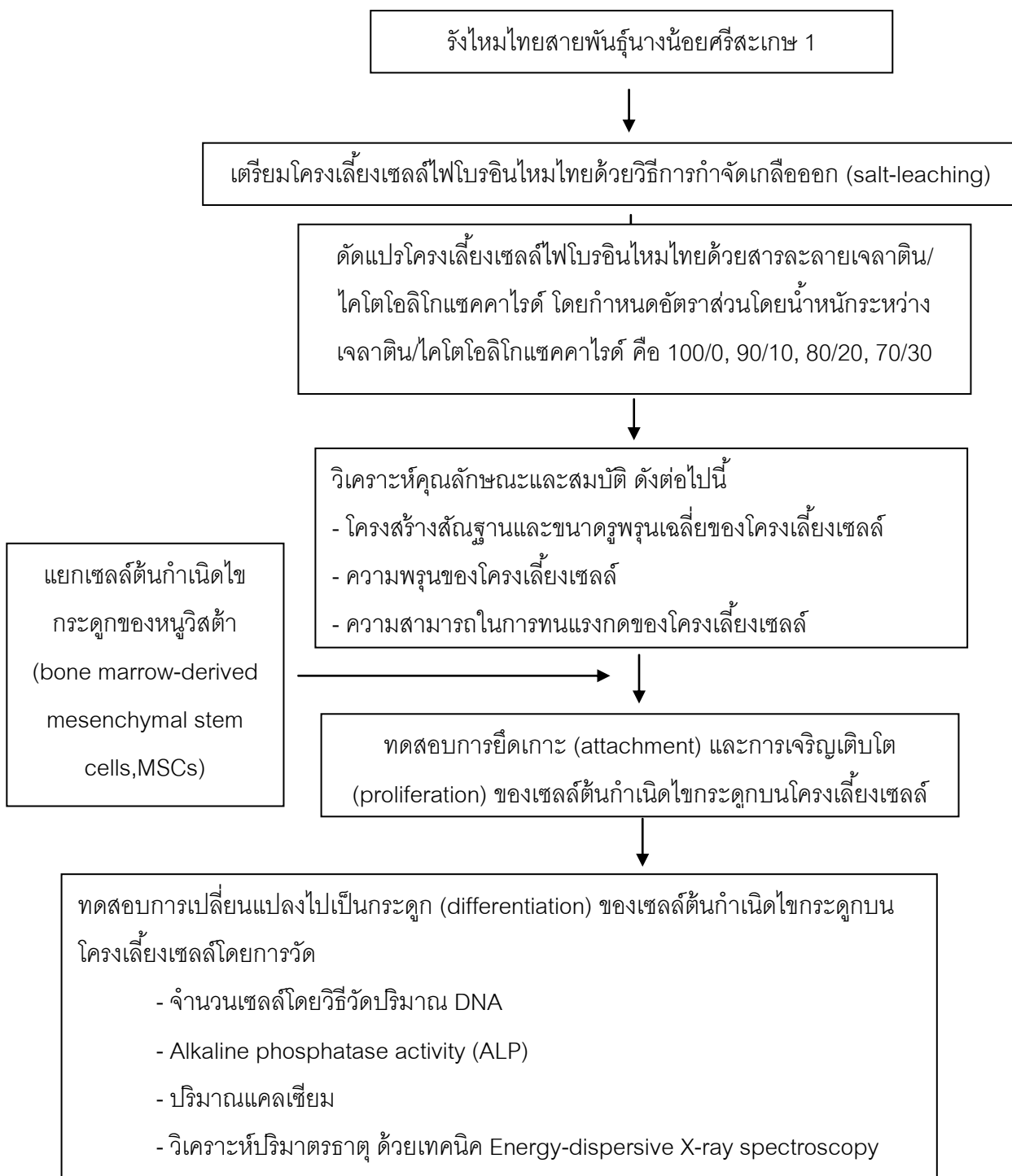
3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) (HWS Series 254473, ออสเตรเลีย)
- 3.2.2 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (Series II 3110 Water Jacketed Incubator, Thermo Forma, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.3 เครื่อง Fluorescence microplate reader (Perkin elmer, 1420 multilabel counter, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.4 เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (Micropipette) (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.6 เครื่อง Universal Testing Machine (Instron, No. 5567, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.7 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) (รุ่น JSM-5410LV จากบริษัท JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)
- 3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) (รุ่น Kubota corporation 6500, ญี่ปุ่น)
- 3.2.9 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส (ยี่ห้อ Heto, รุ่น PowerDry LL3000, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.10 เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Lyophilizer) (ยี่ห้อ Christ Loc-1m, รุ่น Alpha 1-4, เยอรมัน)

3.2.11 ตู้อบแห้งแบบสูญญากาศ และบ่ม (VD23, Binder, เยอรมัน)

3.2.12 ถาดเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 6 หลุม, 24 หลุม และ 48 หลุม (ยี่ห้อ NUNC, เดนมาร์ก)

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนการดำเนินงานวิจัยโดยรวม

3.3.1 วิเคราะห์คุณลักษณะของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

การตรวจน้ำหนักโมเลกุลของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ โดยใช้เทคนิค Gel Permeation Chromatography (Waters 600E) โดยการส่งตรวจที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

Test conditions:

Eluent: 0.5M acetic acid and 0.5M sodium acetate (acetate buffer)

Flow rate: 0.6 ml/min

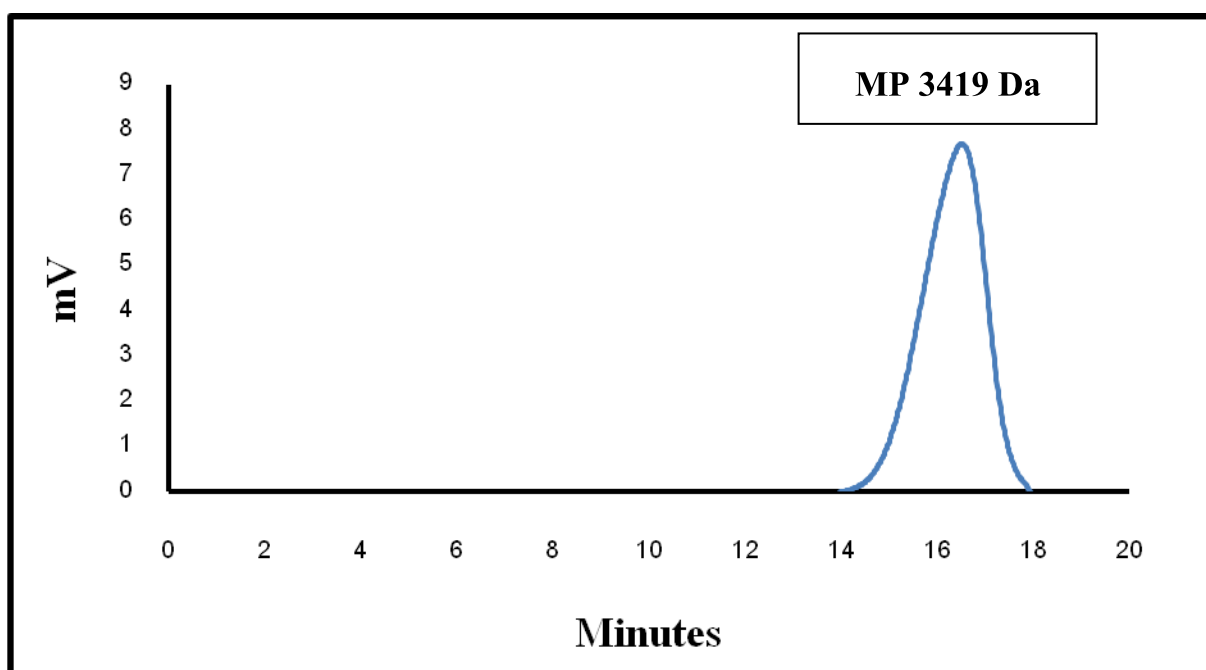
Injection volume: 20 μ l

Temperature: 30°C

Column set: Ultrahydrogel linear 1 column (MW resolving rang = 1,000-20,000,000) 1 column + guard column

Standard: Pullulans (MW 5,900-70,800)

Detector: Refractive Index Detector



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatograph พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 5967 ดาลตัน และเมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวมีค่าอยู่ที่ 1.72 ดังแสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการวัด % deacetylation โดยเทคนิค spectrophotometry พบว่ามี % deacetylation คือ 99%

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

Mn(ดาลตัน)	Mw(ดาลตัน)	MP(ดาลตัน)	Mz(ดาลตัน)	Mz+1(ดาลตัน)	Polydispersity
3472	5967	3419	11099	19237	1.72

MP คือน้ำหนักโมเลกุลที่มีจำนวนมากที่สุด

Mn คือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number-average molecular weight)

Mw คือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight-average molecular weight)

Mz คือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดย z (z-average molecular weight)

Mz+1 คือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดย z+1 (z+1-average molecular weight)

การวัด % deacetylation โดยเทคนิค spectrophotometry [ศุภยวีร์สุตชีวะภาพโคติน-โคโตซาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545] เป็นการวัดเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนหมู่ N-acetyl-D-glucosamine ไปเป็น glucosamine เพื่อบ่งบอกถึงความเป็นโคติน-โคโตซาน ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเริ่มต้นด้วยการหาจุด Zero Crossing Point (ZCP) ซึ่งเป็นจุดที่กรด ที่มีความเข้มข้นต่างกันสามค่าให้ค่าการดูดกลืนเท่ากันที่ความยาวคลื่นเดียวกัน โดยการเตรียมกรดอะซีติกความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 โมลต่อลิตร นำสารละลายทั้ง 3 ความเข้มข้น ไปวัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง spectrophotometer หาค่า Zero Crossing Point (ZCP) ซึ่งจุดนี้แสดงถึงตำแหน่งของความยาวคลื่นที่ความเข้มข้นของกรดไม่มีผลต่อการดูดกลืน

จากนั้นเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) โดยเตรียม N-acetyl-D-glucosamine ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร โดยใช้กรดอะซีติกความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร เป็นตัวทำละลาย เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่าง 0-0.035 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 3.2 นำสารละลายมาตรฐานมาวัดค่าการดูดกลืน ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นวัดระยะห่างระหว่างค่าการดูดกลืนของสารละลายแต่ละตัวที่ความ

ยาวคลื่นเดียวกันกับจุด ZCP (H) เพื่อนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะ (H) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน N-acetyl-D-glucosamine

สารละลาย	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)							
	0	0.005	0.01	0.015	0.02	0.025	0.03	0.035
0.05 กรัมต่อลิตรของ N-acetyl-D-glucosamine (มิลลิลิตร)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5
0.01 โมลต่อลิตรกรดอะซีติก (มิลลิลิตร)	5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1.5
ปริมาตรรวม	5	5	5	5	5	5	5	5

จากนั้นทำการละลายตัวอย่างโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 0.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในกรดอะซีติกความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายโคโตโอลิโกแซคคาไรด์มา 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำให้ได้ 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายโคโตโอลิโกแซคคาไรด์คือ 0.01 กรัม โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน 100 มิลลิลิตร ในกรดอะซีติกความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร นำสารละลายตัวอย่างมา วัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง spectrophotometer และหาค่าระยะห่างระหว่างค่าการดูดกลืนของสารละลายโคโตโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละตัวกับจุด ZCP (H) เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine จากกราฟมาตรฐาน และทำการคำนวณค่า %degree of deacetylation จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ degree of deacetylation} = \left(1 - \left(\frac{A}{\frac{(10 \times W) - 204 A}{161} + A} \right) \right) \times 100 \dots (1)$$

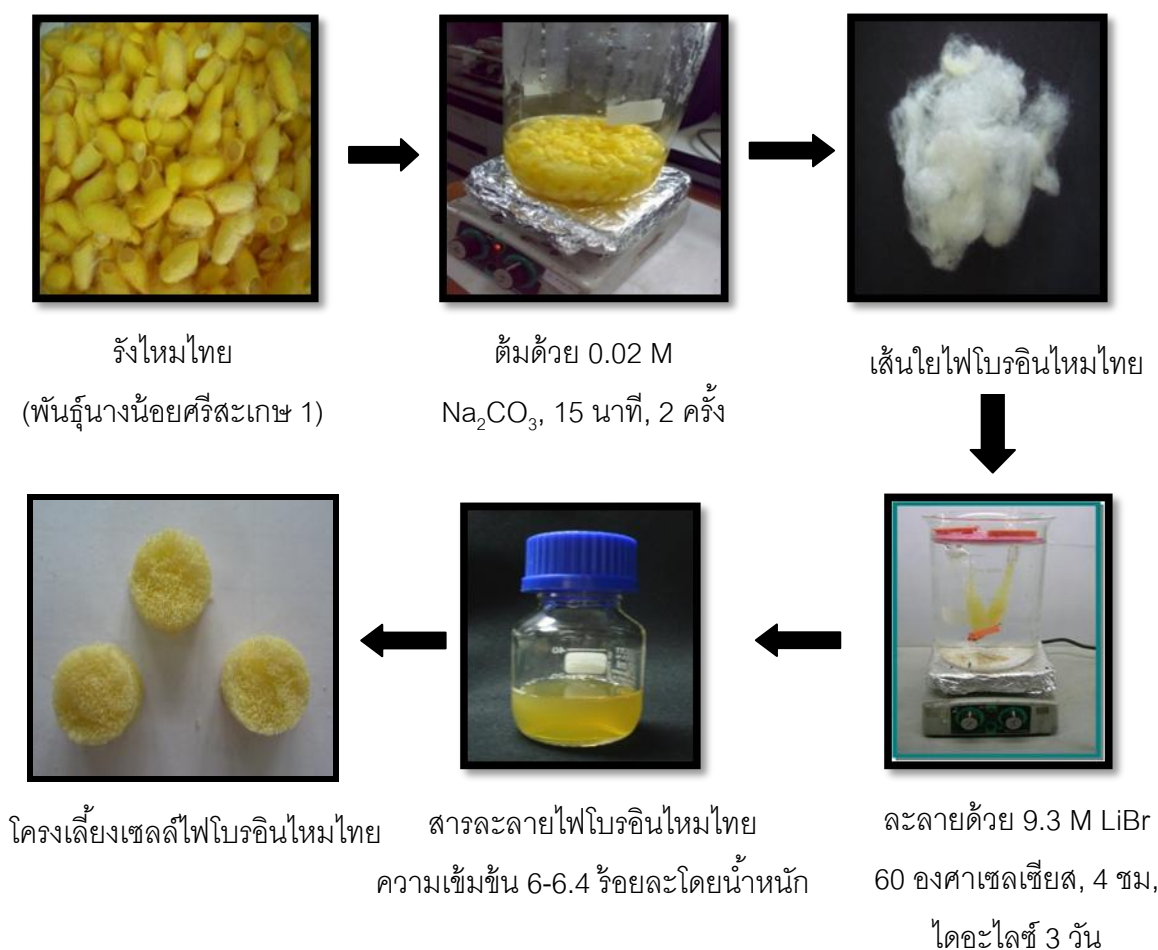
โดยที่ A = ความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine ที่วัดได้ (กรัมต่อลิตร) หารด้วย 204
 W = น้ำหนักของตัวอย่างโคโตซาน (กรัม) ใน 100 มิลลิลิตร ของ 0.01 โมลาร์กรดอะซิติก
 204 = น้ำหนักโมเลกุลของ N-acetyl-D-glucosamine
 161 = น้ำหนักโมเลกุลของ D-glucosamine

3.3.2 การเตรียมไฟโบรอินไหมไทย [Kim, U.J และคณะ 2005]

การเตรียมสารละลายจากไฟโบรอินไหมไทย โดยนำรังไหมไทย (นางน้อยศรีสะเกษ 1) 40 กรัม มาต้มให้เดือดในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (รังไหม 1 กรัมต่อโซเดียมคาร์บอเนต 25 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ เพื่อแยกเซรีซินและสารอื่นๆที่ไม่ใช่ไฟโบรอินออก แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเส้นใยไฟโบรอินที่แห้งแล้วไปละลายด้วยลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ด้วยอัตราส่วนไหม 8 กรัม ต่อ LiBr 24 กรัม (25% W/V) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปไดอะไลซ์ (ถุงไดอะไลซิส MWCO 12000-16000, Viskase Companies, Inc., Japan) ด้วยน้ำปราศจากประจุ เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยเปลี่ยนน้ำทุกๆ 15 นาทีในชั่วโมงแรก วันต่อไปเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง (เช้า เย็น) เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ออก จะได้ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยในน้ำ ประมาณ 6-6.4 ร้อยละโดยน้ำหนัก

3.3.3 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย [Kim, U.J และคณะ 2005]

การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไทย ทำได้โดยนำสารละลายไฟโบรอินไหมไทยปริมาณ 3 มิลลิลิตร บรรจุใส่ในกระปุกทรงกระบอก จากนั้นโรยเกลือ 7 กรัม ลงในกระปุกทรงกระบอก (อุณหภูมิเกลือ 600-710 ไมโครเมตร) แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายไฟโบรอินเกิดการเจลดัว จากนั้นนำกระปุกทรงกระบอกไปแช่ในน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมกับทำการปั่นกวนเพื่อทำการกำจัดอนุภาคของเกลือออก อนุภาคของเกลือที่ละลายออกไป จะทำให้เกิดรูพรุนขึ้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตัดชิ้นงานให้ได้ความหนา 2 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร ขั้นตอนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยนี้ สรุปได้ในรูปที่ 3.3

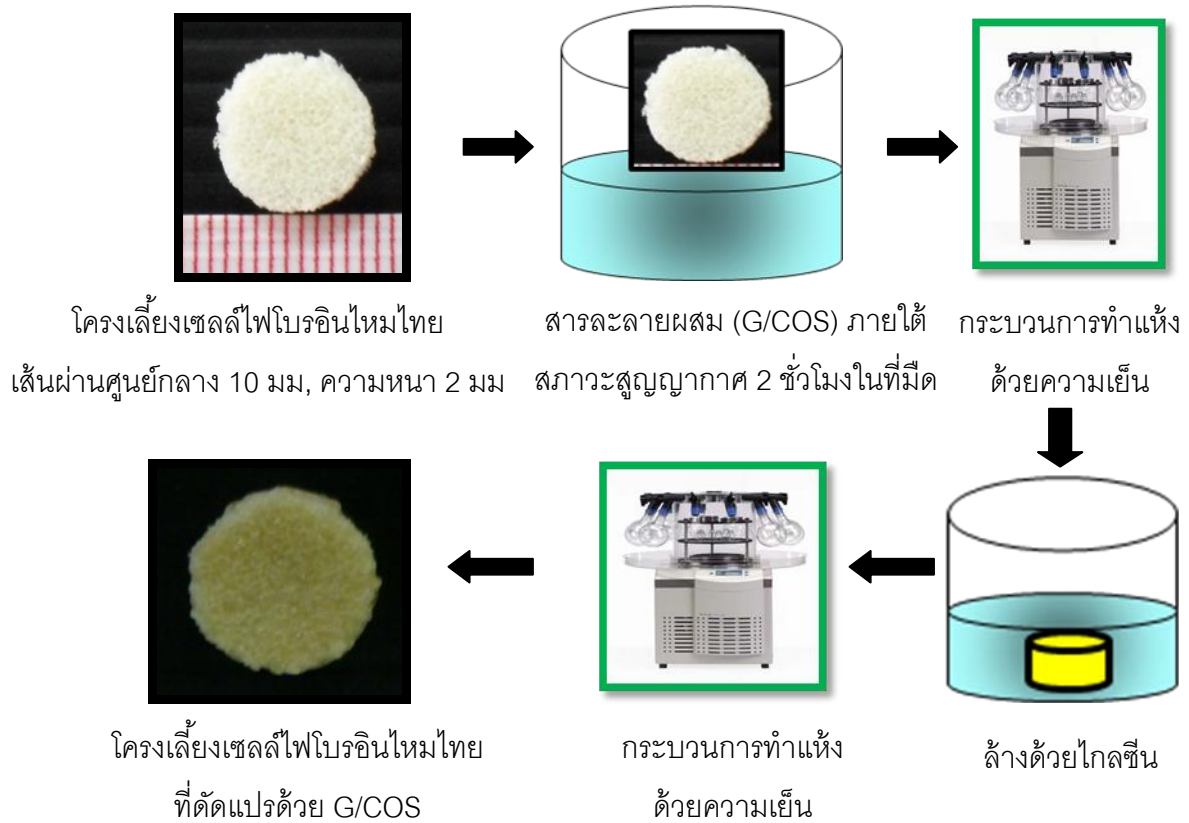


รูปที่ 3.3 การเตรียมไฟโบรอินไหมไทยและการขึ้นรูปโครมเลียงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย

3.3.4 การตัดแปรพื้นผิวโครมเลียงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย โดยการคอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

เตรียมสารละลายไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในกรดแอสซิดิก 1% โดยปริมาตร ซึ่งมี pH 3.4 แล้วทำการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อทำการปรับ pH ให้ได้ 6.4 ผสมเจลาตินลงไปในสารละลาย แล้วทำการปั่นกวน จากนั้นเติมกลูตาไรต์ไฮด์แล้วทำการปั่นกวนเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำโครมเลียงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยแช่ลงในสารละลายเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงภายใต้สภาวะสุญญากาศในที่มืด นำโครมเลียงเซลล์ที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น (freeze-dry) จากนั้นนำมาล้างด้วยไกลซีน ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาทีภายใต้สภาวะสุญญากาศ เพื่อกำจัดกลูตาไรต์ไฮด์ส่วนเกินออก แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็นอีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดยในงานวิจัยนี้ใช้น้ำหนักแห้งของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์คงที่ที่ 1%

โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนผสมของสารละลายเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยน้ำหนัก เท่ากับ 100/0, 90/10, 80/20 และ 70/30



รูปที่ 3.4 การตัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย
 โดยการคอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

3.3.5 การทดสอบสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

3.3.5.1 คำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์

ร้อยละโดยน้ำหนักเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์เซลล์ ภายหลังจากคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถคำนวณได้จาก

$$\% \text{ เจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์} = \frac{W_2 - W_1}{W_2} \times 100 \quad \dots (2)$$

เมื่อ W_1 เป็นน้ำหนักแห้งโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยก่อนคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

W_2 เป็นน้ำหนักแห้งโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยภายหลังคอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

3.3.5.2 ทดสอบความคงตัวของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่คอนจุกต์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์

การทดสอบความคงตัวของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่คอนจุกต์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ทำโดยคำนวณหาร้อยละน้ำหนักที่หายไป โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยสารละลายผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไปแช่ในสารละลาย PBS ที่สภาวะ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น (freeze-dry) คำนวณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่หายไป ได้จากสูตร

$$\% \text{ เจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่หายไป} = \frac{W_3 - W_4}{W_3} \times 100 \quad \dots (3)$$

เมื่อ W_3 เป็นน้ำหนักแห้งโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ก่อนแช่ในสารละลาย PBS

W_4 เป็นน้ำหนักแห้งโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์หลังแช่ในสารละลาย PBS

3.3.5.3 ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์

ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโคโตโพลิโกแซคคาไรด์, โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้เทคนิค ฟูเรียทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (FT-IR spectroscopy, Spectrum GX, Perkin Elmer, UK) โดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียดผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ จากนั้นนำมาอัดขึ้นรูปเป็นเหรียญขนาดเล็ก (disc) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR เพื่อศึกษาพีคของการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ค่าเลขคลื่นต่างๆ

3.3.5.4 ศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ (Morphology)

ศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ (Morphology) รวมถึงลักษณะรูพรุน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM-JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan) บันทึกภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า จากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดของรูพรุนโดยโปรแกรม Image J วัดขนาดรูพรุนทั้งหมด 100 จุด ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยขนาดรูพรุนโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนแบบสุ่ม 100 รู ในแนวราบ (horizontal) และแนวตัดขวาง (cross-section) จากนั้นนำขนาดของรูพรุนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

3.3.5.5 ศึกษาสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ (Mechanical strength)

โดยทดสอบความสามารถในการทนแรงกด (Compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่อง Universal Testing Machine ในการทดสอบใช้อัตราการกดคงที่ 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที เพื่อคำนวณหาค่า compressive modulus โดยหาได้จากค่าความชันระหว่างกราฟของความเค้น (compression stress) และความเครียด (compression strain) ในช่วง 5-30% แรกของแรงกด การทดสอบแบบแห้งสามารถใช้โครงเลี้ยงเซลล์นำมาทดสอบได้เลย ส่วนในแบบเปียกนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในสารละลาย PBS ก่อน 3 ชั่วโมง และซับน้ำส่วนเกินออกแล้วจึงนำไปทดสอบ ทดลองซ้ำ 7 ตัวอย่าง ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยมอดูลัสของการกด±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.5.6 ศึกษาหาความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity)

ศึกษาหาความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (Porosity) ด้วยเทคนิคการแทนที่ด้วยเฮกเซนในช่องว่างของโครงเลี้ยงเซลล์ ทดสอบซ้ำ 10 ตัวอย่าง ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Briman และคณะ โดยนำเฮกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตร (V_1) ใส่ลงในภาชนะทรงกระบอก จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์แช่ในเฮกเซน เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เฮกเซนซึมเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ แล้ววัดปริมาตรโครงเลี้ยงเซลล์และเฮกเซนหลังทำการดูดซับ (V_2) จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์ออก และวัดปริมาตรเฮกเซนที่เหลือ (V_3) โดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นคำนวณหาความพรุนจากสูตร [Biman, B.M. และคณะ 2009]

$$\text{ความพรุน (\%โดยน้ำหนัก)} = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100 \quad \dots (4)$$

3.3.6 การทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

3.3.6.1 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs)

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ใช้ทดสอบถูกสกัดจากส่วนขาหลังของหนูวิสตา อายุ 3 สัปดาห์ (จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ตามวิธีของ Hosseinkhani และคณะ (2006) โดยผ่าเอากระดูกต้นขาหลังของหนูตั้งแต่บริเวณสะโพก เลาะเศษเนื้อเยื่ออื่นออกให้สะอาด ตัดที่ปลายทั้งสองข้างของกระดูกจะพบช่องไขกระดูก ใช้เข็มฉีดยา (26 gauge needle) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (Alpha-modified eagle medium: α -MEM ที่มี 15% FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) ชะล้างผ่านช่องไขกระดูกลงหลอดขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งก้อนไขกระดูกหลุดออกหมด ทำสารแขวนลอยเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เข็มฉีดยาหลายๆ จากนั้นดูใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร ทำการเพาะเซลล์ในสภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 1 หลังจากการเพาะเซลล์ เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่เกาะจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน เป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ [Takahashi Y. และคณะ 2005] เพื่อให้ได้เซลล์ passage ที่ 2 สำหรับนำไปใช้ทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

3.3.6.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ [Takahashi Y และคณะ 2003]

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเตรียมปริมาณเซลล์ 5×10^5 เซลล์/100 ไมโครลิตร/โครงเลี้ยงเซลล์ (สำหรับทดสอบการยึดเกาะและเจริญเติบโต) และ 1×10^6 เซลล์/100 ไมโครลิตร/โครงเลี้ยงเซลล์ (สำหรับทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก) เพาะเลี้ยงลงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ ด้วยวิธีการ agitation seeding คือการนำเอาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วมาเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่ม 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำซ้ำ 4 ครั้ง

3.3.6.3 ทดสอบการยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ (5×10^5 เซลล์/100 มิลลิลิตร/โครงเลี้ยงเซลล์) นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารประกอบด้วย α -MEM ที่มี 15% FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin ในถาดเลี้ยงเซลล์โพลิสไตรีนขนาด 6 หลุม บ่มในตู้ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน ตรวจสอบจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เกาะติด (attachment) ที่เวลา 6 ชั่วโมง และการเจริญเติบโต (proliferation) ที่ช่วงเวลา 1, 3 และ 5 วัน บนโครงเลี้ยงเซลล์ วิเคราะห์ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ DNA (DNA assay) โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่จะแทรกเข้าสู่ DNA double strands ด้วยเครื่อง spectrofluorimeter [Takahashi, Y และคณะ 2005] ซึ่งขั้นตอนในการดำเนินการมีดังนี้

- เตรียมสารมาตรฐานจากเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกซึ่งรู้ปริมาณเซลล์ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ใน vial แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วเติม SDS lysis buffer มิลลิลิตรลงใน vial ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมา แล้วทำการเจือจางความเข้มข้นเซลล์ (serial dilution) ระหว่าง 1×10^6 ถึง 1.5625×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

- เตรียมตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ตามเวลาที่กำหนดไว้ มาล้างด้วย PBS ตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้เป็นชิ้นละเอียด จากนั้นใส่สาร SDS ลงไป แล้วนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

- เตรียมสารละลาย Hoechst 33258 ซึ่งเตรียมได้จากการนำ Hoechst 33258 (20 ไมโครลิตร), น้ำปราศจากประจุ (19 มิลลิลิตร) และ SSC (1 มิลลิลิตร) มาผสมรวมกัน
- จากนั้นนำสารมาตรฐานและตัวอย่างไปวัดปริมาณ DNA โดยให้นำตัวอย่างมาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเปิดสารละลายในตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะขนาด 96 หลุม
- เติมสารละลาย Hoechst 33258 ลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง spectrofluorimeter ที่ช่วงความยาวคลื่น 355-460 นาโนเมตร
- คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่าหรือเวลาการแบ่งตัวที่คูณ (Population doubling time) บนโครงเลี้ยงเซลล์

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) คำนวณจาก

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (\text{ต่อชั่วโมง}) \quad \dots (5)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dx \quad \dots (6)$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1 \quad \dots (7)$$

โดย X_1 คือจำนวนเซลล์ ที่เวลา t_1
 X_2 คือจำนวนเซลล์ ที่เวลา t_2

เวลาการแบ่งตัวที่คูณ (Population doubling time, PDT) คำนวณจาก

$$PDT = \frac{1}{r} \quad (\text{ชั่วโมง}) \quad \dots (8)$$

เมื่อ อัตราการแบ่งตัว (Multiplication rate, r) คำนวณจาก

$$\text{อัตราการแบ่งตัว} \quad r = n / (t_2 - t_1) \quad (\text{รุ่นต่อชั่วโมง}) \quad \dots (9)$$

จากสมการ

$$N = X_0 2^n \quad \dots (10)$$

$$\log N = \log X_0 + n \log 2 \quad \dots (11)$$

$$n = 3.32 (\log N - \log X_0) \quad \dots (12)$$

ดังนั้นอัตราการแบ่งตัว $r = 3.32 (\log N_H - \log N_t) / (t_2 - t_1)$ (รุ่นต่อชั่วโมง) ... (13)

โดย N_t คือจำนวนเซลล์เริ่มต้น ที่เวลา t_1

N_H คือจำนวนเซลล์ทั้งหมด ที่เวลา t_2

3.3.6.4 ทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ (1×10^6 เซลล์/100 มิลลิลิตร/โครงเลี้ยงเซลล์) นำตัวอย่างที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร osteogenic differentiation media (OM) ประกอบด้วย α -MEM ที่มี 10% FBS, 50 U/ml penicillin streptomycin, 50 μ g/ml L-ascorbic, 10^{-6} M dexamethasone และ 1 M β -glycerophosphate ในสภาพเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 6 หลุม ในตู้บ่ม 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน ตรวจสอบจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ด้วยวิธีการตรวจปริมาณ DNA (DNA Assay) ซึ่งใช้วิธีการวัดเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.3.6.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) และปริมาณแคลเซียม ในช่วงเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นในเซลล์กระดูก โดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้ cell lysate หลังจากนั้นเอนไซม์จะถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ ซึ่งขั้นตอนในการดำเนินการมีดังนี้ [Hofmann, S และคณะ 2007]

- เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ p-nitrophenol เจือจางในน้ำปราศจากประจุให้ได้ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 และ 0.078125 มิลลิโมล

- เตรียมตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสาร SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตรลงในโครงเลี้ยงเซลล์และตัดให้เป็นชิ้นละเอียด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- จากนั้นปิเปตสารมาตรฐานและตัวอย่างมา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในสภาพเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แล้วเติมสาร p-Nitrophenyl phosphate 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80 ไมโครลิตร โดยเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส จะเปลี่ยน p-Nitrophenyl phosphate ให้เป็น p-nitrophenol และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม ซึ่งขั้นตอนในการดำเนินการมีดังนี้ [Takahashi, Y และคณะ 2005]

- เตรียมกราฟมาตรฐานจากการละลายแคลเซียมคาร์บอเนต 5 กรัมในกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 และ 0.15625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- เตรียมตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสาร SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตรลงในโครงเลี้ยงเซลล์และตัดให้เป็นชิ้นละเอียด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปิดตัวอย่างมา 100 มิลลิลิตรและเติมกรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

- จากนั้นทำการเปิดสารมาตรฐานและตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตรใส่ลงหลุม เติมสารละลาย ethanolamine buffer 1 มิลลิลิตร และสาร O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน แคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สารสีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นาโนเมตร

การวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์และองค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์

วิเคราะห์ลักษณะของเซลล์และธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัสที่เซลล์ผลิตขึ้นบนโครงเลี้ยงเซลล์ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 28 วัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) และ energy dispersive X-ray (EDX) โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 จุด บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ พื้นที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์แต่ละจุดเท่ากับ 10 x 9.8 ตารางไมโครเมตร

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล แล้วนำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อศึกษาว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบอะโนวา (Anova) ด้วยโปรแกรมมินิแทบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)

บทที่ 4

ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

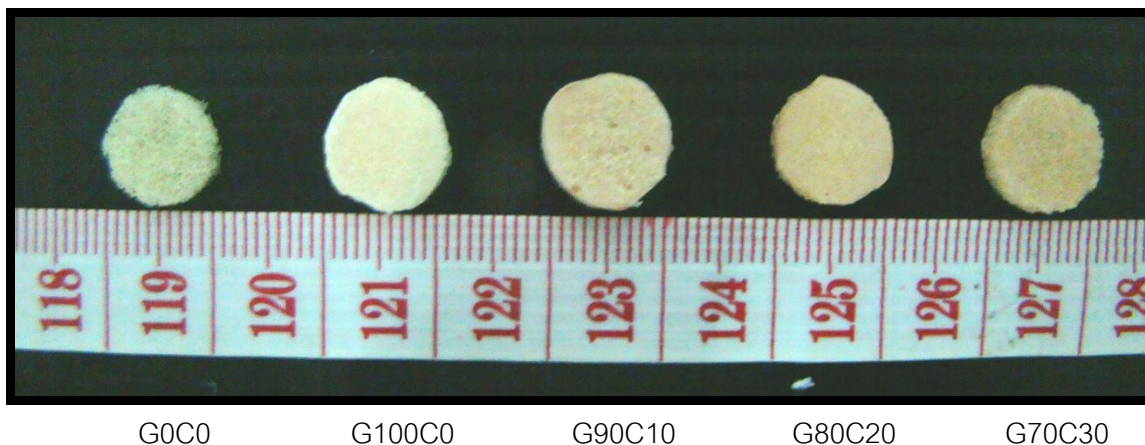
4.1 คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

ในการศึกษานี้ได้ทำการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้สารละลายที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์คือ 100:0, 90:10, 80:20 และ 70:30 จากนั้นทำการคอนจูเกตหรือเชื่อมขวาง (crosslink) ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 % โดยปริมาตร

โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย, โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยคอนจูเกตด้วยเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่อัตราส่วนต่างๆ สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และลักษณะภายนอกของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย, โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยคอนจูเกตด้วยเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ แสดงในรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างและสัญลักษณ์ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ประเภทของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์	สัญลักษณ์
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย	SF หรือG0C0
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100:0	G100C0
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 90:10	G90C10
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 80:20	G80C20
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 70:30	G70C30



รูปที่ 4.1 ลักษณะภายนอกของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100:0 (G100C0), 90:10 (G90C10), 80:20 (G80C20) และ 70:30 (G70C30)

4.1.1 ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์

ในการคอนจูเกตสารผสมของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่อัตราส่วนผสมต่างๆ เข้าไปในรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในหัวข้อนี้จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่มีต่อปริมาณสารผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูก คอนจูเกตไว้ในโครงเลี้ยงเซลล์ ผลการทดลองในรูปที่ 4.2 แสดงร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย ภายหลังจากคอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.05% ส่งผลให้มีปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไทย (G100C0) เท่ากับ 29.14 ± 1.80 ทั้งนี้เมื่อคอนจูเกตโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไทยด้วยสารผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า เมื่อลดสัดส่วนเจลาตินจาก 100 เป็น 70 (เพิ่มสัดส่วนไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จาก 0 เป็น 30) จะทำให้ปริมาณสารผสมที่คอนจูเกตเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงตามลำดับ ทำให้มีสารผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สัดส่วนผสม 70/30 ที่ถูกคอนจูเกตเข้าไปได้น้อยที่สุด (ร้อยละ 12.16 ± 3.01)

สำหรับที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.15% พบว่า ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ G100C0 น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ G90C10, G80C20 และ G70C30

สำหรับที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.1% และ 0.2% พบว่า ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 สูตรได้แก่ G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 มีปริมาณที่ใกล้เคียงกันโดยที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.1% มีปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ประมาณร้อยละ 28-29 ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.2% มีปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของ เจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ประมาณร้อยละ 22-24

เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ต่อประสิทธิภาพการคอนจุกตสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไทยโดยแยกพิจารณาเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ G100C0 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการคอนจุกตสารละลายเจลาตินอยู่ในช่วง 0.05-0.15% โดยจะทำให้สามารถคอนจุกตเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ร้อยละ 27-29 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็น 0.2% จะเห็นว่าปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินที่ถูกคอนจุกตในโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินที่ถูกคอนจุกตในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 0.05-0.15% ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณกรดอะมิโนในเจลาตินที่สามารถเชื่อมขวางได้มีอยู่ประมาณ 12% [Petersen, G.I. และคณะ 2005] การเพิ่มปริมาณสารเชื่อมขวางมากเกินไปจึงไม่สามารถเชื่อมขวางเจลาตินได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Sheu, M.T. ที่พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์คอลลดเจนโดยพิจารณาค่าของระดับการเชื่อมขวางที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.12% [Sheu, M.T. และคณะ 2001]

ส่วนที่ 2 พิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไทยที่คอนจุกตด้วยสารละลายผสมของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 90:10 (G90C10), 80:20 (G80C20) และ 70:30 (G70C30) พบว่าปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกคอนจุกตมีค่าสูงที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.15%

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและไคโตซานที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 70:30 โดยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ จะต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เท่ากับ 0.06% ซึ่งจะทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ย่อยสลายได้ช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ค่าอื่นๆ ในช่วง 0.03-0.12% [Chaithaworn, N. 2007] และจากรายงานของ Damink, L.O. ซึ่งเปรียบเทียบ

ปริมาณความเข้มข้นสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง (0.1%-0.2%) พบว่าเมื่อปริมาณความเข้มข้นสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มากขึ้น ส่งผลให้หมู่แอลดีไฮด์ของกลูตารัลดีไฮด์สามารถเชื่อมขวางกับหมู่อะมิโนของเจลาตินและไคโตซานได้มากขึ้น เนื่องจากสัดส่วนของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวางกับจำนวนหมู่อะมิโนของโปรตีนเท่ากับ 1:2 [Damink, L.O. และคณะ 2005]

นอกจากนี้ ในกรณีที่มีการคอนจูเกตสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.05% พบว่า เมื่อมีปริมาณไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในการคอนจูเกตเพิ่มมากขึ้นจะไม่สามารถเกิดการคอนจูเกตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เมื่อเพิ่มปริมาณไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มากขึ้นทำให้มีหมู่อะมิโนในการคอนจูเกตเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณกลูตารัลดีไฮด์ที่มีอยู่ไม่เพียงพอในการเชื่อมขวางหมู่อะมิโนของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์และเจลาตินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก) จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.05% ไม่สามารถใช้ในการคอนจูเกตสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อพิจารณาผลของค่าร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยเมื่อนำไปแช่ใน PBS ในรูปที่ 4.3 ซึ่งแสดงถึงความคงตัวของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่คอนจูเกตเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.05% จะมีปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่หายไป ประมาณ 1-2 แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.1, 0.15 และ 0.2% พบว่าปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่หายไป ประมาณ 0.5-0.7

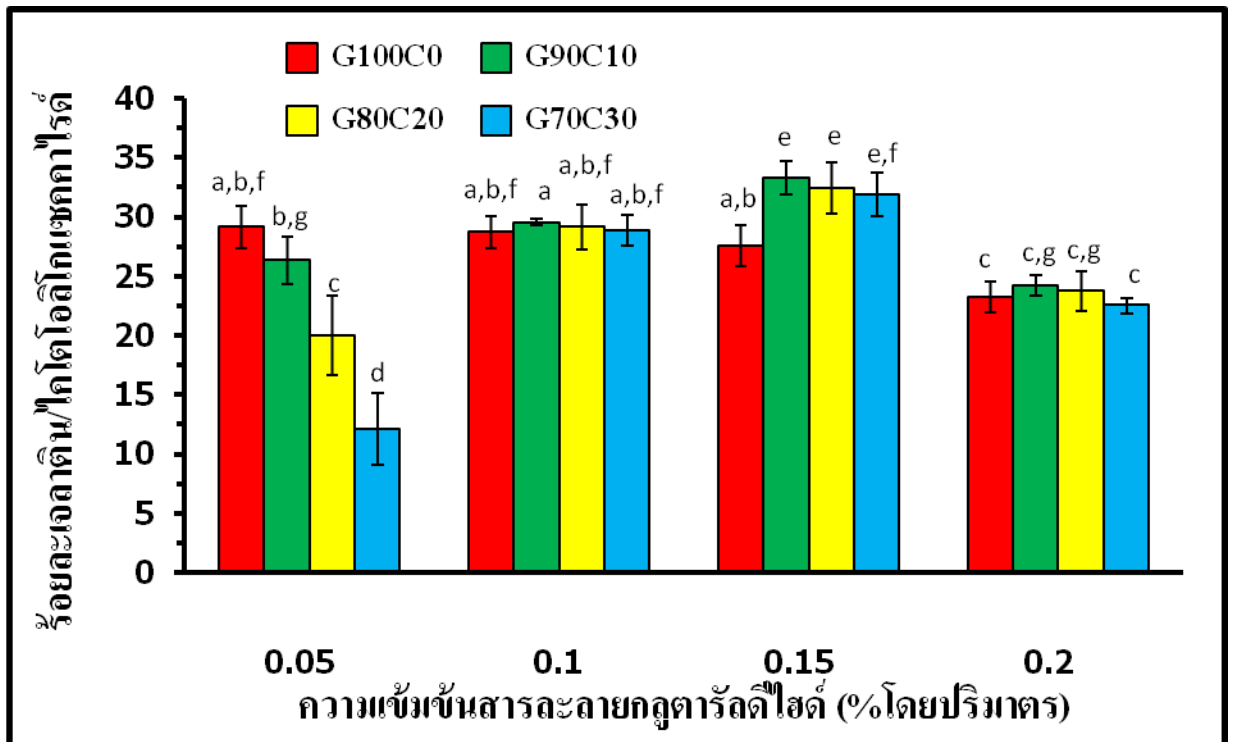
จึงกล่าวโดยสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.05% นอกจากมีร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินในปริมาณน้อยแล้ว สารผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ยังถูกชะล้างออกไปได้มาก แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.05% ไม่สามารถคอนจูเกตสารละลายเจลาตินและสารละลายผสมเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นในการศึกษาโครงสร้างพื้นฐานและสมบัติต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาติน/โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในหัวข้อต่อไป จะไม่พิจารณาการเชื่อมขวางด้วยความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮดรีต 0.05%

ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่า เจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถเข้าไปคอนจูเกตอยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย จึงได้ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยภายหลังการคอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมต่างๆโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮดรีต 0.1% ในการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค FT-IR ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตเจลาตินเพียงอย่างเดียว (G100C0) เกิดพีคการดูดกลืนที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และ 1635 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ I (Amide I) ที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O (C=O stretching) ที่อยู่ในโครงสร้างแบบ β -sheet และแบบ random coil ตามลำดับ ส่วนที่ช่วงเลขคลื่น $1550\text{-}1525\text{ cm}^{-1}$ สังเกตพบพีคกว้างที่เกิดขึ้นนี้ไม่เด่นชัดนักซึ่งน่าจะสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ II (Amide II) ที่เกิดจากการสั่นหมุนของพันธะ N-H (N-H deformation) และที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1250 cm^{-1} และ 1225 cm^{-1} ปรากฏพีคที่สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ III (Amide III) ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะ N-H (N-H deformation) และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-N (C-N stretching) ที่อยู่ในโครงสร้างแบบ β -sheet และแบบ random coil ตามลำดับ ทั้งนี้พันธะเอไมด์ทั้งสามชนิดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบในโครงสร้างโปรตีน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมีโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet และเจลาตินที่ใช้ในการคอนจูเกตมีโครงสร้างเป็นแบบ random coil ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลงานวิจัยของจิตติมา ที่แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เตรียมด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก ซึ่งแสดงโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet โดยมีพีคการดูดกลืนที่เลขคลื่น 1630 , 1525 และ 1255 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงพันธะเอไมด์ I, เอไมด์ II และ เอไมด์ III ตามลำดับ [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008] งานวิจัยของ Muyonga, J.H. แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนของเจลาตินมีโครงสร้างเป็นแบบ random coil ซึ่งเกิดพีคขึ้นที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} พีคนี้แสดงถึงเอไมด์ I ซึ่งเกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O ของเจลาติน ส่วนพีคที่เกิดขึ้นที่เลขคลื่น 1542 cm^{-1} แสดงถึงเอไมด์ II เกิดจากการสั่นแบบหมุนของพันธะ N-H ของเจลาติน และที่เลขคลื่น 1235 cm^{-1} แสดงถึงเอไมด์ III ปรากฏพีคการดูดกลืนซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะ N-H และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-N [Muyonga, J.H. และคณะ 2003]

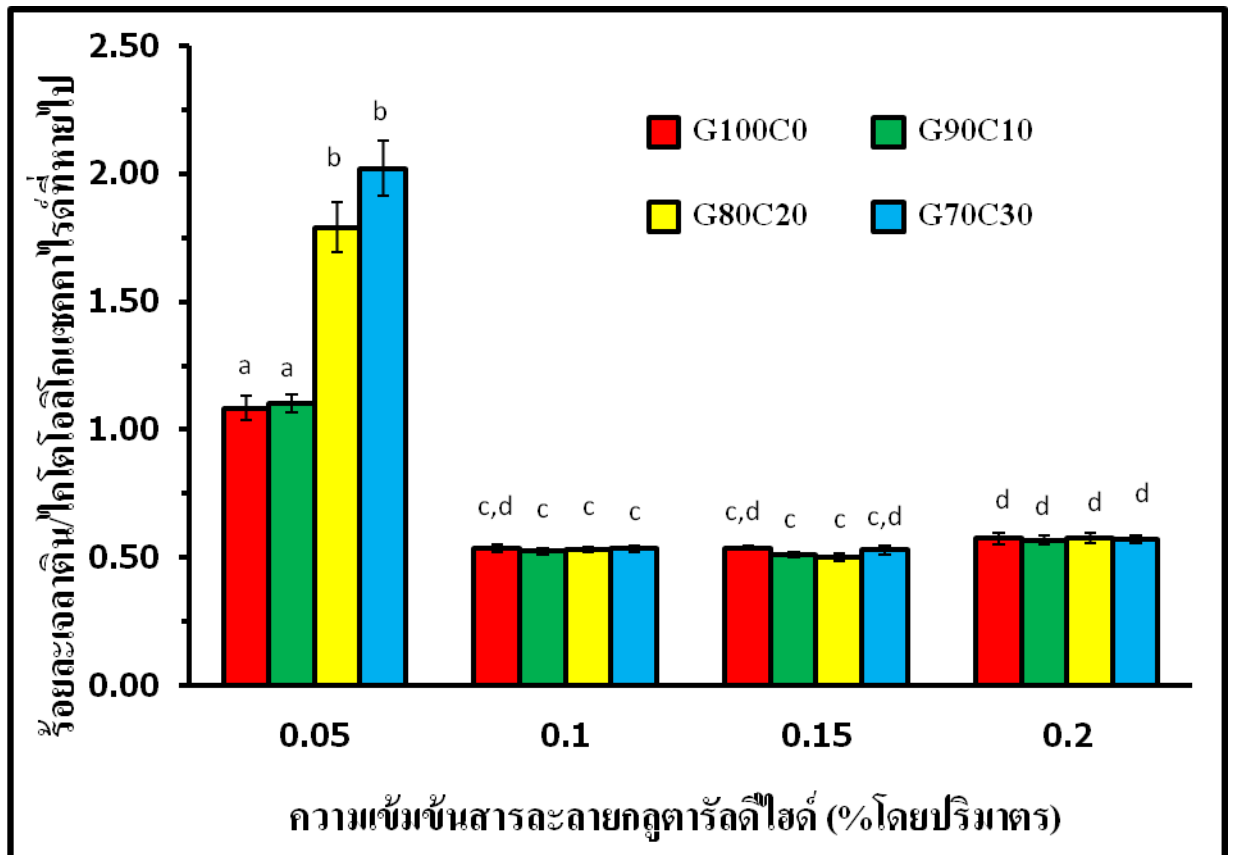
สำหรับสเปกตรัมการดูดกลืนของสารโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ จะสังเกตพบพีคที่เลขคลื่น 1645, 1540 และ 1245 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O, การสั่นหมุนของพันธะ N-H และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-O ตามลำดับ และพบสเปกตรัมที่เลขคลื่น 1150 cm^{-1} แสดงหมู่ฟังก์ชัน -C-O-C- ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของฉลงลาภ ซึ่งแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนของโคโตซานซึ่งเกิดพีคที่เลขคลื่น 1655, 1550 และ 1240 cm^{-1} ซึ่งแสดงการแบบยืดของพันธะ C=O, การสั่นแบบงอของพันธะ N-H และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-O ตามลำดับ และเกิดพีคที่เลขคลื่น 1152 cm^{-1} ซึ่งแสดงหมู่ฟังก์ชัน -C-O-C- ที่เชื่อมระหว่างโคโตซานสองโมเลกุล [Tangsadthakun, C. และคณะ 2007] งานวิจัยของ Sionkowska, A. แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนของโคโตซานซึ่งเกิดพีคที่เลขคลื่น 1655, 1560 และ 1150 cm^{-1} ซึ่งแสดงการแบบยืดของพันธะ C=O, การสั่นแบบงอของพันธะ N-H และแสดงหมู่ฟังก์ชัน -C-O-C- ตามลำดับ [Sionkowska, A. และคณะ 2006]

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 100/0, 90/10, 80/20 และ 70/30 พบว่า พีคการดูดกลืนที่เลขคลื่น 1145 cm^{-1} ที่แสดงหมู่ฟังก์ชัน -C-O-C- เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มสัดส่วนโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในสารละลายผสมจาก 0 เป็น 30 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่คอนจูเกตเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยเพิ่มมากขึ้น นอกจากพีคดังกล่าวแล้ว ยังพบพีคที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน (ไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน) ได้แก่ พีคการดูดกลืนที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และ 1635 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ I (Amide I) พีคการดูดกลืนที่เกิดขึ้นในช่วงเลขคลื่น 1550-1525 cm^{-1} ซึ่งน่าจะสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ II (Amide II) และที่เลขคลื่น 1250 cm^{-1} และ 1225 cm^{-1} สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ III (Amide III)



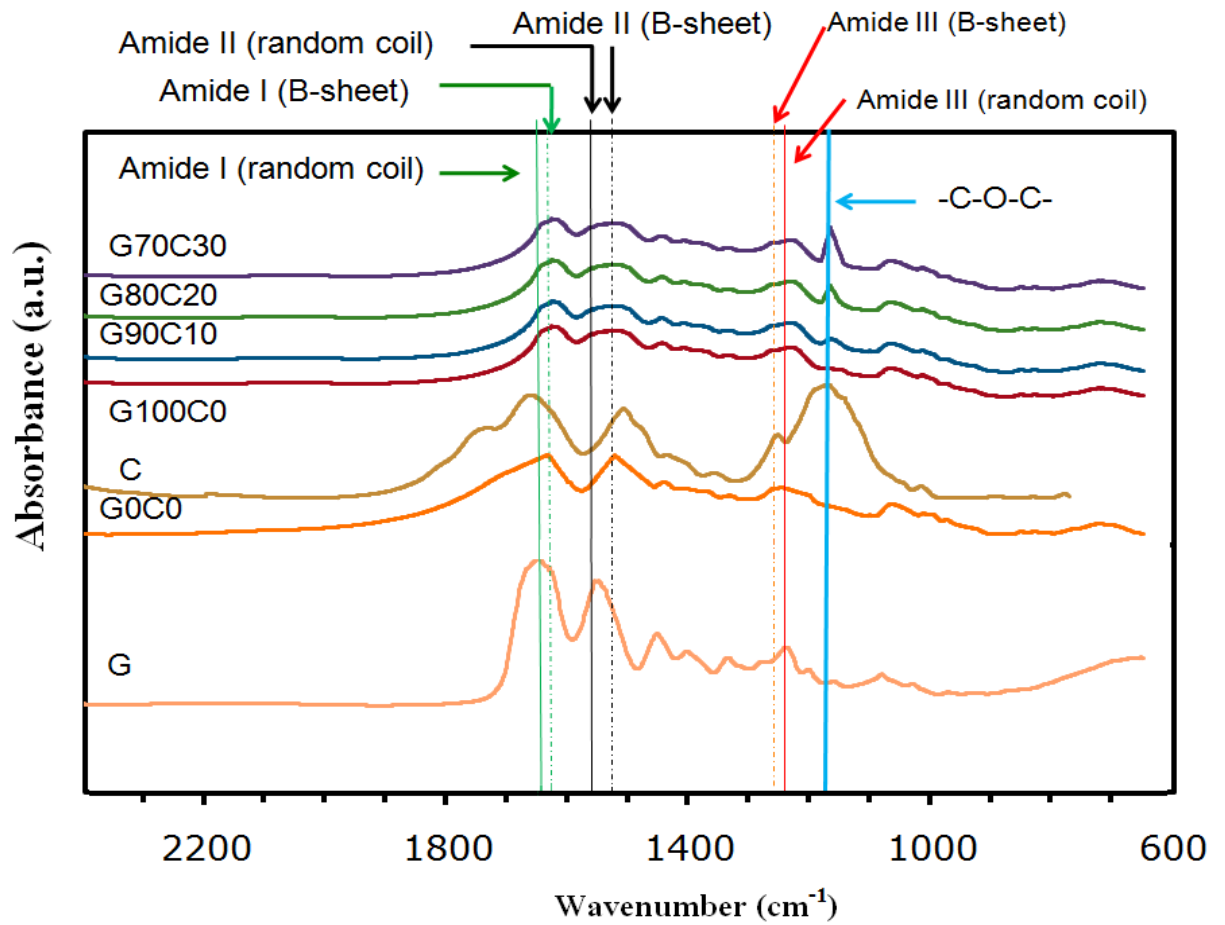
รูปที่ 4.2 ร้อยละโดยน้ำหนักของเถ้าดินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกคอบนจุเกตในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย

(a - g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)



รูปที่ 4.3 ร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่หายไปเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ไปแช่ใน PBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

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

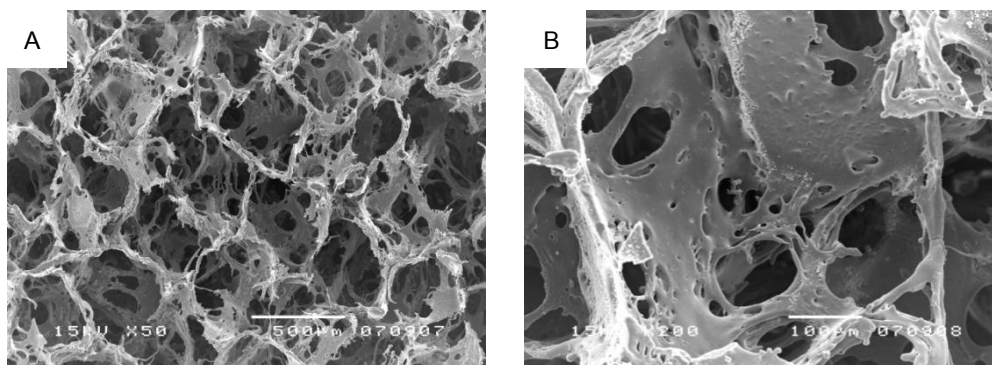


รูปที่ 4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (C), เจลาติน (G), โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0), โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาติน (G100C0) และสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 90/10 (G90C10), 80/20 (G80C20) และ 70/30 (G70C30) (ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการคอนจูเกตเท่ากับ 0.1%)

4.1.2 โครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 ประเภทโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงดังรูปที่ 4.5-4.7 และขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด สรุปในตารางที่ 4.2

จากการพิจารณารูปที่ 4.5 พบว่าลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (GOCO) มีรูพรุนที่เชื่อมต่อกันเป็นเครือข่าย มีความพรุนสม่ำเสมอ พื้นผิวภายในเรียบ โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 570 ± 52 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่าขนาดอนุภาคของเกลือ $600-710$ ไมโครเมตรที่นำมาใช้ในการขึ้นรูปเล็กน้อย และสอดคล้องกับรายงานของจิตติมา ซึ่งพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ผลิตโดยวิธีการกำจัดอนุภาคเกลือ (salt-leaching) มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 557 ± 54 ไมโครเมตร [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008] และสอดคล้องกับรายงานของชัชววรรณ ซึ่งพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่ผลิตโดยวิธีการกำจัดอนุภาคเกลือมีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 561 ± 44 ไมโครเมตร [Tritanipakul, S. 2009]



รูปที่ 4.5 ลักษณะโครงสร้างรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (A) สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร และ (B) สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร

จากผลการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรในการเชื่อมขวาง 0.1%, 0.15% และ 0.2% ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร) และรูปที่ 4.7 (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร) พบว่า โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยภายหลังการคอนจุกต์ทั้ง 4 สูตรโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรทั้ง 3 ค่ามีลักษณะเป็นช่องรูพรุนแบบคล้ายกำแพง (wall-like) ซึ่งเกิดขึ้นจากเจลาตินและชีวส์คุดผสมของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้าไปอยู่ภายในรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย โดยเกิดเป็นโครงข่ายรูพรุนภายใน ทำให้รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีขนาดเล็กลง ดังสรุปในตารางที่ 4.2

ในกรณีของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินเพียงอย่างเดียว (G100C0) โดยใช้สารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรในการเชื่อมขวางมีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยของจิตติมา ซึ่งรายงานว่าการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินซึ่งใช้ EDC/NHS ในการเชื่อมขวางมีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 261 ± 31 ไมโครเมตร และพบว่ามีเส้นใยของเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย นอกจากนี้การใช้สารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรในการเชื่อมขวาง ในงานวิจัยนี้พบว่าปริมาณสารเข้าไปคอนจุกต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ได้มากกว่าการใช้ EDC/NHS ในการเชื่อมขวาง [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008] ทั้งนี้ขนาดของรูพรุน ซึ่งมีรายงานว่าช่วยสนับสนุนการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการขนส่งอาหาร ออกซิเจน ของเสียภายในโครงเลี้ยงเซลล์ ควรีขนาดอย่างน้อย 100 ไมโครเมตร [Hutmacher D.W. และคณะ 2000]

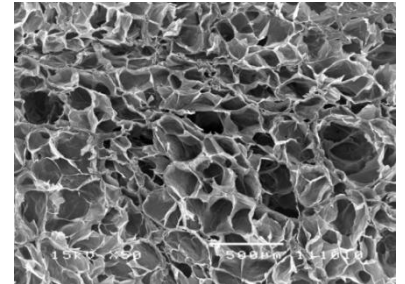
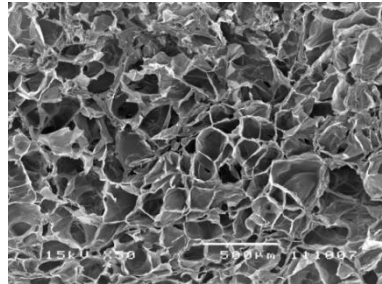
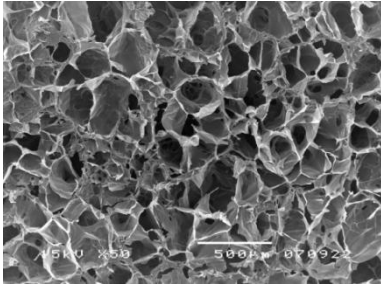
เมื่อเปรียบเทียบผลของความแตกต่างความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรที่ใช้ในการเชื่อมขวาง พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (G100C0) มีขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้นเมื่อความเข้มข้นกลูตาไรต์ไฮโดรมากขึ้น แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่าในการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรที่ความเข้มข้น 0.15% จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 สูตรที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% ทั้งนี้เนื่องจาก เมื่อใช้ความเข้มข้นสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดร 0.15% ทำให้มีร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เข้าไปคอนจุกต์ในโครงเลี้ยงเซลล์มากที่สุด ส่งผลให้โครงสร้างรูพรุนมีขนาดเล็กกว่ากรณีใช้สารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.2%

0.1% กลูตารัลดีไฮด์

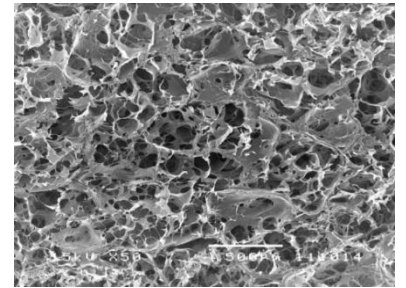
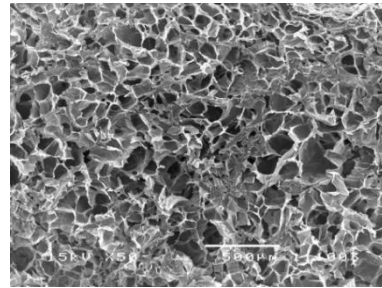
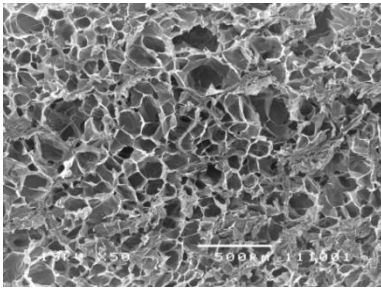
0.15% กลูตารัลดีไฮด์

0.2% กลูตารัลดีไฮด์

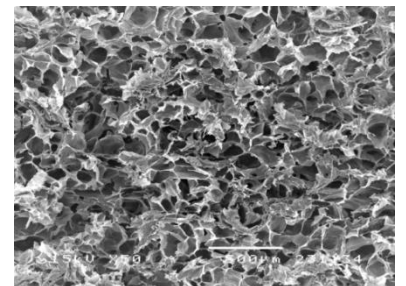
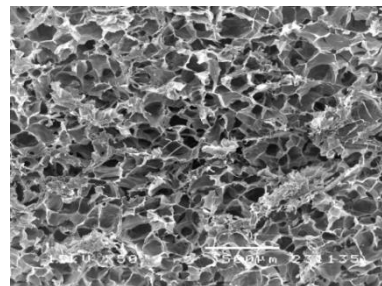
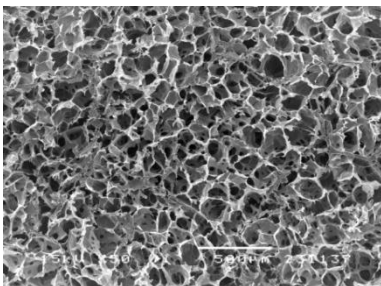
G100C0



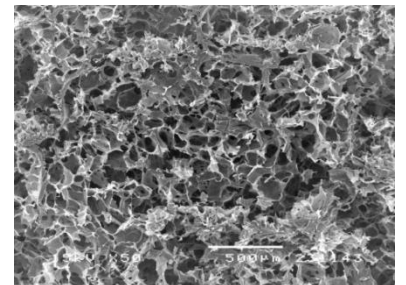
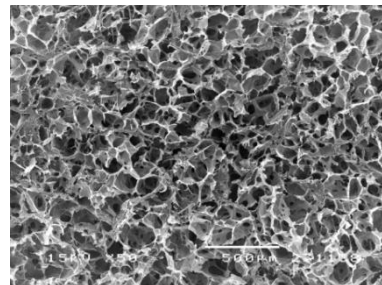
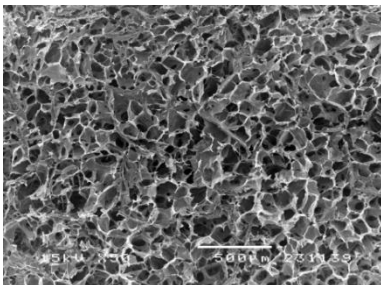
G90C10



G80C20



G70C30



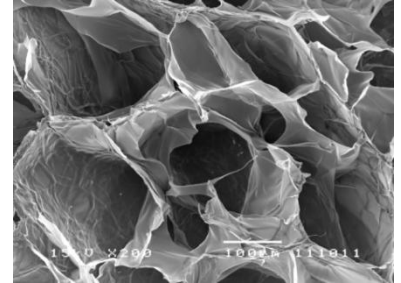
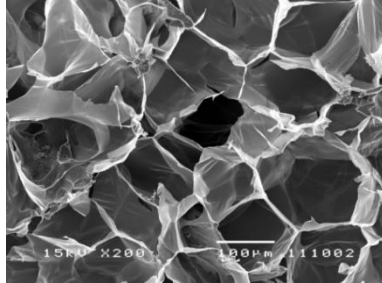
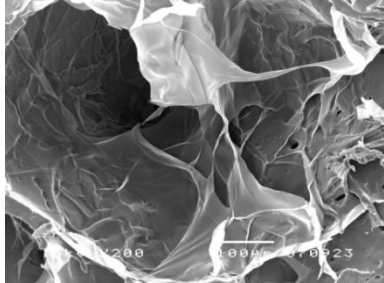
รูปที่ 4.6 ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ไฟเบอร์อินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของ เจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100:0 (G100C0), 90:10 (G90C10), 80:20 (G80C20) และ 70:30 (G70C30), สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร

0.1% กลูตารัลดีไฮด์

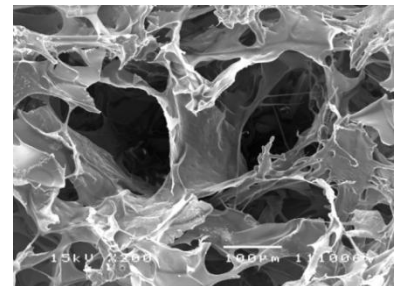
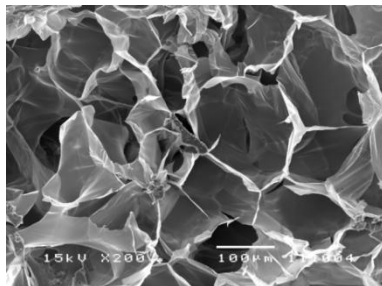
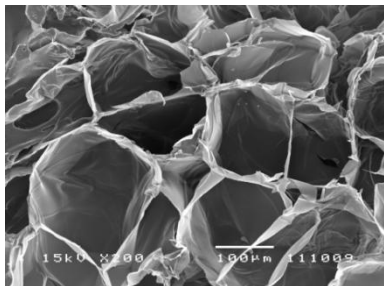
0.15% กลูตารัลดีไฮด์

0.2% กลูตารัลดีไฮด์

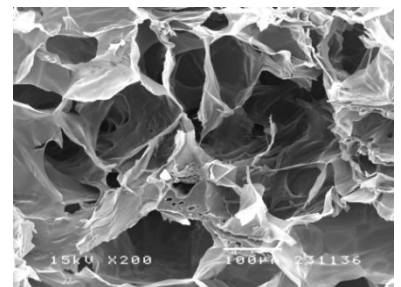
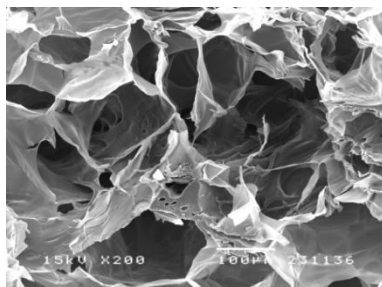
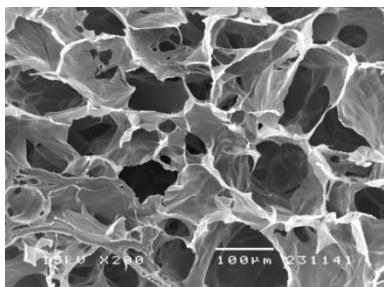
G100C0



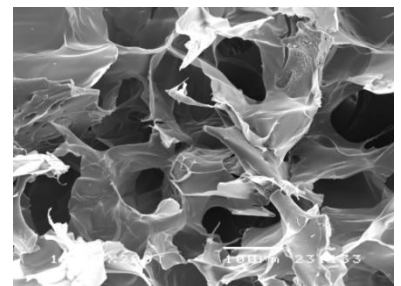
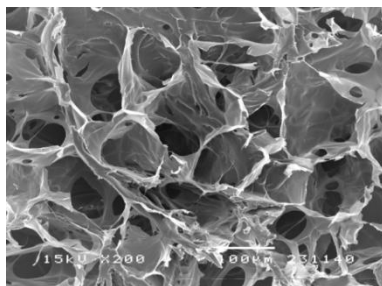
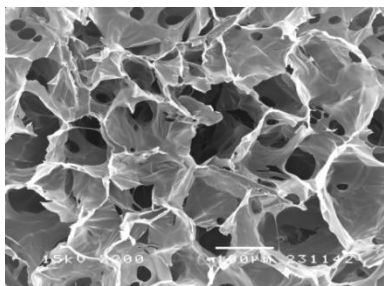
G90C10



G80C20



G70C30



รูปที่ 4.7 ลักษณะโครงข่ายเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของ เจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100:0 (G100C0), 90:10 (G90C10), 80:20 (G80C20) และ 70:30 (G70C30), สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4.2 ขนาดรูปวงแหวนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลาย ผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ประเภทโครงเลี้ยงเซลล์	ขนาดรูปวงแหวนเฉลี่ย(ไมโครเมตร) เมื่อคอนจุกต์ด้วยความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์		
	0.1%	0.15%	0.2%
G0C0(SF)	570±52 ^a		
G100C0	275±32 ^b	300±44 ^b	333±43 ^b
G90C10	193±37 ^d	188±26 ^d	280±39 ^{b,c}
G80C20	185±35 ^d	180±28 ^d	274±42 ^{b,c}
G70C30	184±40 ^d	182±33 ^d	251±37 ^c

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

เมื่อพิจารณาค่าความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย กลูตาไรต์ไฮโดรเจนในการเชื่อมขวาง 0.1%, 0.15% และ 0.2% จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) ที่มีความหนาแน่นมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) ทั้งนี้ความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากมีเนื้อสารของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้าไปคอนจูเกตในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย

เมื่อเปรียบเทียบผลของความแตกต่างของความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรเจนที่ใช้ในการเชื่อมขวาง พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (G100C0) มีความหนาแน่นน้อยลงเมื่อความเข้มข้นกลูตาไรต์ไฮโดรเจนมากขึ้น แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่าในการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรเจนที่ความเข้มข้น 0.15% จะทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 สูตร ที่มีความหนาแน่นมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรเจนที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% เนื่องมาจากกรณีใช้สารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรเจนที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% มีร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เข้าไปคอนจูเกตในโครงเลี้ยงเซลล์น้อยกว่ากรณีใช้ความเข้มข้นสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรเจน 0.15% ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสม เจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ประเภทโครงเลี้ยงเซลล์	ความหนาแน่น(มก/ลบ.มม) เมื่อคอนจุกต์ด้วยความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์		
	0.1%	0.15%	0.2%
G0C0(SF)	0.085±0.005 ^a		
G100C0	0.112±0.004 ^b	0.106±0.005 ^{b, c, d}	0.098±0.004 ^d
G90C10	0.111±0.007 ^{b, c}	0.126±0.006 ^e	0.102±0.004 ^{c, d}
G80C20	0.113±0.004 ^{b, c}	0.126±0.005 ^e	0.102±0.006 ^{b, c, d}
G70C30	0.113±0.003 ^{b, c}	0.127±0.009 ^e	0.103±0.008 ^{b, c, d}

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

เมื่อพิจารณาค่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) ในตารางที่ 4.4 พบว่ามีความพรุนเท่ากับร้อยละ 92.44 ± 0.88 เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอบนจุเกิดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 ด้วยสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ในการเชื่อมขวาง โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการคอบนจุเกิดด้วยสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% มีความพรุนน้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย G0C0 โดยมีความพรุนประมาณร้อยละ 81-83 และร้อยละ 86-88 ตามลำดับ

แต่สำหรับที่ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ 0.15% พบว่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอบนจุเกิดด้วยเจลาติน (G100C0) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอบนจุเกิดด้วยสารผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) ทั้งนี้มีรายงานวิจัยว่าหากมีความพรุนมากจะทำให้เกิดช่องเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุนได้มาก ส่งผลให้เซลล์ และอาหารเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ได้สะดวก ซึ่งจะช่วยให้เซลล์เจริญได้ดี [Oudadesse, H. และคณะ 2005]

จากการเปรียบเทียบผลของความแตกต่างความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมขวางมากขึ้น ส่งผลทำให้ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอบนจุเกิดด้วยเจลาติน (G100C0) มีความพรุนมากขึ้น แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอบนจุเกิดด้วยสารผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่าในการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.15% โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 สูตรมีความพรุนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% เนื่องจาก ร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เข้าไปคอบนจุเกิดในโครงเลี้ยงเซลล์มีมากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ 0.15%

ตารางที่ 4.4 ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสม เจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ประเภทโครงเลี้ยงเซลล์	ความพรุน(%) เมื่อคอนจุกต์ด้วยความเข้มข้นสารละลายกลูตารัลดีไฮด์		
	0.1%	0.15%	0.2%
G0C0(SF)	92.44±0.88 ^a		
G100C0	82.15±1.13 ^b	84.95±1.15 ^c	88.28±0.80 ^e
G90C10	81.84±1.14 ^b	77.64±1.02 ^d	86.54±1.14 ^{c,e}
G80C20	81.69±0.80 ^b	77.96±1.54 ^d	87.05±0.71 ^e
G70C30	81.97±0.85 ^b	78.51±1.22 ^d	88.02±0.93 ^e

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

4.1.3 สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทนแรงกดในรูปมอดูลัสของการกด (Compressive modulus) ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) โดยทดสอบในสภาวะแห้งแสดงในรูปที่ 4.8 (A) และสภาวะเปียกแสดงในรูปที่ 4.8 (B)

สำหรับในสภาวะแห้ง มอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) มีค่าเท่ากับ 355 ± 38 กิโลปาสคัล และเมื่อทำการคอนจุกต์โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วยเจลาตินที่ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ 0.1% พบว่ามีมอดูลัสของการกดเท่ากับ 538 ± 40 กิโลปาสคัล ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 51% เมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับรายงานของจิตติมา ซึ่งรายงานว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย มีค่ามอดูลัสของการกด 262 ± 61 กิโลปาสคัล และเมื่อคอนจุกต์โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วยสารละลายเจลาตินทำให้มีค่ามอดูลัสของการกดเพิ่มขึ้นถึง 506 ± 151 กิโลปาสคัล [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008]

เมื่อพิจารณาในกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ 0.1% พบว่ามีมอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินเพียงอย่างเดียวและมีแนวโน้มสูงขึ้นเป็นลำดับเมื่อมีปริมาณโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในการคอนจุกต์เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้น่าจะเนื่องมาจากปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีความหนาแน่นมากขึ้นด้วย จึงส่งผลให้ช่วยเสริมความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อพิจารณากรณีที่ใช้ความเข้มข้นสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ 0.15% และ 0.2% พบว่าค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับกรณีที่ใช้ความเข้มข้นสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ 0.1%

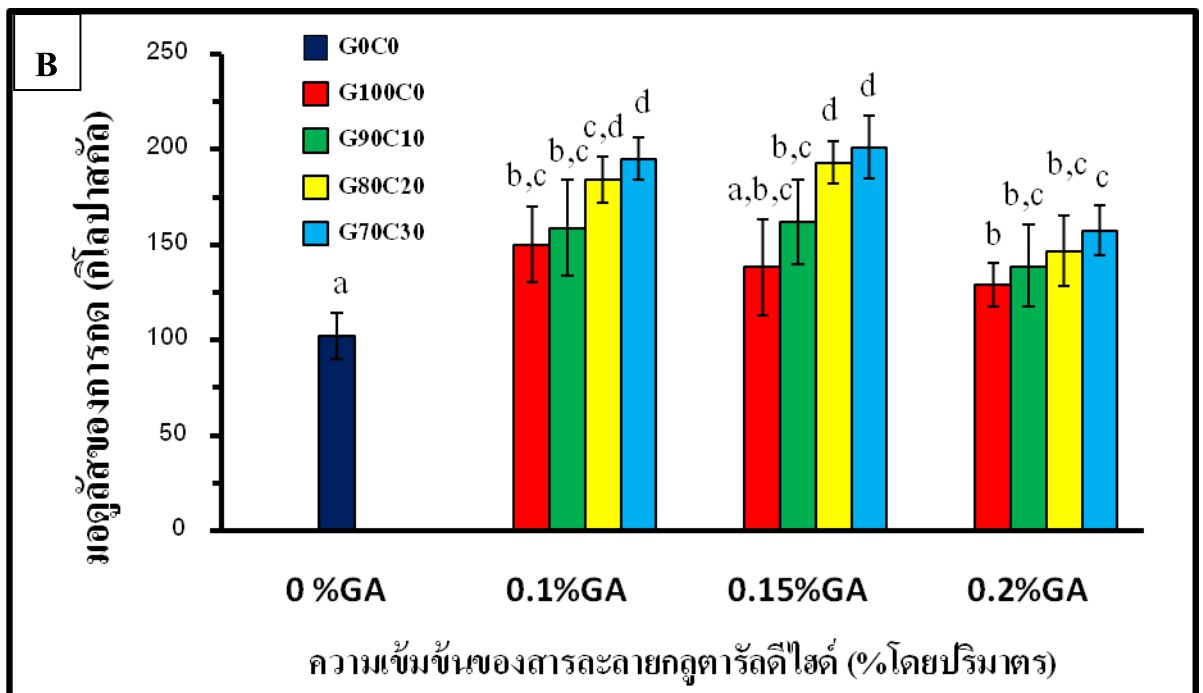
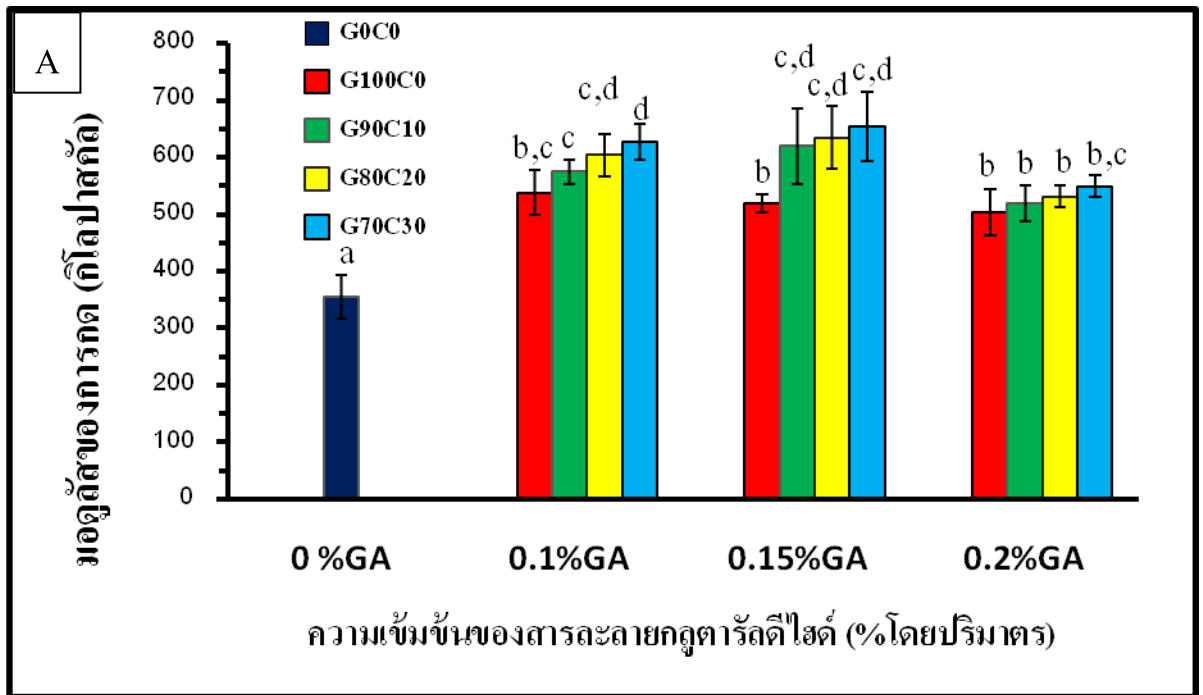
เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวางต่อค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ แยกพิจารณาเป็นสองส่วน ส่วนแรกคือโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (G100C0) พบว่ามีมอดูลัสของการกดมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวางมากขึ้น ส่วนที่สองคือโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์

0.15% โคร่งเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 สูตรมีมอดูลัสของการกตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ประเภทเดียวกันที่เชื่อมขวางด้วยความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ 0.1% และ 0.2% เนื่องจากมีร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินมีมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ 0.1% และ 0.2%

เมื่อพิจารณาค่ามอดูลัสของการกตของโคร่งเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเปียก ภายหลังจากการนำโคร่งเลี้ยงเซลล์เข้าในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) มีค่ามอดูลัสของการกตเท่ากับ 102 ± 12 กิโลปาสคัล และสำหรับโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) ที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ 0.1%, 0.15% และ 0.2% พบว่ามีค่ามอดูลัสของการกตสูงกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย และเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวางต่อค่ามอดูลัสของการกต พบว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 4 สูตร ได้ผลออกมาคล้ายคลึงกับกรณีในการทดสอบในสภาวะแห้ง

เมื่อเปรียบเทียบค่ามอดูลัสของการกตของโคร่งเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งและสภาวะเปียก พบว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบในสภาวะแห้งมีค่ามอดูลัสของการกตมากกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบในสภาวะเปียก โดยค่ามอดูลัสของการกตของโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) ในสภาวะแห้งมีค่าสูงกว่าในสภาวะเปียกถึง 3 เท่า และสำหรับโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 พบว่าในสภาวะแห้งมีค่ามอดูลัสของการกตสูงกว่าในสภาวะเปียกประมาณ 3-4 เท่า

จากการทดลองเมื่อพิจารณาค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโคร่งเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย พบว่าเมื่อร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกคอนจูเกตในโคร่งเลี้ยงเซลล์มีค่ามากขึ้น ส่งผลให้มีความหนาแน่นของโคร่งเลี้ยงเซลล์มากขึ้น ทำให้โคร่งเลี้ยงเซลล์มีความพรุนน้อยลงและมีค่ามอดูลัสของการกตสูงขึ้น



รูปที่ 4.8 ค่ามอดูลัสของการกตของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรดีน (A) สภาวะแห้ง และ (B) สภาวะเปียก

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

จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพทั้งหมด สรุปได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ 0.15% พบว่าร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่คอนจุกต์ด้วยเจลาติน (G100C0) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30)

จากนั้นเมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ 0.1% และ 0.2% ในการเชื่อมขวาง พบว่าปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินมีปริมาณร้อยละ 28-29 และร้อยละ 22-24 ตามลำดับ และจากปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สูงกว่า ส่งผลให้ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์และค่ามอดุลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าสูงกว่า ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ 0.1% ในการคอนจุกต์โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อนำไปทดสอบสมบัติทางด้านชีววิทยาต่อไป

4.2 สมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

4.2.1 การยึดเกาะ (attachment) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA assays แสดงผลในรูปที่ 4.9 รวมถึงค่าร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) แสดงในตารางที่ 4.5

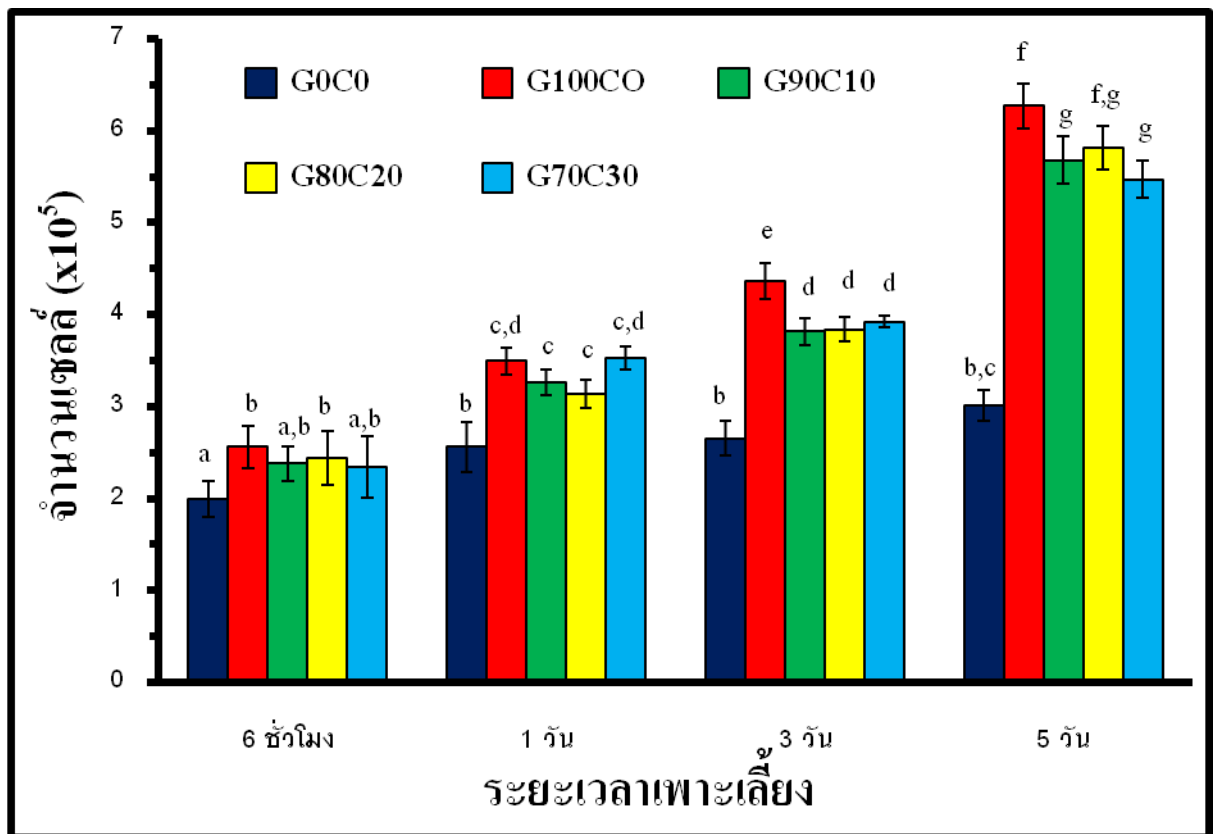
เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) กับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (G100C0) พบว่า เซลล์สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ G100C0 (ร้อยละของการยึดเกาะเท่ากับ 51.3) ได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G0C0 (ร้อยละของการยึดเกาะเท่ากับ 40.0) หลังจากนั้นเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 วัน เพื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า เซลล์เจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ G100C0 ได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไทยเพียงอย่างเดียว (G0C0) โดยพิจารณาจากค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT) ของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งคำนวณจากช่วงการเพาะเลี้ยง 6-120 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ G100C0 มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 88 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ G0C0 (192 ชั่วโมง) คิดเป็น 45% และจากงานวิจัยของณัฐพล และคณะ (2009) ได้รายงานร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและค่าการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินโดยใช้สารละลายอีดีซี/เอ็นเอชเอส (EDC/NHS) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น 1×10^6 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีค่าร้อยละของการยึดเกาะเท่ากับ 65% ของจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงเริ่มต้น และค่าการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 51 ชั่วโมง [Vachiraroj, N. และคณะ 2009] จึงกล่าวได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินช่วยส่งเสริมให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยเพียงอย่างเดียว เนื่องมาจากโครงเลี้ยงเซลล์ G100C0 มีเจลาตินเข้าไปคอนจูเกตในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเจลาตินมีรายงานว่าช่วยให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีเพราะเจลาตินมีลำดับของกรดอะมิโน RGD ซึ่งช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ [Lian, J.B. และคณะ 2006, Chamchongkaset, J. และคณะ 2008]

เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) กับ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่า เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ G90C10, G80C20 และ G70C30 ได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G0C0 ประกอบกับเมื่อพิจารณาค่าการแบ่งตัวทวีคูณพบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ G90C10, G80C20 และ G70C30 มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณน้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ G0C0 จึงกล่าวได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ช่วยส่งผลให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยเพียงอย่างเดียว

จากนั้นเปรียบเทียบการยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาติน (G100C0) กับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่า จำนวนเซลล์ที่สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินมีประมาณ 51% ของจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีเซลล์ยึดเกาะประมาณ 46-48% และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปเป็นเวลา 5 วัน พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินได้มากกว่าเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์เมื่อพิจารณาค่าการแบ่งตัวทวีคูณ พบว่า เซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ G100C0 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ประมาณ 7.8×10^{-3} ต่อชั่วโมงและค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 88 ชั่วโมง แต่สำหรับเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ $7.4-7.6 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมงและค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณประมาณ 90-93 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาผลของสัดส่วนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่า เมื่อมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในสารละลายผสมที่ใช้คอนจูเกตเพิ่มสูงขึ้นจาก 10 ถึง 30 เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของเซลล์ภายหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดาเป็นเวลา 5 วัน ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) มีลักษณะกลม มีการแผ่ของเซลล์น้อย แต่สำหรับในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่

ไทยที่คอกอนุเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 4 สูตร (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่าตัวเซลล์มีการแผ่มากกว่าเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0)



รูปที่ 4.9 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดกระดูก (MSC) ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอกอนุเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมชาติที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (a - g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

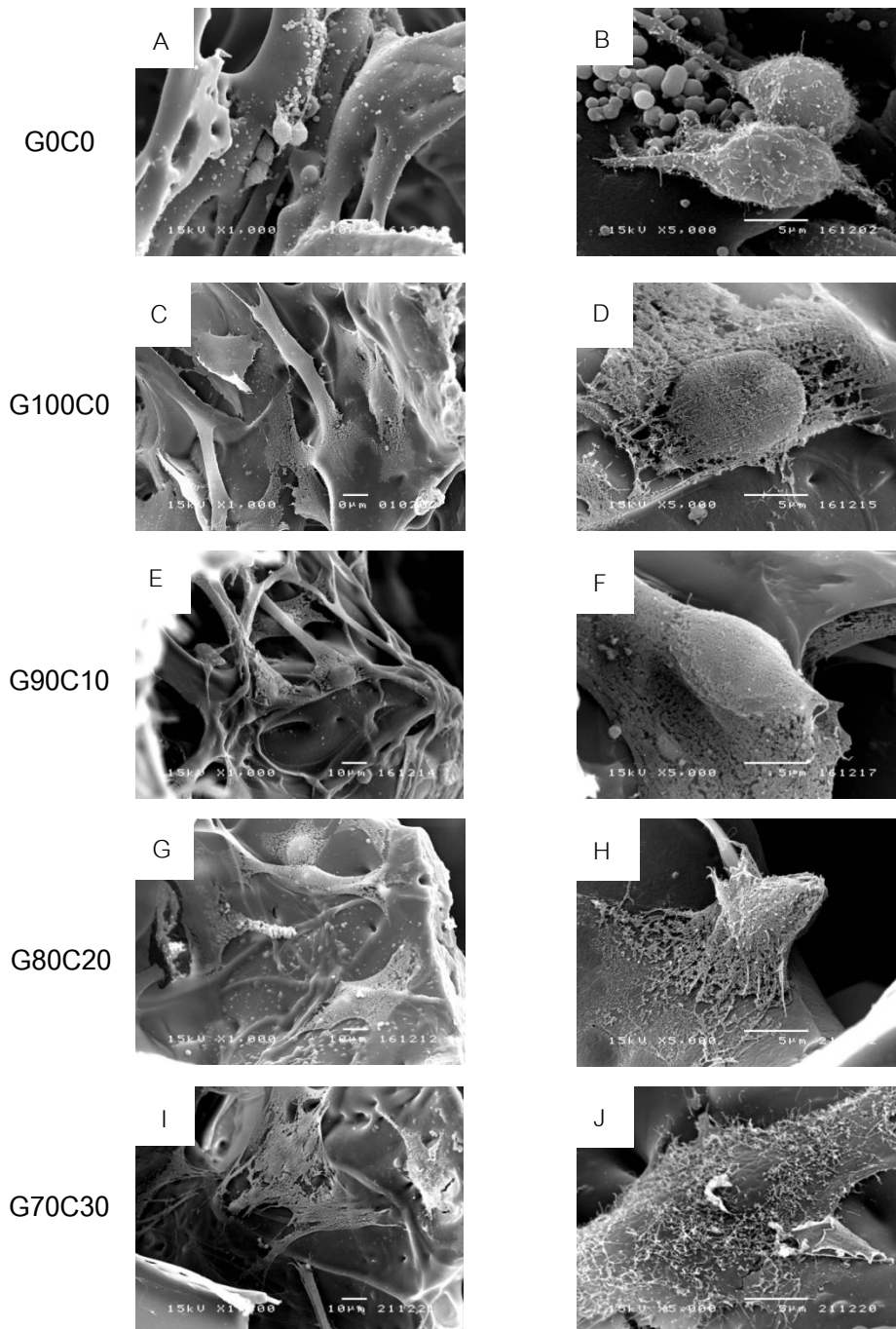
ตารางที่ 4.5 ค่าการยืดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (%), เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่ คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

โครงเลี้ยงเซลล์	ร้อยละของการยืดเกาะของ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
G0C0	40.0±3.9 ^a	192.7±13.3 ^c	3.6±1.0 × 10 ^{-3e}
G100C0	51.3±4.7 ^b	88.4±3.5 ^d	7.8±0.4 × 10 ^{-3f}
G90C10	47.6±3.7 ^{a,b}	90.9±4.0 ^d	7.6±0.3 × 10 ^{-3f}
G80C20	48.8±5.9 ^b	91.0±4.7 ^d	7.6±0.1 × 10 ^{-3f}
G70C30	46.9±6.6 ^{a,b}	93.4±4.0 ^d	7.4±0.2 × 10 ^{-3f}

(a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “ร้อยละของการยืดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก”)

(c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ”)

(e และ f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์”)

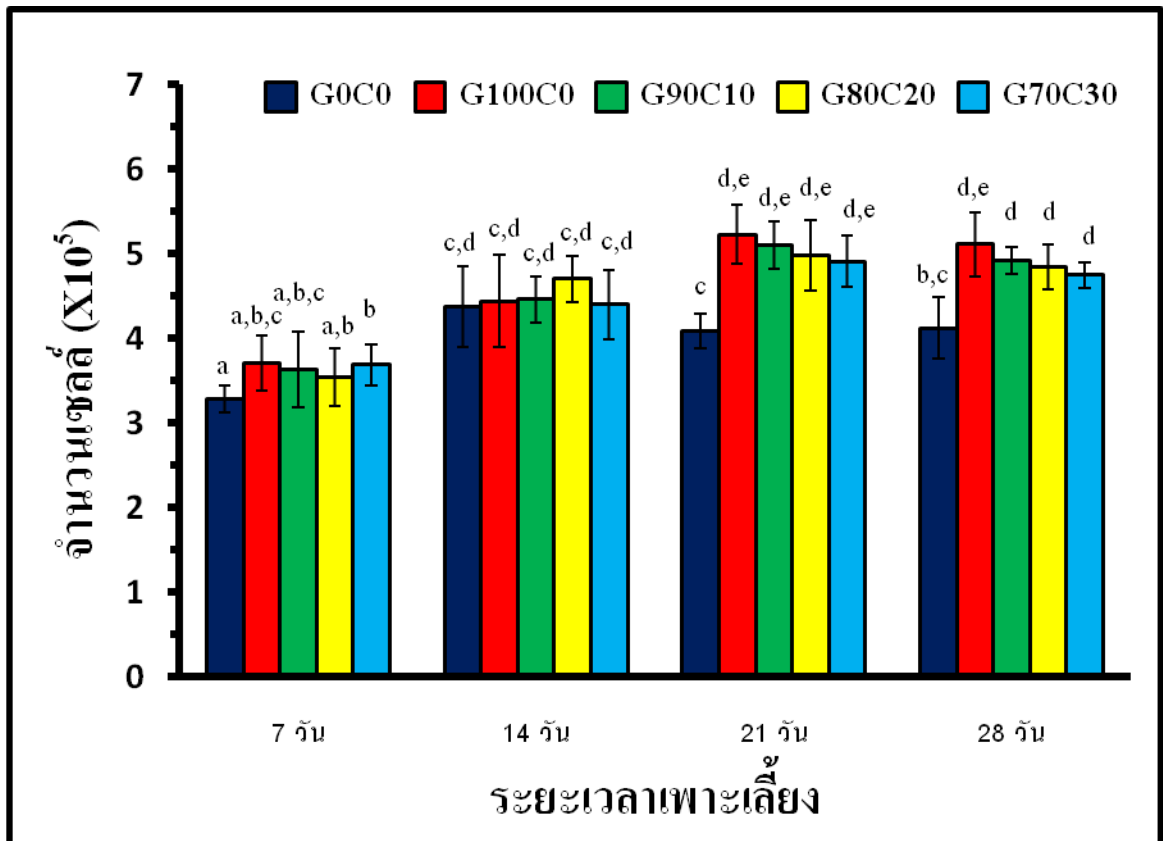


รูปที่ 4.10 ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย G0C0 (A-B), และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0 (C-D), G90C10 (E-F), G80C20 (G-H) และ G70C30 (I-J) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

4.2.2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของของเซลล์ MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยทำการวัดจำนวนเซลล์ ด้วยวิธี DNA assays แสดงผลในรูปแบบที่ 4.11 รวมถึงค่าการแบ่งตัวทวีคูณและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้น มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย อันเนื่องมาจาก เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่ชักนำไปเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Belmonte, M และคณะ 2005, Ratanavaraporn, J. และคณะ 2010] จากนั้นเมื่อพิจารณาค่าการ เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ที่ระยะเวลา 7 วันถึง 21 วัน และค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ พบว่า เซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยใช้ระยะเวลาในการแบ่งตัวเป็นทวีคูณถึง 1208 ชั่วโมงและสำหรับเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์ใช้ระยะเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณอยู่ที่ 679–829 ชั่วโมง สำหรับค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ สูงกว่าเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย



รูปที่ 4.11 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (MSC) บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ,p < 0.05)

ตารางที่ 4.6 เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) ของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรลีนไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโลลิโกแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก

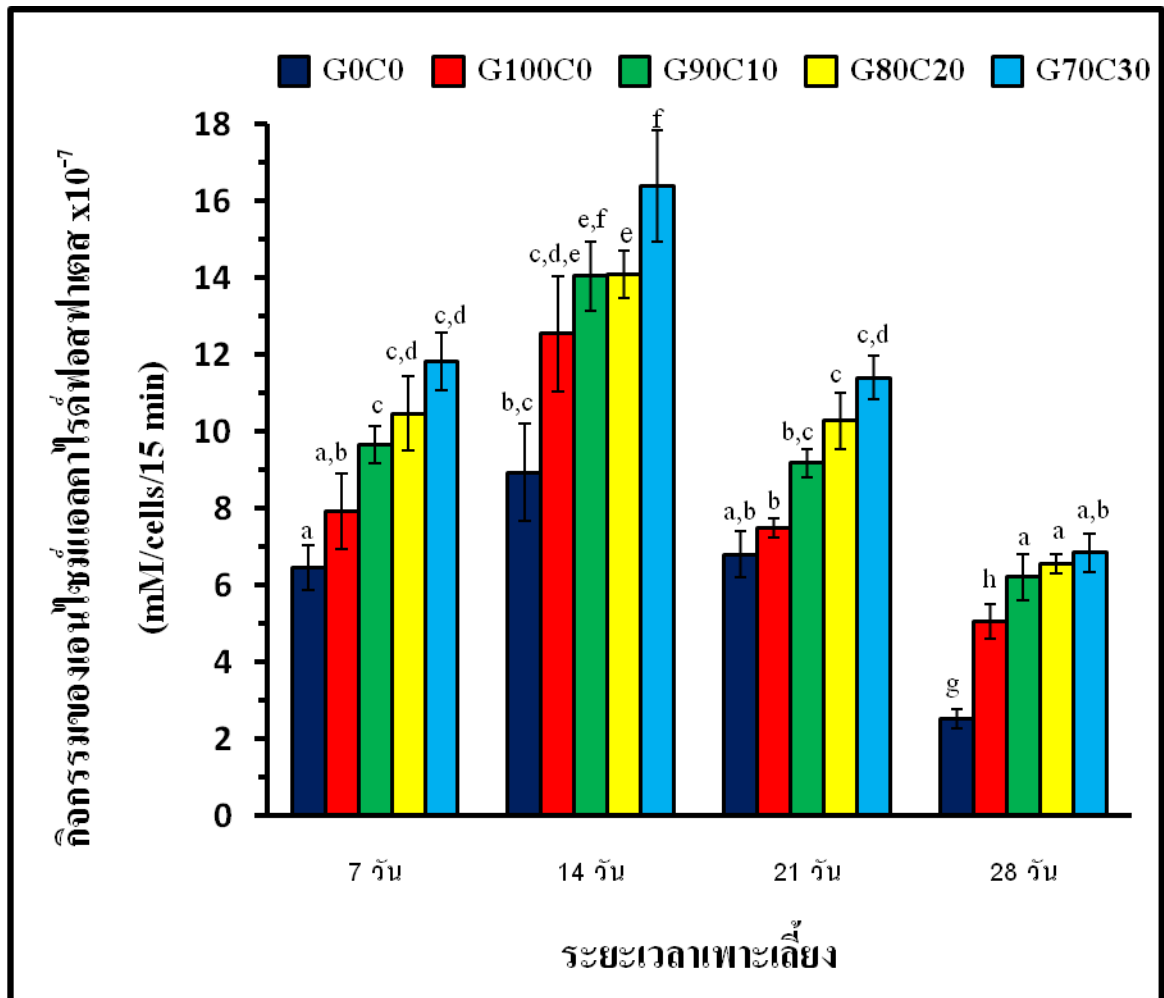
โครงเลี้ยงเซลล์	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
G0C0	1208.8±53.9 ^a	0.7±0.2 × 10 ^{-3d}
G100C0	679.4±44.3 ^b	1.0±0.1 × 10 ^{-3e}
G90C10	758.3±43.1 ^{b,c}	1.0±0.1 × 10 ^{-3e}
G80C20	749.9±37.2 ^{b,c}	1.0±0.1 × 10 ^{-3e}
G70C30	829.9±41.1 ^c	0.9±0.0 × 10 ^{-3e}

(a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ”)

(d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์”)

จากรูปที่ 4.12 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) บนโครงเลี้ยงเซลล์ G0C0, G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งพบว่า ในช่วงวันที่ 7-14 ปริมาณเอนไซม์ (ALP) จะเพิ่มขึ้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดโดยจะมีค่าสูงสุด ณ วันที่ 14 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานกว่า 14 วัน (14-28 วัน) พบว่า ปริมาณของเอนไซม์ ALP ที่เกิดขึ้นลดลงสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิด ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานที่ว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของสารจำพวก osteo-inductive agents ได้แก่ β -glycerophosphate, glucocorticoids, sodium β -glycerophosphate, calcium hexose monophosphate และ dexamethasone มีผลต่อการเกิดกระดูก และ เอนไซม์ ALP ที่เซลล์สร้างขึ้นถือเป็นสัญญาณการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกช่วงแรก (early marker) ที่มักเกิดขึ้นสูงสุดในช่วงสองสัปดาห์แรกของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Kim, U.J. และคณะ 2005] อย่างไรก็ตาม มีรายงานของจุฑามาศและคณะ (2010) ที่พบว่า ปริมาณเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกยาวนานขึ้น [Ratanavaraporn, J. และคณะ 2010]

เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตรในช่วงระยะเวลาเพาะเลี้ยง 14 วัน พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) มีปริมาณเอนไซม์ ALP น้อยที่สุด และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยคอนจูเกตด้วยเจลาตินเพียงอย่างเดียว (G100C0) พบว่า มีปริมาณเอนไซม์ ALP มากขึ้น และเมื่อคอนจูเกตโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ ALP มากขึ้นตามสัดส่วนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสังเกตพบปริมาณเอนไซม์ ALP มากที่สุดในโครงเลี้ยงเซลล์ G70C30 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สัดส่วน 70/30 สามารถชักนำให้เซลล์สร้างกิจกรรมของเอนไซม์ ALP ได้มากที่สุด

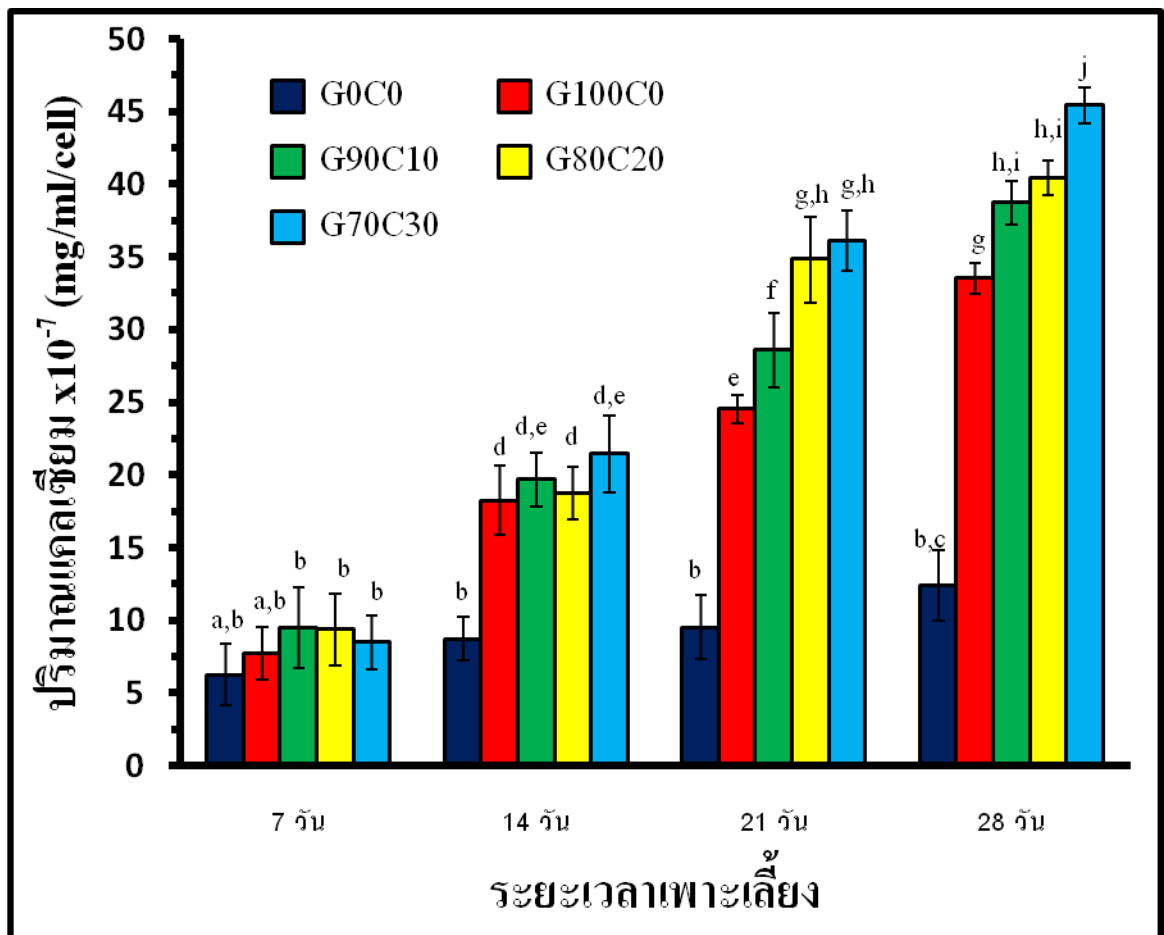


รูปที่ 4.12 กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (a - h แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่เซลล์สร้างขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์ G0C0, G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 สูตรที่มีการคอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) มีปริมาณแคลเซียมเพิ่มมากขึ้น เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์นานขึ้น โดยพบว่า มีปริมาณแคลเซียมสูงที่สุด ณ วันที่ 28 มีเพียงโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย G0C0 เท่านั้นที่มีปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก 7 วันเป็น 28 วัน โดยมีรายงานว่าแคลเซียมที่เกิดขึ้นเป็น late marker ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Porter, R. 2004]

เมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ในแต่ละสูตรในช่วงระยะเวลาเพาะเลี้ยง 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) มีปริมาณแคลเซียมเกิดขึ้นน้อยที่สุด เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยคอนจูเกตด้วยเจลาติน (G100C0) พบว่า มีปริมาณแคลเซียมมากขึ้น และเมื่อคอนจูเกตโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่า หากปริมาณโคโตโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยพบปริมาณแคลเซียมสูงที่สุดในโครงเลี้ยงเซลล์ G70C30 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่เซลล์สร้างขึ้นนี้ สอดคล้องกับปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ ALP กล่าวคือ สัญญาณ (marker) การเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกของเซลล์ MSC สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 (G70C30)

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของจุฑามาศ ที่ระบุว่าฟิล์มที่เตรียมจากสารผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (น้ำหนักโมเลกุล 1,400 ดาลตัน) ที่อัตราส่วนผสม 70/30 ช่วยชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Ratanavaraporn, J. และคณะ 2010]

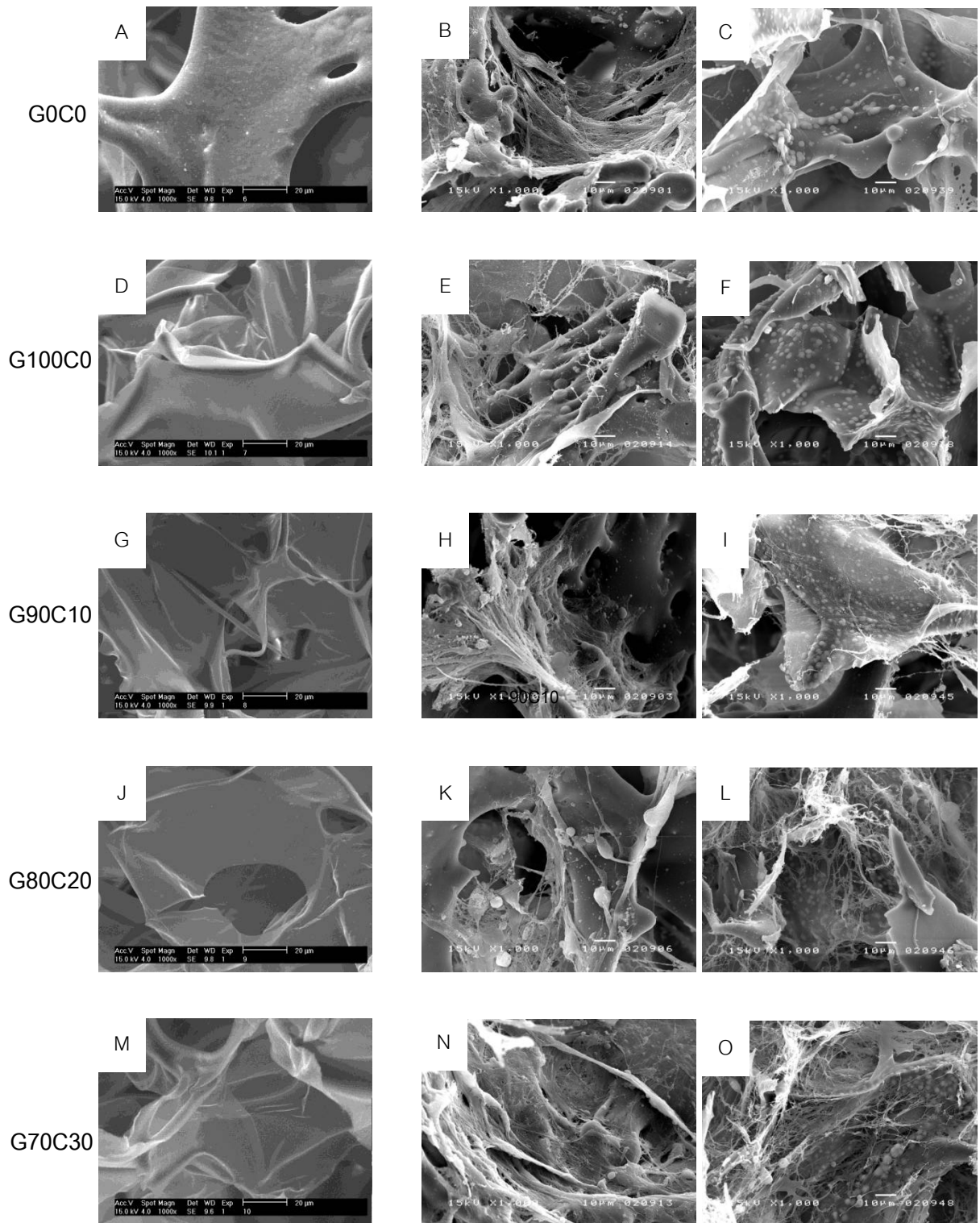


รูปที่ 4.13 ปริมาณแคลเซียมบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂

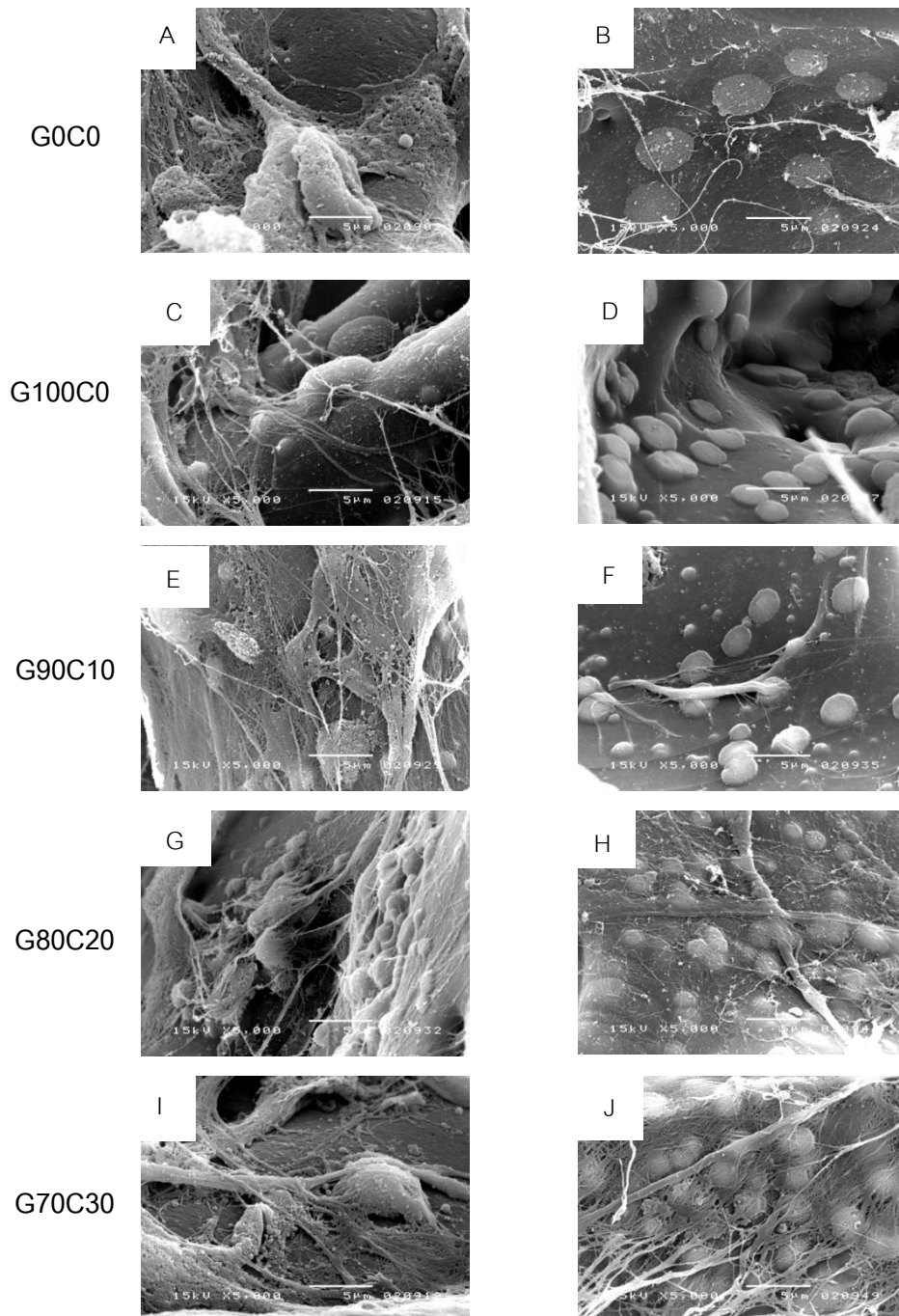
(a - j แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

โครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ใน OM เป็นเวลา 28 วัน
แต่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (สเกลบาร์ 20 ไมโครเมตร)

โครงเลี้ยงเซลล์หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ใน OM เป็นเวลา 28 วัน 88
(สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4.14 ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย G0C0 และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0, G90C10, G80C20 และ (G70C30) โดยเปรียบเทียบ 2 สภาวะ
ก) โครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ใน OM เป็นเวลา 28 วันแต่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (A, D, G, J และ M)
ข) โครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก เป็นเวลา 28 วันใน OM (B, C, E, F, H, I, K, L, N และ O)



รูปที่ 4.15 ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย G0C0 (A-B) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ G100C0 (C-D), G90C10 (E-F), G80C20 (G-H) และ G70C30 (I-J) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (MSC) เป็นเวลา 28 วันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก, ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)

จากรูปที่ 4.14 และ 4.15 แสดงลักษณะพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร ได้แก่โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30) โดยแสดงเปรียบเทียบของสภาวะคือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกแต่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ กับโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 28 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในอาหารที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกแต่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์มีพื้นผิวเรียบ แต่สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า มีเซลล์เกาะอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร โดยเซลล์ที่เกาะอยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร มีลักษณะคล้ายกัน มีการแผ่ขยายและสร้างเมทริกซ์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีก้อนเม็ดกระจายอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร ซึ่งก้อนเม็ดดังกล่าวไม่พบในกรณีโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ก้อนเม็ดที่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเซลล์ ไม่ได้เกิดขึ้นจากการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์

จากการตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) ที่มีอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ (ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์), โครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในอาหารที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์) และโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก เป็นเวลา 28 วัน (ตารางที่ 4.7) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร อันได้แก่ G0C0, G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 มีเพียงคาร์บอนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนคาร์บอนประมาณ 69-89% และออกซิเจนประมาณ 10-30% แต่ไม่พบแคลเซียมและฟอสฟอรัส เนื่องจากมีเพียงสารอินทรีย์ (โปรตีนและพอลิแซคคาไรด์) เป็นองค์ประกอบเท่านั้น จากนั้นเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตรไปแช่ไว้ในอาหารที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตร มีเพียงคาร์บอนและออกซิเจนเช่นเดียวกัน โดยมีคาร์บอนประมาณ 69-82% มีออกซิเจนประมาณ 11-34% ไม่พบแคลเซียมและฟอสฟอรัสบนโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงให้ทราบว่า การแช่โครงเลี้ยงเซลล์ไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก โดยไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ ไม่ทำให้มีแคลเซียมและฟอสฟอรัสเกิดขึ้นบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 สูตรไปเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 28 วันในอาหารที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

พบว่า มีการตรวจพบแคลเซียมและฟอสฟอรัสร่วมกับคาร์บอนและออกซิเจน ซึ่งจากผลการวัดปริมาณแคลเซียมด้วยเครื่อง EDX นี้ช่วยสนับสนุนผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมด้วยวิธี Calcium assay ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.13 ทำให้ยืนยันได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงมีการสร้างแคลเซียมขึ้นบนโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละประเภทในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยกล่าวได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย (G0C0) มีปริมาณแคลเซียมเกิดขึ้นเพียง 1-3% เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาคอนจุกต์ด้วยเจลาตินเพียงอย่างเดียว (G100C0) พบว่ามีปริมาณแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นเล็กน้อย และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมาคอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) ส่งผลให้มีปริมาณแคลเซียมที่เกิดขึ้นเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งมีปริมาณแคลเซียมที่เกิดขึ้นอยู่ที่ประมาณ 15-23% เมื่อพิจารณาอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส ที่อยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยพบว่า มีสัดส่วนอยู่ในช่วง 1.32-1.44 และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาคอนจุกต์ด้วยเจลาตินเพียงอย่างเดียว (G100C0) พบว่ามีช่วงอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสสูงขึ้นไปเป็น 1.17-1.95 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของชัชววรรณซึ่งแสดงอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสที่เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกผลิตขึ้นในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยเจลาตินเท่ากับ 1.47 และ 1.58 ตามลำดับ [Tritanipakul, S. 2009]

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมาคอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (G90C10, G80C20 และ G70C30) พบว่ามีอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสอยู่ในช่วงที่มีแนวโน้มสูงขึ้น ทั้งนี้อัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสในสารประกอบเชิงซ้อนของแคลเซียมและฟอสเฟตจะแตกต่างกันตามประเภทของสารประกอบเช่น สารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์มีอัตราส่วนโดยโมล Ca/P เท่ากับ 1.67 (อัตราส่วนโดยน้ำหนัก Ca/P เท่ากับ 2.15), ไบฟอสเฟตแคลเซียมฟอสเฟตมีอัตราส่วนโดยโมล Ca/P เท่ากับ 1.60 (อัตราส่วนโดยน้ำหนัก Ca/P เท่ากับ 2.06) และ เบตาไตรแคลเซียมฟอสเฟตมีอัตราส่วน Ca/P เท่ากับ 1.50 (อัตราส่วนโดยน้ำหนัก Ca/P เท่ากับ 1.94) [Zhang, L. และคณะ 2009]

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีส่วนสำคัญในการช่วยชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก

ตารางที่ 4.7 ปริมาณธาตุ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ตรวจสอบด้วย EDX ของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยและโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วย เจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์หลังการเพาะเลี้ยง MSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ เป็นเวลา 28 วัน เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันในสภาวะเดียวกันและโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ (ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์และไม่ได้แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์)

โครงเลี้ยง เซลล์	โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ (ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์)					โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ และแช่ใน OM* เป็นเวลา 28 วัน					โครงเลี้ยงเซลล์หลัง เพาะเลี้ยงเซลล์ใน OM* เป็นเวลา 28 วัน				
	C** (%)	O (%)	Ca (%)	P (%)	Ca : P	C** (%)	O (%)	Ca (%)	P (%)	Ca : P	C** (%)	O (%)	Ca (%)	P (%)	Ca : P
G0C0	83-86	13-16	0	0	0	72-81	18-27	0	0	0	75-77	15-23	1-3	1-2	1.32-1.44
G100C0	83 -89	10-16	0	0	0	76-82	11-34	0	0	0	74-76	10-14	5-9	3-5	1.17-1.95
G90C10	69-85	14-30	0	0	0	70-77	22-29	0	0	0	48-60	13-21	15-18	10-13	1.15-1.41
G80C20	85-88	11-14	0	0	0	75-82	17-24	0	0	0	51-53	13-18	17-21	11-15	1.25-1.57
G70C30	75-89	10-24	0	0	0	69-80	19-30	0	0	0	38-45	18-22	19-23	13-17	1.50-1.73

* OM คือ Osteogenic medium (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก)

** เปอร์เซ็นต์ธาตุคาร์บอนที่วัดได้ ส่วนหนึ่งมีผลมาจากคาร์บอนที่ใช้ในการเคลือบชิ้นงานก่อนกระบวนการวิเคราะห์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลการคอนจุกต์ด้วยเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก (salt-leaching) พบว่าโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมีพื้นผิวเรียบ และมีรูพรุนเชื่อมต่อกัน เมื่อทำการดัดแปรพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยโดยการคอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินกับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เท่ากับ 100/0, 90/10, 80/20 และ 70/30 และใช้สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% ในการเชื่อมขวาง พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.1% โดยปริมาตรจะได้ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 สูตรได้แก่ G100C0, G90C10, G80C20 และ G70C30 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ประมาณร้อยละ 28-29 ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.2% มีปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 สูตรเพียงร้อยละ 22-24 แต่ถ้าหากใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.05% พบว่า เมื่อปริมาณอัตราส่วนไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มมากขึ้นจะไม่สามารถเกิดการคอนจุกต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่เตรียมได้มีความพรุน 92.22% เมื่อทำการคอนจุกต์เจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.1% พบว่าความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงเท่ากับ 82-83% เนื่องจากมีปริมาณเนื้อสารเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้าไปอยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย และส่งผลต่อเนื่องถึงค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมีค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ 355 กิโลปาสคัล เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมาคอนจุกต์ด้วยเจลาติน พบว่ามีค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์สูงขึ้นถึง 538 กิโลปาสคัล และเมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยคอนจุกต์ด้วยเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มาทดสอบหาค่ามอดูลัส

พบว่า เมื่อมีปริมาณโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในการคอนจูเกตเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ (575-627 กิโลปาสคัล)

จากการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยผลการทดลองการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินเพียงอย่างเดียว มีเซลล์มายึดเกาะและเจริญเติบโตได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย สรุปได้ว่าเจลาตินช่วยสนับสนุนให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยมาคอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า เซลล์สามารถมายึดเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยเช่นกัน แต่น้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินเพียงอย่างเดียว ในทางตรงกันข้าม ผลการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายเจลาตินเพียงอย่างเดียว โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALP และปริมาณแคลเซียมสูงที่สุดในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30

ผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า ชีววัสดุผสมของเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกได้ดีในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย ในขณะที่เจลาติน (ไม่มีส่วนผสมของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์) จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการคอนจูเกตด้วยเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีต่อสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีจุดที่น่าสนใจที่พิจารณานำไปศึกษาในอนาคต ได้แก่

1. การทดสอบสมบัติทางชีวภาพในสัตว์ทดลองของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์
2. การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย ด้วยวัสดุใหม่ไทยสายพันธุ์อื่นๆ นอกเหนือจากใหม่ไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากนั้นทำการคอนจูเกตด้วยสารละลายผสม

เจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเปรียบเทียบว่าไหมไทยสายพันธุ์อื่นๆ มีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากน้อยเพียงใด

รายการอ้างอิง

- Belmonte, M.M., Lucarini, G., Virgili, L., Biagini, G., Detomaso, L., Favia, P., D' Agostino, R., Gristina, R., Gigante, A. and Bevilacqua, C. Mesenchymal stem cells on plasma-deposited acrylic acid coatings: An in vitro investigation to improve biomaterial performance in bone reconstruction, Journal of Bioactive and Compatible Polymers 20 (2005): 343-360.
- Bhatnagar, A. and Sillanpää, M. Applications of chitin-and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater Advances in Colloid and Interface Science 152 (2009):26–38.
- Biman, B. M., Jasdeep, K. M. and Kundu, S.C. Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release, European Journal of Pharmaceutical Sciences 37 (2009): 160–171.
- Bone (Online) 2010, Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bone> (2010, September 13).
- Bronzino, J.D. Biomedical engineering fundamentals. New York: Taylor & Francis, (2006).
- Bryan H. Derrickson, Tortora and Gerard J. Principles of anatomy and physiology. New York: Wiley, (2005).
- Carmen, A.C and Corcuera, B.L. Structure function and regulation of glycine neurotransmitters, European Journal of Pharmacology 479 (2003): 249– 262.
- Chaithaworn, N. Effects of gelatin conjugation and hydroxyapatite deposition on thai silk fibroin scaffold. Master's thesis, Department of chemical engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (2007).
- Chamchongkaset, J., Kanokpanont, S., Kaplan, D.L. and Damrongsakkul, S. Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering, Advanced Material Research 55–57 (2008): 685–688.
- Chang, B.S. and others. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. Biomaterials 21(2002): 1291-1298.

- Chen, Y.J, Kim, I.H., Cho, J.H., Yoo, J.S., Wang, H.Y., Kim, H.J. and Shin, S.O. Effects of chitooligosaccharide supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and immune responses after lipopolysaccharide challenge in weanling pigs, Livestock Science 124 (2009): 255–260.
- Crini, G. and Badot, P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye, Journal of Polymer Science 33 (2008): 399–447.
- Damink, L.O.; Dijkstra, P.J.; Feijen, J.; Luyn, M.J.A.; Wachem, P.B.; and Nieuwenhuis, P. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. Biomaterials 17 (1996): 765–773.
- Donzelli, E. and others. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. Archives of oral biology 52 (2007): 64-73.
- Drexel University Libraries Homepage, (Online) 2010 Available from:
<http://dspace.library.drexel.edu/retrieve/4251/CHAPTER2.pdf> (2010, June 19).
- Drexel University Libraries Homepage, (Online) 2010 Available from:
<http://www.drugdeliverytech.com/cufm/jpg/002870.jpg> (2010, July 1).
- Duthie, R.B. and Bentley, G. Mercer's Orthopaedic Surgery. 8th ed. London: Butler and Tanner, 27 (1983).
- Elaine N, Ohman C, Baleani M, Perilli E, Ara E.D, Tassani S, Baruffaldi F, Viceconti M
Mechanical testing of cancellous bone from the femoral head: Experimental errors due to off-axis measurements Journal of Biomechanics 40 (2006) 2426–2433.
- Friess, W. Review article Collagen-biomaterial for drug delivery, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45 (1998): 113-136.
- Gil, E.S., Frankowski, D.J., Hudson, S.M. and Spontak, R.J. Silk fibroin membranes from solvent-crystallized silk fibroin/gelatin blends: Effects of blend and solvent composition, Materials Science and Engineering C 27 (2007):426–431.

- Guang, C. and others. Silk fibroin modified porous poly(-caprolactone) scaffold for human fibroblast culture in vitro. Journal of Materials Science. Material in medical (2004): 671-677.
- Gulrajani M.L., Sampaio S, Taddei P, Buchertn j, Freddi G Enzymatic grafting of chitosan onto *Bombyx mori* silk fibroin: kinetic and IR vibrational studies Journal of Biotechnology 116 (2005) 21–33.
- Hamann, T., Measurements and Modeling of Recombination from Nanoparticle TiO₂ Electrodes (Online) 2010 Available from: <http://www.cem.msu.edu> (2010, June 15).
- Hofmann, S., Hagenmullar, H., Koch, A.M., Mullar, R., Novakovic, G.V., Kaplan, D.L., Merkle, H.P. and Meinel, L. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. Biomaterials 28 (2007): 1152-1162.
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H. and Tabata, Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide–amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor, Biomaterials 27 (2006):5089-5098.
- Hsu, S., Whu, S. W., Tsai, C., Wu, Y., Chen, H. and Hsieh, K. (2004). Chitosan as scaffold materials: Effects of molecular weight and degree of deacetylation, Journal of Polymer Research 11:141-147.
- Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 21 (2000): 2529-2543.
- Kaeyanon, C and Wongsangchantra, P.Y. Degumming of thai silk with bacterial protease, Master thesis, Department of Biotechnology and Center for Excellence in Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand (2005).
- Kachanechai, T., Jantawat, and Pichyangkura, R. The influence of chitosan on physico-chemical properties of chicken salt-soluble protein gel Food Hydrocolloids 22 (2008) 74–83.

- Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M. and Kaplan, D.L. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin, Biomaterials 26 (2005): 2775–2785.
- Komori, T. and Kishimoto, T. Cbfa1 in bone development. Curr Opin Genet Dev. (1998):494-499.
- Lannutti J., Reneker D., Ma T., Tomasko D. and Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds, Materials Science and Engineering C 27 (2007): 504-509.
- Lee, J.M., Edwards, H.H.L., Pereira, C.A. and Samii, S.I. Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), Journal of Materials Science 7 (1996):531-541.
- Lee, S. B., Kima, Y. H., Chonga, M. S., Hongb, S. H. and Lee, Y. M. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method, Biomaterials 26(2005): 1961-1968.
- Lennon, D.P., et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. Experimental Cell Research 219 (1995): 211-222.
- Lian, J.B.; and Stein, G.S. "Concept of osteoblast growth and differentiation: basis of modulation of bone cell development and tissue formation" Crit Rev Oral Biol Med, 3, 269-305 (1992).
- Lv, Q., Feng, Q., Hu, K. and Cui F. Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG₂ culture, Polymer 46 (2005): 12662– 12669.
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X. and Han, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineer, Biomaterials 24 (2003): 4833-4841.
- Mao, J.S., Liu, H.F., Yin, Y.J. and Yao, K.D. The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods, Biomaterials 24 (2003): 1621–1629.

- Meinel, L. and others. D. Silk implants for the healing of critical size bone defects, Bone 37 (2005) 688–698.
- Muyonga J.H Changa M C, Ko CC,. DouglasW H Conformational change of hydroxyapatite/gelatin nanocomposite by glutaraldehyde Biomaterials 24 (2003) 3087–3094.
- Netter, F.H. Musculoskeletal system: anatomy, physiology and metabolic disorders. Summit, New Jersey: Ciba-Geigy Corporation. (1987).
- Oudadesse H, Cheng M, Deng J, Yang F, Gong Y, Zhao N, Zhang X Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions Biomaterials 24 (2003) 2871–2880.
- Palsson, B. Principles and applications in engineering series: Tissue engineering. CRC Press LLC, (2003).
- Paul, K.C., and Xuanyang L. Biomaterials fabrication and processing handbook. Faylor&Fracis Group. USA. NW, (2008).
- Pek, Y.S., Spector, M., Yannas, I.V. and Gibson, L.J. Degradation of collagenchondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase, Biomaterials 25 (2004): 473-482.
- Peter, X.M. Scaffolds for tissue fabrication. Materialstoday (2004): 30-40.
- Petersen, G.I. Smiricky, M.R. and Stein. H.H. Apparent and standardized ileal digestibility of amino acids in gelatin-based diets by growing pigs. Animal feed Science and Technology 119 (2005) 107–115.
- Pieper, J., Hafmans, T., Veerkamp, J. and Kuppevelt, V.T. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS cross-linking and ultrastructural aspects, Biomaterials 21 (2000): 581-593.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. and SharmaC.P, Chitin and chitosan polymers:Chemistry, solubility and fiber formation, Progress in Polymer Science 34 (2009): 641–678.

- Porter, R Koller, M.R., Emerson, S.G. and Palsson, B.O. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. Blood 82 (2004): 378–384.
- Pörtner, R., Nagel-Heyer S., Goepfert, C., Adamietz, P., and Meenen, N.M. Bioreactor Design for Tissue Engineering. Journal of Bioscience and Bioengineering. 100 (2005): 235-245.
- Queen Sirikit Sericulture Center, Nakhonratchasima province, Thailand (Online) 2010 Available from: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygel.html> (2010, July 4).
- Queen Sirikit Sericulture Center, Nakhonratchasima province, Thailand (Online) 2010 Available from: http://www.en.rmut.ac.th/prd/Journal/Silk_with_figuresnew.pdf (2010, June 13).
- Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Tabata, Y. and Damrongsakkul, S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films, Carbohydrate Polymers 78, (2009): 873–878.
- Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Tabata, Y. and Damrongsakkul, S. Modulation of *In Vitro* Attachment, Proliferation and Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Stem Cells Using Different Molecular Weight Chitosans and Their Blends with Gelatin, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 21 (2010):979–996.
- Sang, B.L., Yong, H.K., Moo, S.C., Seung, H.H. and Young, M.L. Novel porous gelatin scaffolds by overrun/particle leaching process for tissue engineering applications. Biomaterials 26 (2005): 1961-1968.
- Sasithorn, N and Luepong, K. Silk Degumming with Dried Latex of Carica Papaya Linn, Master thesis, Faculty of Industry Textile and Fashion Design, Rajamangala University of Technology Phra Nakhon (2007).
- Sautier J.M., Nefussi J.R. and Forest N. In vitro differentiation and mineralization of cartilaginous nodules from enzymatically released rat nasal cartilage cells. Biology of the Cell 78, (1993): 181-189.

- Segtnan, V. and Isaksson, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatin gels studied by near infrared spectroscopy, Food Hydrocolloids 18 (2004): 1-11.
- She, Z. and Liu, W. Preparation and cytocompatibility of silk fibroin /chitosan scaffolds, Sci. China 3(3) (2009): 241–247.
- She, Z., Zhang, B., Jin, C., Feng, Q. and Xu, Y. Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold, Polymer Degradation and Stability 93, (2008): 1316–1322.
- Sheu, M.T, Huang JC, Yeh GC and Ho HO. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture, Biomaterials,22, (2001) 1713-1719.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Poggi, G.F., Marsano, E. and Maxwell, C.A., Wess, T.J., Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films, Polymer Degradation and Stability 91 (2006) : 3026-3032.
- Suh, J. K. F. and Matthew, H. W. T. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review, Biomaterials 21: 2589-2598.
- Tabata, Y Regenerative inductive therapy based on DDS technology of protein and gene Journal of Drug Targeting,; 14(7): (2006) 483–495
- Tabata, Y. and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices, Advanced Drug Delivery Reviews 31 (1998): 287-301.
- Takahashi Y. and Tabata Y. Homogeneous Seeding of Mesenchymal Stem Cells into Nonwoven Fabric for Tissue Engineering, Tissue Engineering 9 (2003):931-938.
- Takahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate, Biomaterials 26, (2005):3587-3596.
- Tangsadthakun, C. and others. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 18 (2007):147–163.

- Tritanipakul, S. Effects of gelatin conjugation and hydroxyapatite deposition on thai silk fibroin Scaffold. Master's thesis, Department of chemical engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University (2009).
- U.S. Food and Drug Administration (2006, March 3).
- Vachiraroj, N., Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Pichyangkura, R., Banaprasert, T. and Kanokpanont, S. A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on in vitro biocompatibility for bone substitutes, International Journal of Biological Macromolecules 45 (2009) 470-477.
- Vepari, C. and Kaplan, D.L. Silk as a biomaterial, Progress in Polymer Science 32 (2007): 991-1007.
- Wang, Y., Kim, H.J., Novakovic, G.V. and Kaplan, D.L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, Biomaterials 27 (2006): 6064-6082.
- Weave Informant Co., Ltd., (Online) 2010, Available from:<http://b.1asphost.com/4592010175/HTML/mai3.html> (2011, May 13).
- Wess, T. and Orgel, J. Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration, Thermochimica Acta 365 (2000): 119-128.
- Young, S., Wong, M., Tabata, Y. and Mikos, A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioreactive molecules, Journal of Controlled Release 109 (2005): 256-274.
- Yunoki, S., Suzuki, T. and Takai, M. Stabilization of low denaturation temperature collagen from fish by Physical cross-linking methods, Journal of Bioscience and Bioengineering 96 (2003): 575-577.
- Zhang, F., Zuo B., Zhang H. and Bai L. Studies of electrospun regenerated SF/TSF nanofibers, Polymer 50 (2009): 279-285.
- Zhang, L., Hanagata, N., Maeda, M., Minowa, T., Ikoma, T. and Zhang, X. Porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics promote ectopic osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells. Science and Technology of advance materials 10 (2009).

- Zhang, Y., Venugopal, J., Huang, Z., Lim, C. and Ramakrishna, S. Crosslink of the electrospun gelatin nanofibers, Polymer 47 (2006): 2911-2917.
- Zhang, Z.Y. and others Biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering, Biomaterials 30 (2009): 2694-2704.
- Zhending, S. Chenrui, J., Zhi, H., Bofeng, Z., Qingling, F. and Yingxin X. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization and culture with HepG2 cell, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19 (2008):3545–3553.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

**การคำนวณปริมาณหมู่อะมิโนของเจลาตินต่อ
ปริมาณหมู่อะมิโนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถคอนจูเกตได้**

สำหรับในงานวิจัยนี้ใช้น้ำหนักแห้งของเจลาติน/โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในสารละลายผสมคองที่ 1% โดยน้ำหนัก ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณกรดอะมิโนได้ดังนี้

ตัวอย่างสูตร G90C10

- น้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินเท่ากับ 10^5 ดาลตัน (ข้อมูลจากบริษัทผู้ผลิต)
- น้ำหนักโมเลกุลของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์เท่ากับ 5,900 ดาลตัน (ข้อมูลจากผล GPC)
- ในสารละลาย 100 มิลลิลิตรมีเจลาติน 0.9 กรัมและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 0.1 กรัม
- จากรายงานของ Petersen, G.I. และคณะ [Petersen, G.I. และคณะ 2005]: เจลาติน 100 % มีหมู่อะมิโนที่สามารถคอนจูเกตได้อยู่ประมาณ 10% ดังนั้นปริมาณหมู่อะมิโนของเจลาตินที่สามารถคอนจูเกตได้ = $0.9 \text{ กรัม} \times (1/10^5 \text{ กรัม/โมล}) \times (10/100) = 9 \times 10^{-7}$ โมล
- จากค่า % deacetylation ของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 99 % แสดงถึงสัดส่วนหมู่อะมิโนที่มีอยู่ในโมเลกุล ดังนั้นปริมาณหมู่อะมิโนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถคอนจูเกตได้ = $0.1 \text{ กรัม} \times (1/5900 \text{ กรัม/โมล}) \times (99/100) = 1.67 \times 10^{-5}$ โมล
- ดังนั้นสัดส่วนปริมาณหมู่อะมิโนของเจลาตินต่อปริมาณหมู่อะมิโนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถคอนจูเกตได้ ในสูตร G90C10 เท่ากับ 1 ต่อ 19

ตารางสรุปสัดส่วนปริมาณหมู่อะมิโนของเจลาตินต่อปริมาณหมู่อะมิโนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในสูตรโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

โครงเลี้ยงเซลล์	ร้อยละโดยน้ำหนักของเจลาตินในสารละลาย	ร้อยละโดยน้ำหนักของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในสารละลาย	ปริมาณหมู่อะมิโนของเจลาติน (โมล)	ปริมาณหมู่อะมิโนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (โมล)	ปริมาณหมู่อะมิโนของเจลาตินต่อปริมาณหมู่อะมิโนของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์
G100C0	100	0	1×10^{-6}	0	1:0
G90C10	90	10	9×10^{-7}	1.67×10^{-5}	1:19
G80C20	80	20	8×10^{-7}	3.35×10^{-5}	1:42
G70C30	70	30	7×10^{-7}	5.03×10^{-5}	1:72

ภาคผนวก ข.

ร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย

ตาราง ข.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย

โครงเลี้ยงเซลล์	ร้อยละโดยน้ำหนักเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย			
	กลูตารัลดีไฮด์ 0.05% โดย ปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.1% โดย ปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.15% โดย ปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.2% โดย ปริมาตร
G100C0	29.14±1.80	28.73±1.37	27.60±1.74	23.24±1.32
G90C10	26.35±2.00	29.56±0.29	33.31±1.40	24.26±0.85
G80C20	20.04±3.35	29.19±1.89	32.48±2.16	23.74±1.69
G70C30	12.16±3.01	28.89±1.28	31.91±1.86	22.55±0.65

ภาคผนวก ค.

ร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่หายไป
หลังจากแช่ในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตาราง ค.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละโดยน้ำหนักเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่หายไปหลังจากแช่ในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

โครงเลี้ยงเซลล์	ร้อยละโดยน้ำหนักเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่หายไป			
	กลูตารัลดีไฮด์ 0.05% โดย ปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.1% โดย ปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.15% โดย ปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.2% โดย ปริมาตร
G100C0	1.08±0.05	0.54±0.01	0.54±0.01	0.57±0.02
G90C10	1.10±0.04	0.53±0.01	0.51±0.01	0.57±0.02
G80C20	1.79±0.10	0.53±0.01	0.50±0.02	0.58±0.02
G70C30	2.02±0.11	0.53±0.01	0.53±0.02	0.57±0.02

ภาคผนวก ง.

ค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์

ตาราง ง.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ามอดูลัสของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทย และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ในสภาวะแห้ง)

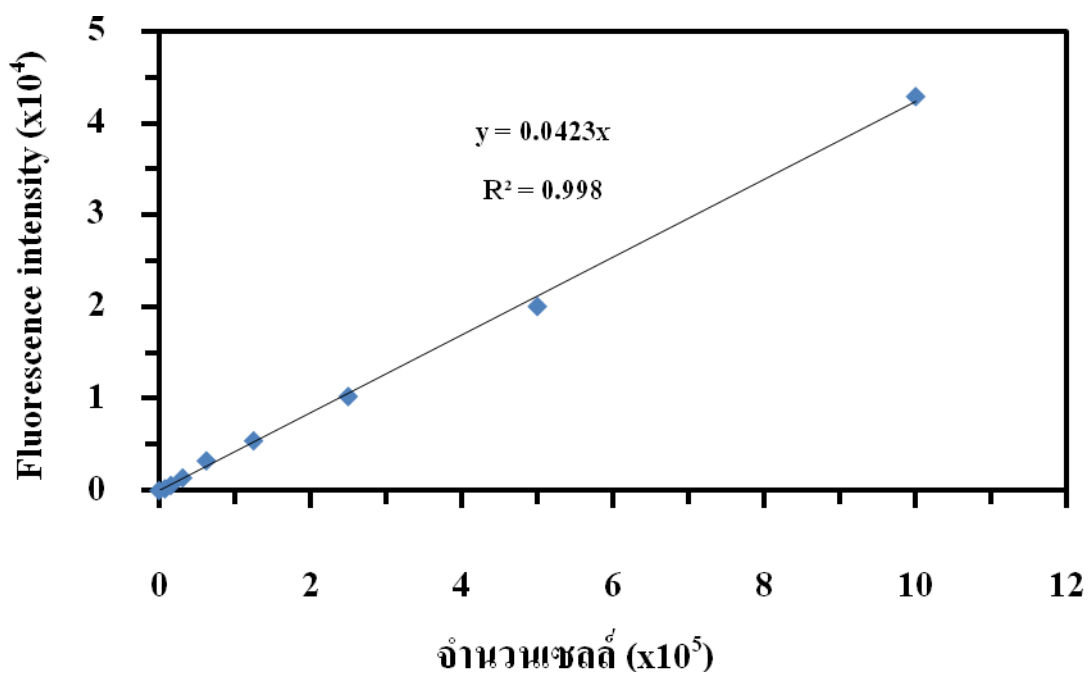
โครงเลี้ยงเซลล์	มอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (กิโลปาสคัล)		
	กลูตารัลดีไฮด์ 0.1% โดยปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.15% โดยปริมาตร	กลูตารัลดีไฮด์ 0.2% โดยปริมาตร
G0C0 (SF)	355±38		
G100C0	538±40	519±16	503±40
G90C10	575±21	619±66	519±32
G80C20	604±37	635±55	531±18
G70C30	627±31	653±61	549±20

ตาราง ง.2 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ามอดูลัสของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์ (ในสภาวะเปียก)

โครงเลี้ยงเซลล์	มอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (กิโลปาสคัล)		
	กดูตารัลดีไฮด์ 0.1% โดยปริมาตร	กดูตารัลดีไฮด์ 0.15% โดยปริมาตร	กดูตารัลดีไฮด์ 0.2% โดยปริมาตร
G0C0 (SF)	102±12		
G100C0	150±20	138±25	129±11
G90C10	159±25	162±22	139±22
G80C20	184±12	193±11	147±19
G70C30	195±11	201±17	157±13

ภาคผนวก จ.

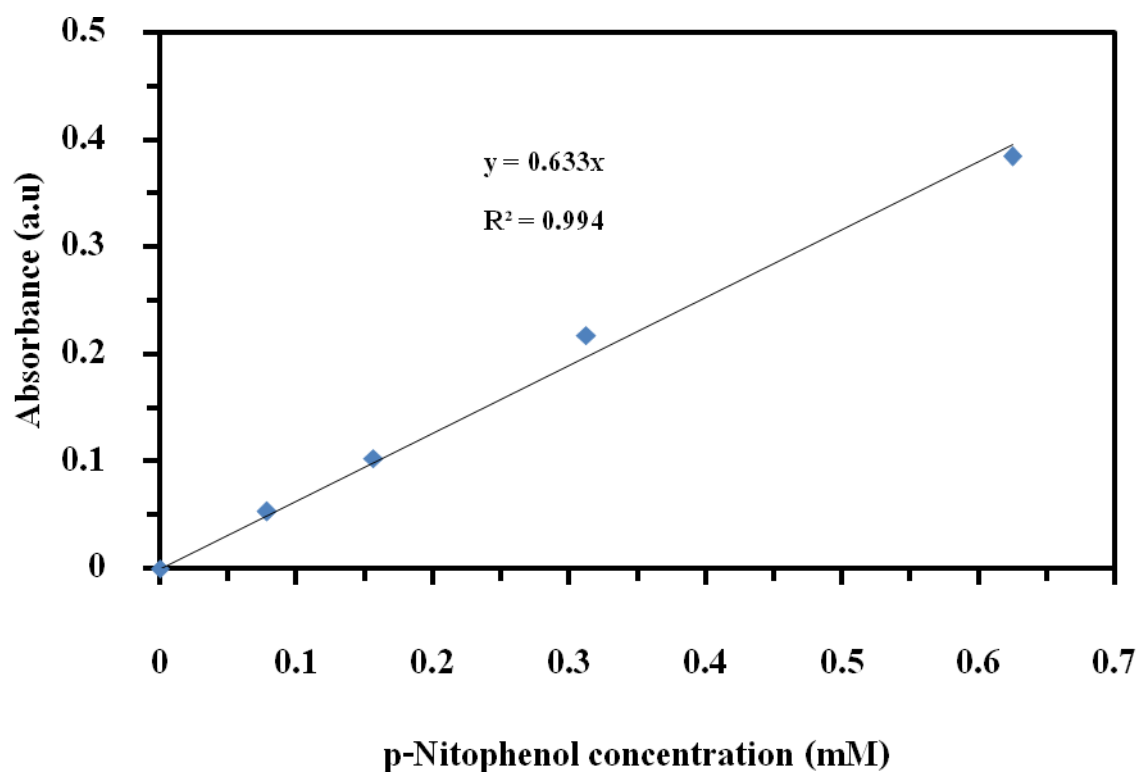
กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกโดยวิธี DNA



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกโดยวิธี DNA

ภาคผนวก จ.

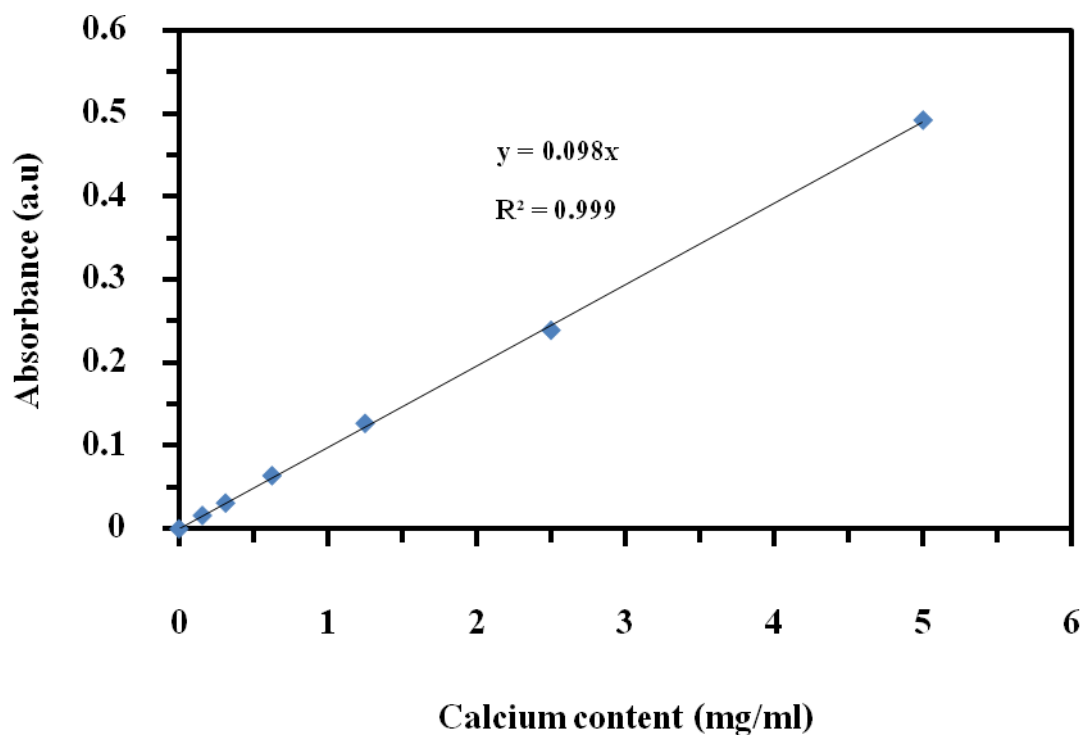
กราฟมาตรฐานของการวัด p-nitrophenol



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของการวัด p-nitrophenol

ภาคผนวก ช.

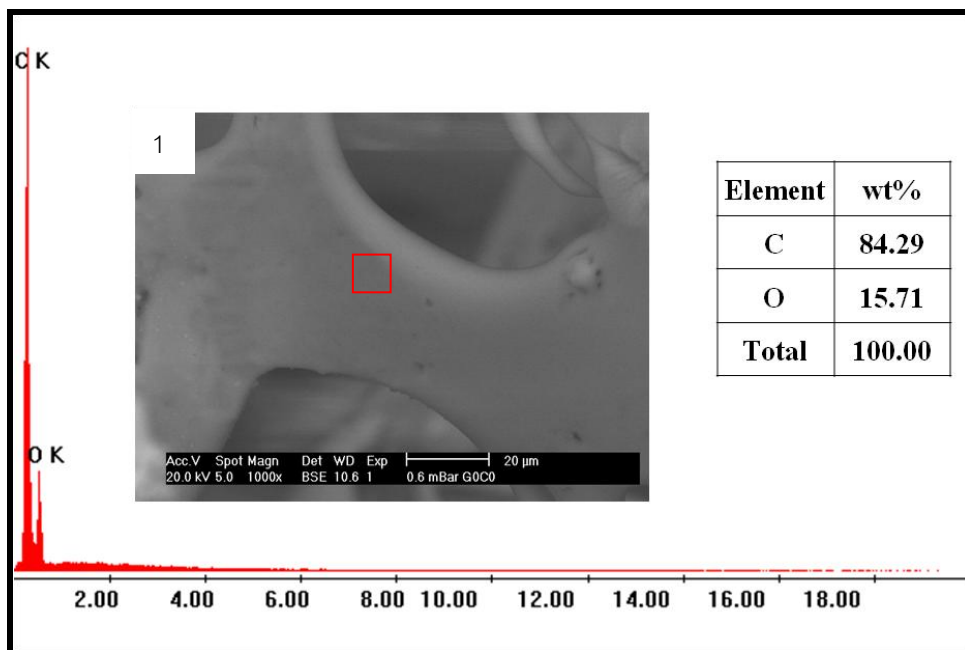
กราฟมาตรฐานของการวัด O-cresolphthale



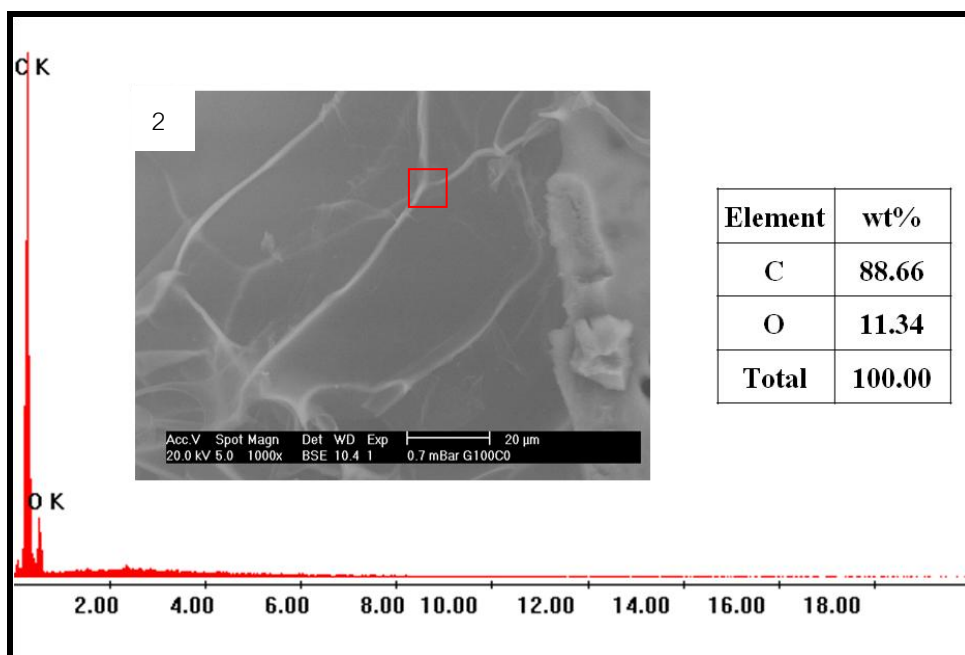
รูปที่ ช.1 กราฟมาตรฐานของการวัด O-cresolphthale

ภาคผนวก ซ.

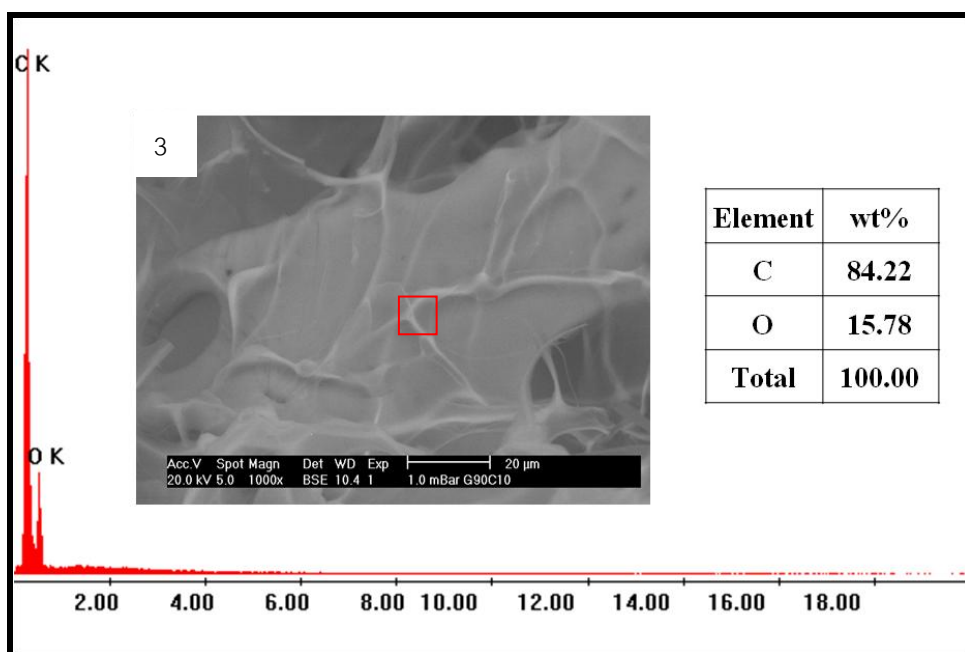
การวิเคราะห์ธาตุบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนเพาะเลี้ยงเซลล์
ด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)



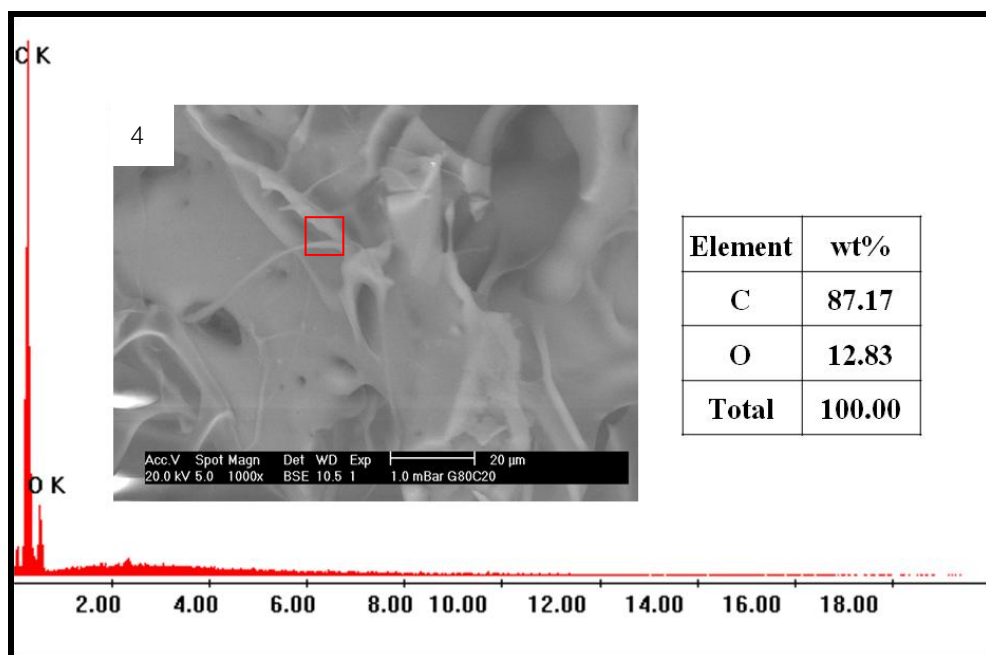
รูปที่ ซ.1 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (GOC0)



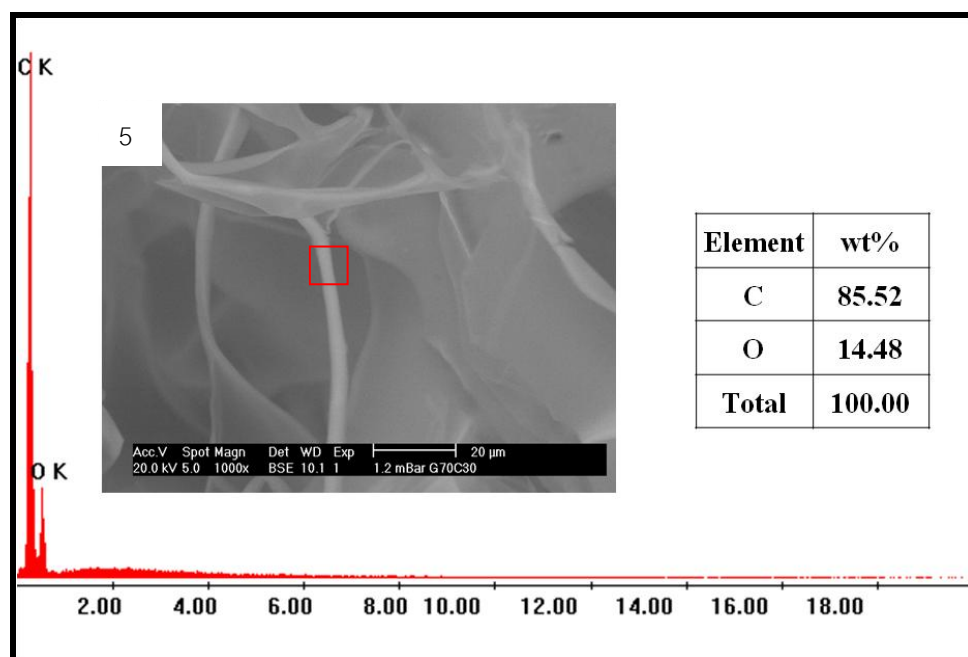
รูปที่ ๒.2 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟเบอร์อินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 100/0 (G100C0)



รูปที่ ๒.3 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟเบอร์อินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโพลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 90/10 (G90C10)



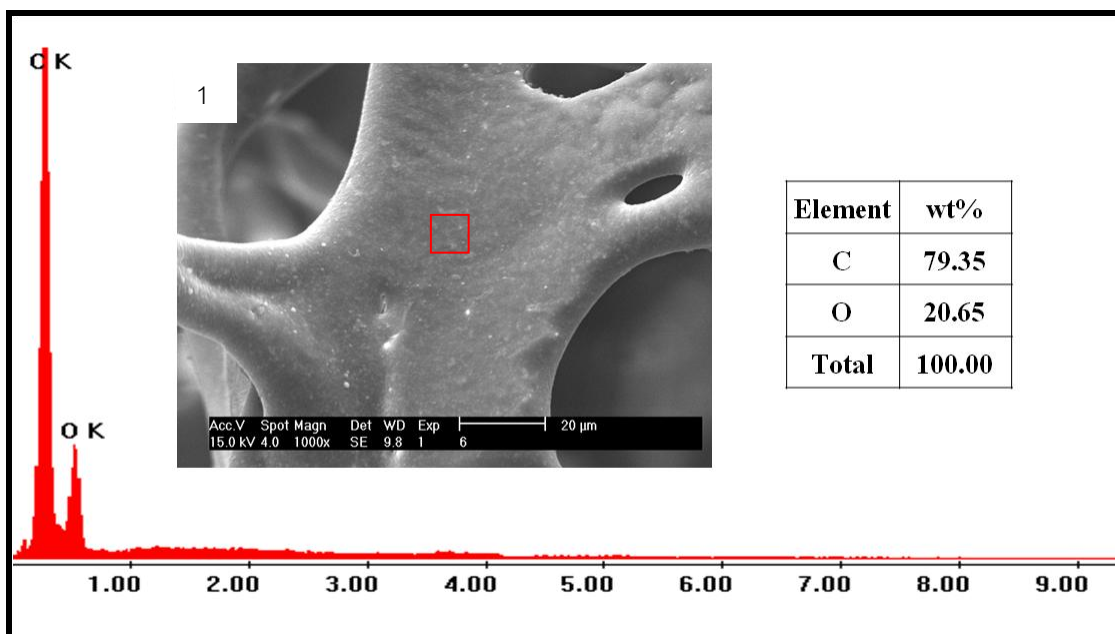
รูปที่ ๔.4 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟเบอร์อินไหม้ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโพลิโกลิแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 80/20 (G80C20)



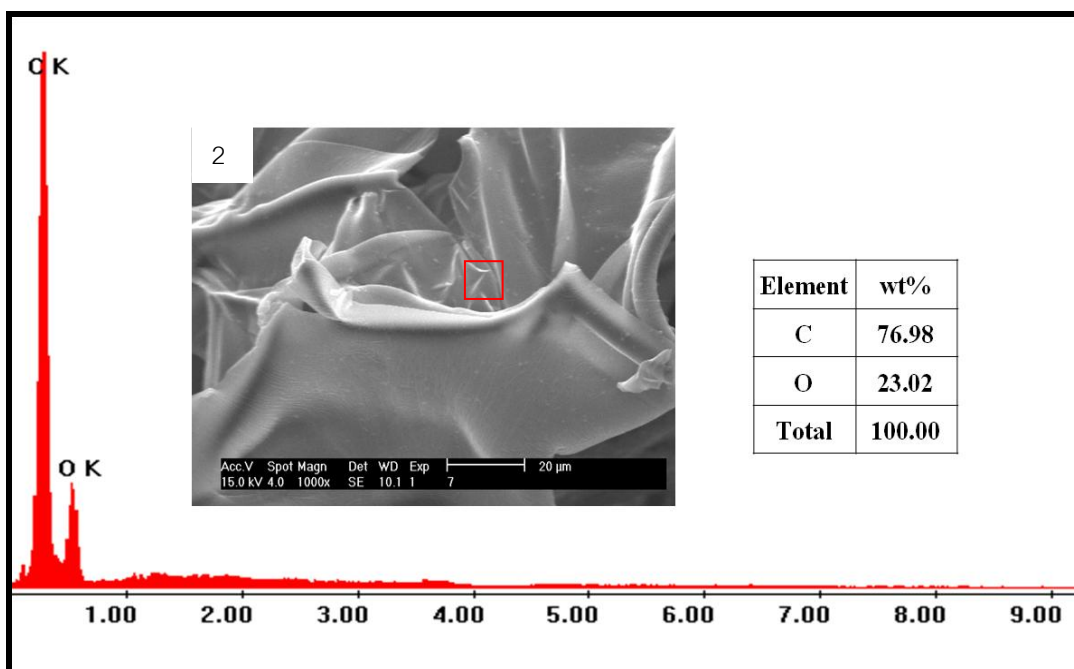
รูปที่ ๕.5 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟเบอร์อินไหม้ไทยที่คอนจุกต์ด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโพลิโกลิแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 (G70C30)

ภาคผนวก ฉ

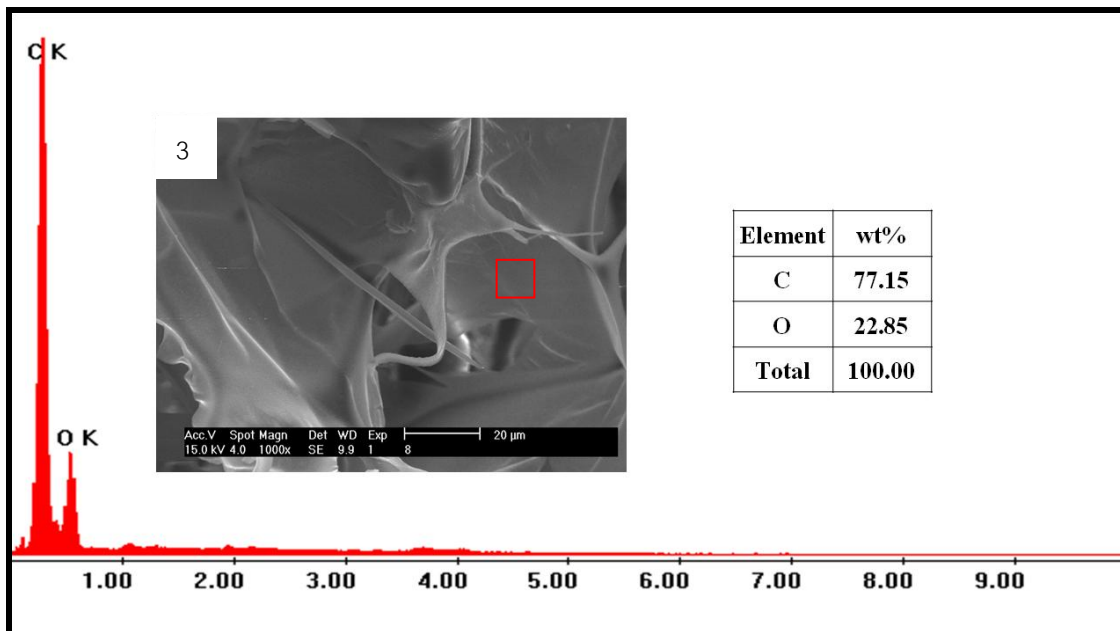
การวิเคราะห์ธาตุบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหารที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)



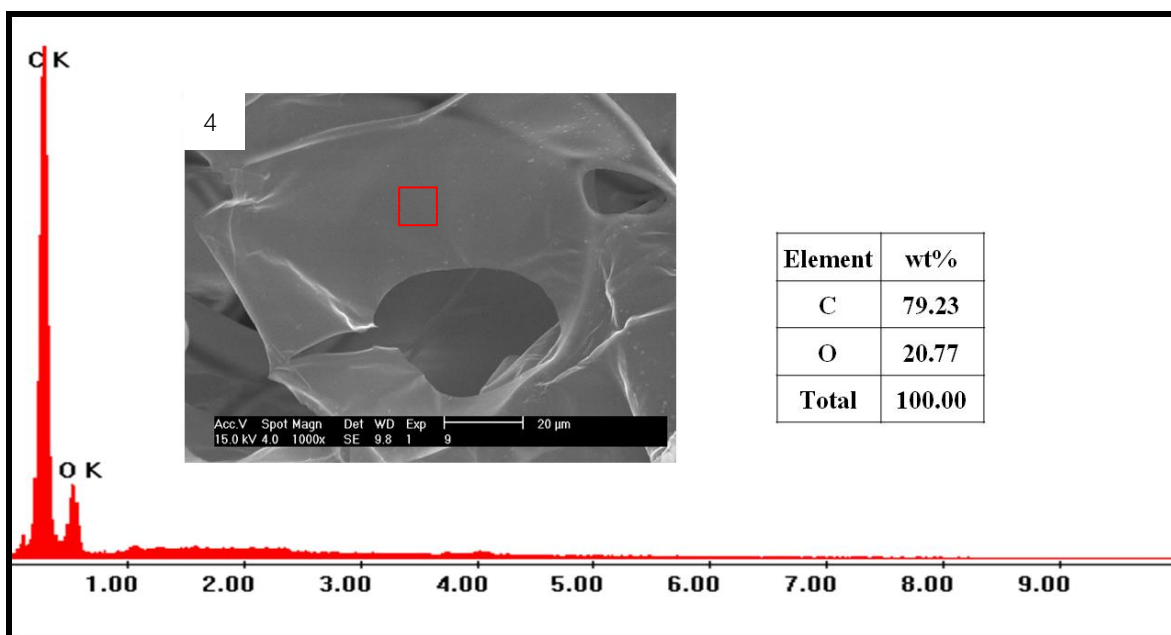
รูปที่ ฉ.1 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (GOC0)



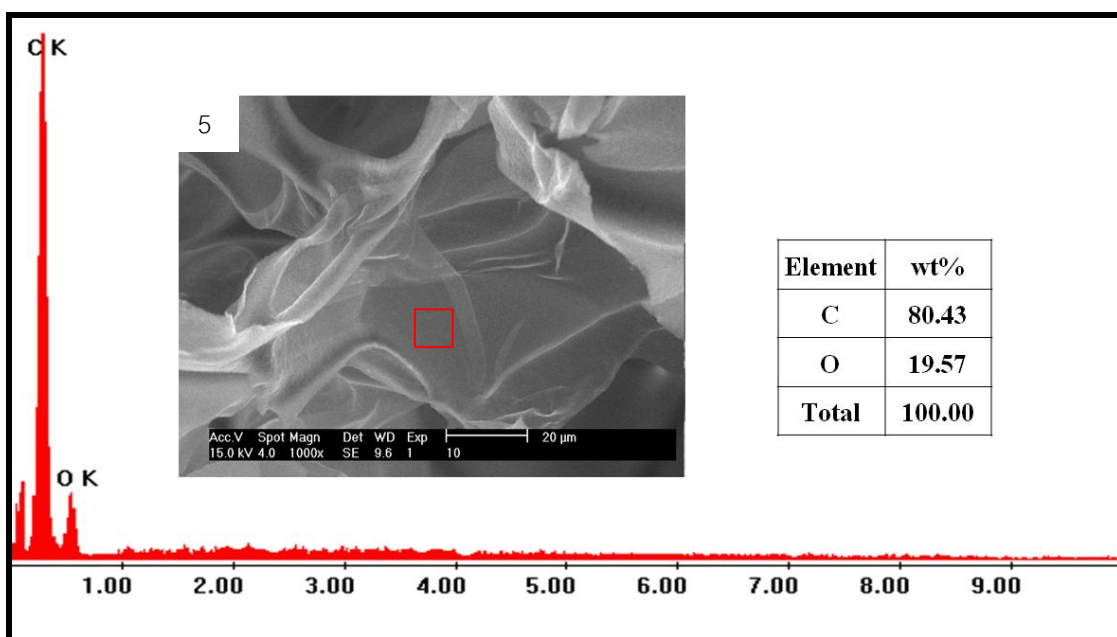
รูปที่ ฅ.2 โครงเลี้ยงเซลลูล์ไฟโบรินใหม่ไทยที่คอรุญเกดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักร 100/0 (G100C0)



รูปที่ ฅ.3 โครงเลี้ยงเซลลูล์ไฟโบรินใหม่ไทยที่คอรุญเกดด้วยสารละลายผสมเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักร 90/10 (G90C10)



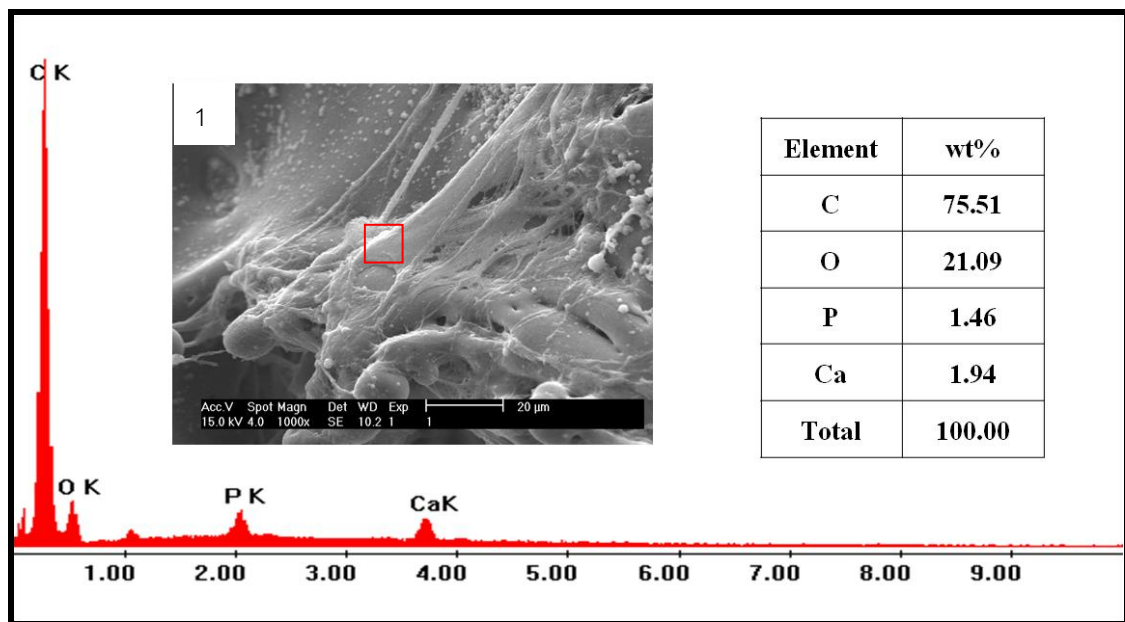
รูปที่ ๔.4 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟเบอร์อินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและ
โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 80/20 (G80C20)



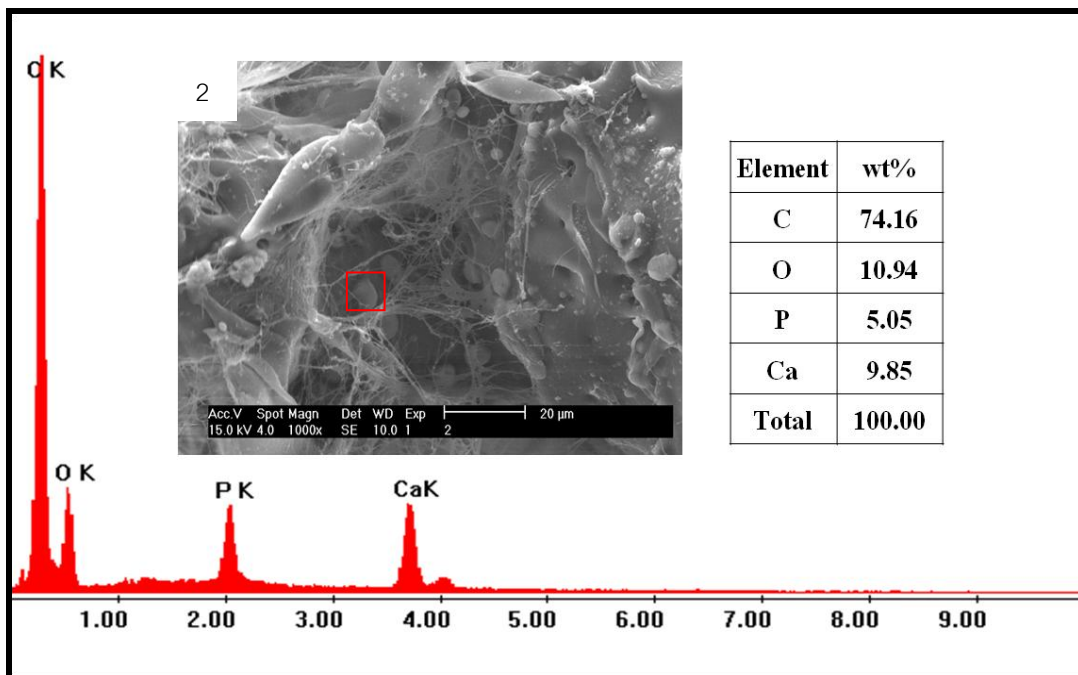
รูปที่ ๕.5 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟเบอร์อินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและ
โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 (G70C30)

ภาคผนวก ญ

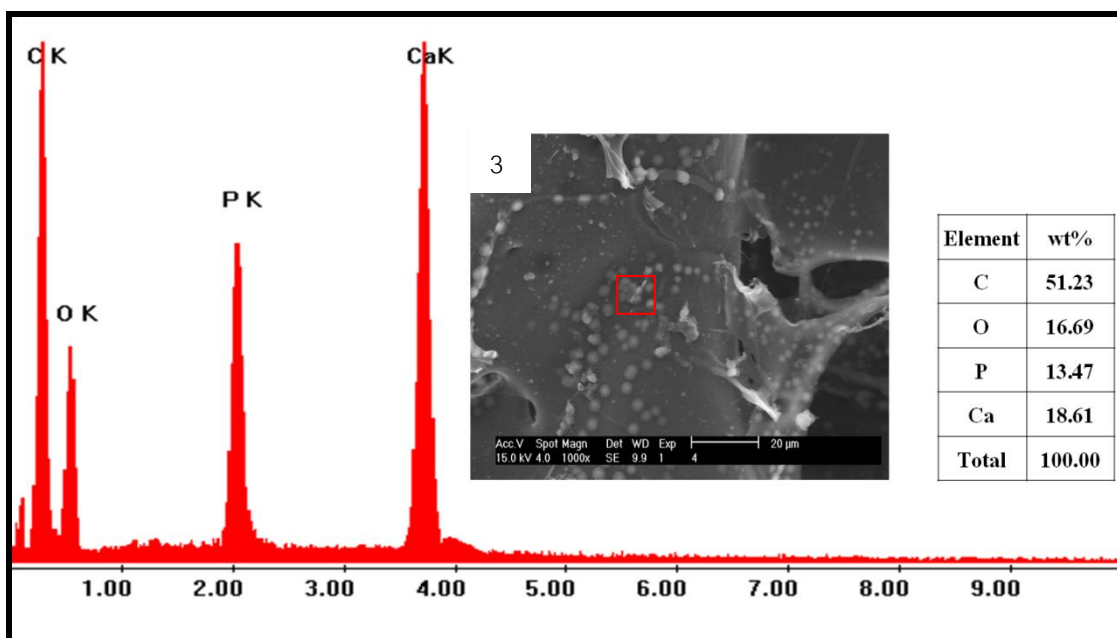
การวิเคราะห์ธาตุบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหารที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ด้วย Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)



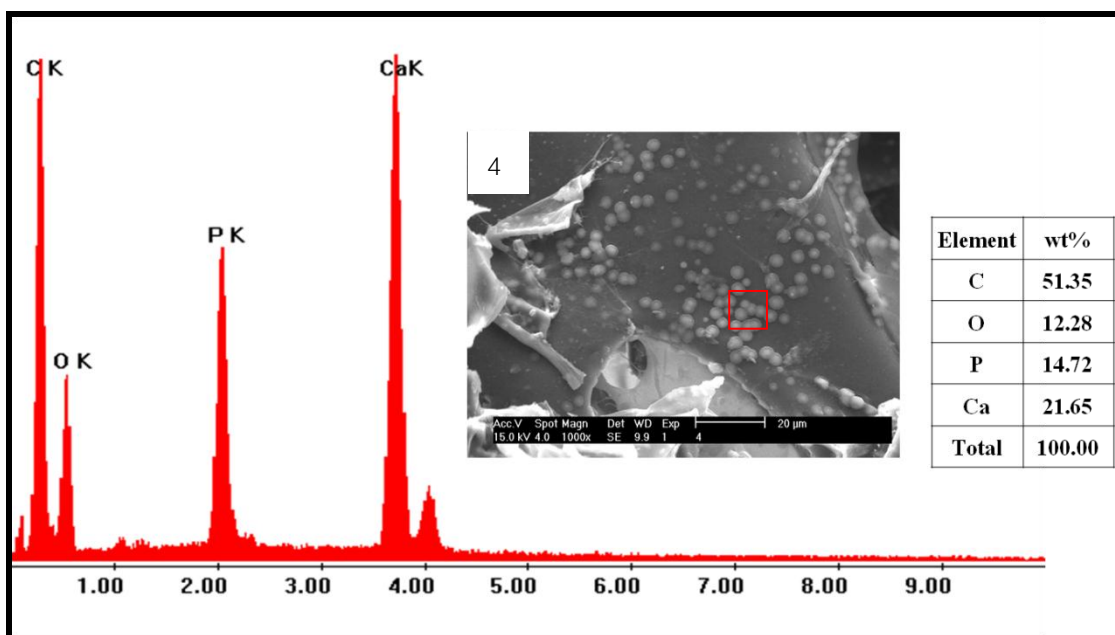
รูปที่ ญ.1 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย (GOC0)



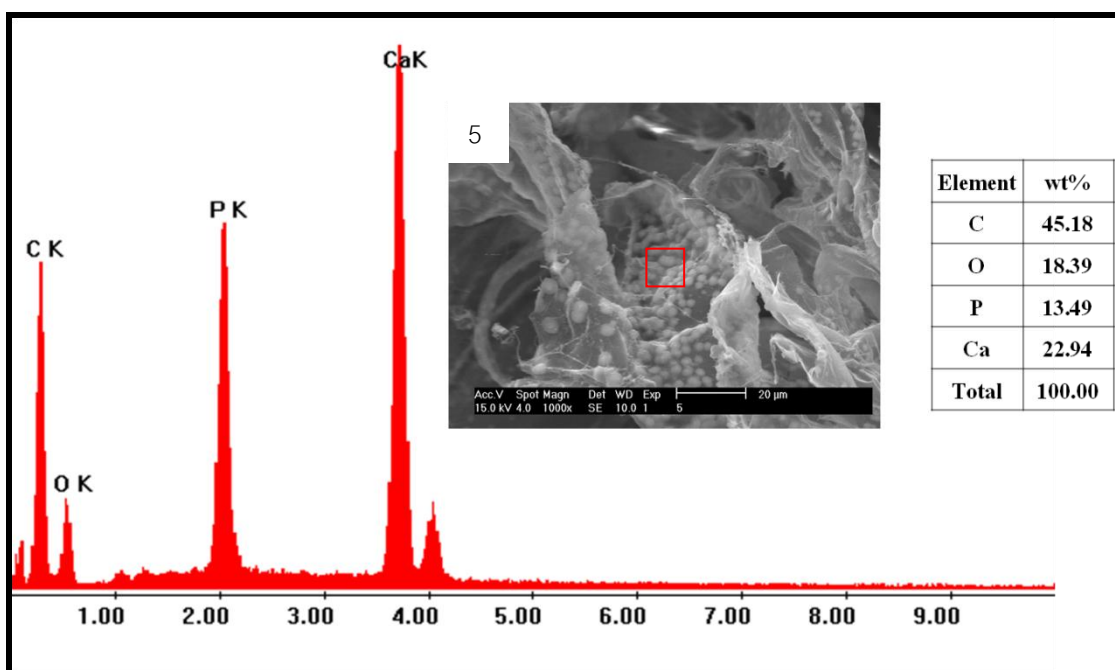
รูปที่ ๓.2 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 100/0 (G100C0)



รูปที่ ๓.3 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 90/10 (G90C10)



รูปที่ ๔.4 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรจีนใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 80/20 (G80C20)



รูปที่ ๕.5 โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรจีนใหม่ไทยที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมเจลาตินและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 70/30 (G70C30)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณอม วงศ์พุทธรักษา เกิดเมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดสงขลา เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนหาดใหญ่วิทยาลัยสมบูรณกุลกันยา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552

ผลงานในการประชุมวิชาการ

- T. Wongputtaraksa, R. Pichyangkura and S. Damrongsakkul, Surface Modification of Thai Silk Fibroin Scaffold using Gelatin and Chitooligosaccharide, Poster Presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2011 (PACCON2011), Miracle Grand Hotel ,Bangkok, Thailand, January 5-7, 2011
- T. Wongputtaraksa, R. Pichyangkura and S. Damrongsakkul, Osteogenic Differentiation of Thai Silk Fibroin Scaffolds modified with Gelatin and Chitooligosaccharide, Oral Presentation, Chiang Mai International Conference on Biomaterials & Applications (CMICBA2011), The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 9 – 10 August 2011