

อิทธิพลของขนาดและองค์ประกอบของอนุภาคไมโครเจลลาติน/ไฟโบรอินใหม่ไทยต่ออัตราการ
เจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสและเซลล์มะเร็ง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Influences of size and composition of gelatin/Thai silk fibroin microparticles on growth
rate of fibroblast and cancer cells



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 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของขนาดและองค์ประกอบของอนุภาคไมโครเจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทยต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสและเซลล์มะเร็ง
โดย	นางสาวอวิกา ชุ่มมงคล
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพานิชกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กษิติศ หนูทอง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ปิยะนุช ฐิติวุฒิกเกียรติ)

อภิวา ชุมนมมงคล : อิทธิพลของขนาดและองค์ประกอบของอนุภาคไมโครเจลลาติน/ไฟโบรอิน
 ไทยต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสและเซลล์มะเร็ง (Influences of
 size and composition of gelatin/Thai silk fibroin microparticles on growth
 rate of fibroblast and cancer cells) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.โสธรา กนก
 พานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, 149 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดและองค์ประกอบของอนุภาคไมโครเจ
 ลาติน/ไฟโบรอินไทย (สายพันธุ์เหลืองไฟโรจน์) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาส
 (Mouse cell line, L929) และเซลล์มะเร็ง (Cervical carcinoma cell line, CaSki) และพัฒนา
 อนุภาคไมครอนเป็นพาหะขนส่งเซลล์ไปยังสัตว์ทดลอง อนุภาคขนาดไมครอนที่มีองค์ประกอบของเจ
 ลาตินและไฟโบรอินไทยอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไฟโบรอินไทย ได้แก่
 100/0, 90/10 และ 80/20 โดยใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 2.5, 5 และ 7.5 โดยน้ำหนัก ถูก
 ขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน โดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน 1 ต่อ 30 และความเร็วรอบในการ
 ปั่นกวน 3000 รอบ/นาที และเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์พบว่า การผลิตอนุภาคทุก
 อัตราส่วนโปรตีน มีผลได้ในช่วง 60-80 เปอร์เซ็นต์ หลังการคัดแยกขนาดอนุภาคในช่วง 32-75
 ไมครอน มีร้อยละผลได้สูงสุด ซึ่งมีขนาดเหมาะสมในการฉีดผ่านหัวเข็มการแพทย์ได้ อนุภาคที่มี
 องค์ประกอบของไฟโบรอินหรือปริมาณของแข็งมากขึ้น มีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพต่ำลง (ใน
 สารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV) และดูดซับน้ำลดลง (ในน้ำปราศจากไอออน อุณหภูมิ 37 องศา
 เซลเซียส พีเอช 5.8) ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ CaSki ที่เวลาเพาะเลี้ยง 6 ชม. บนอนุภาคขนาด
 32-75 ไมโครเมตร มีค่ามากที่สุด และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) บนอนุภาคขนาด
 32-100 ไมโครเมตร มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเซลล์ L929 และ CaSki
 สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคไมครอนเจลาติน (100/0) มีค่า μ เท่ากับ 1.65×10^{-2} และ
 2.05×10^{-2} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ผลการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในหนูชนิดไมซ์ (BALB/c-
 nude mice) พบว่าอนุภาคไมโครเจลลาตินที่ใช้เป็นพาหะในการขนส่งเซลล์มะเร็ง สามารถกระตุ้นให้
 เกิดการสร้างก้อนมะเร็งที่มีปริมาตรมากกว่า 7 เท่าและมีปริมาณหลอดเลือดเกิดใหม่สูงกว่า 2 เท่า
 เมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงในหนูทดลองโดยตรง จะเห็นได้ว่า อนุภาคไมครอน
 สามารถใช้เป็นพาหะขนส่งเซลล์มะเร็งสำหรับงานวิจัยด้านเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา	วิศวกรรมเคมี	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5770359921 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: MICROSPHERES / GELATIN / SILK FIBROIN / CELL CARRIERS / CASKI CELLS

AVIGA SOONMONGKOL: Influences of size and composition of gelatin/Thai silk fibroin microparticles on growth rate of fibroblast and cancer cells. ADVISOR: ASST. PROF. SORADA KANOKPANONT, CO-ADVISOR: PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, 149 pp.

This research aimed to investigate the influences of size and compositions of gelatin/Thai silk fibroin (Leuang Pi Roj) (G/SF) microspheres on growth kinetics of fibroblast (Mouse cell line, L929) and cancer cells (Cervical carcinoma cell line, CaSki) for cell carrier application. The G/SF microspheres were fabricated by water in oil (w/o) emulsion technique, weight blending ratios of G/SF solution at 100/0, 90/10 and 80/20 at the total solid weight of 2.5, 5 and 7.5%. The optimized w/o ratio of 1/30 and homogenizing speed of 3000 rpm were chosen based on their maximum yield of desired sizes (32-75 μm), which was suitable for injection through medical needle. To stabilize microspheres, glutaraldehyde (GA) was used as a crosslinking agent. The yields of the obtained microspheres were at 60-80 %wt. The microspheres having high silk fibroin or solid contents had high stability (in protease XIV enzyme solution) and low swelling (in distilled water at 37°C pH 5.8). The G/SF microspheres in the size range of 32-75 μm was found the greatest number of initial attachment compared to the size ranges of 75-100 and 100-200 μm . However, the specific growth rate (μ) of CaSki cells was not significantly different if cultured on the microspheres in the size range of 32-100 μm . Agglomeration of microspheres during cells cultures were observed, compared to the well-distributed larger microspheres where cells attached on the their surface only. The highest μ of L929 and CaSki cells were observed in the cells cultured on G microspheres (100/0), at 1.65×10^{-2} and $2.05 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. Gelatin microspheres were tested for tumor induction in nude mice (BALB/c). The microspheres accelerated tumor volume growth by 7 times and increased neocapillary densities by 2 times compared the conventional cells injection. Thus, microspheres approved to be an effective cell carrier.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature

Academic Year: 2017

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความช่วยเหลือจากหลาย ๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไตรดา กนกพานานท์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุ มราชาอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้ คำแนะนำ อบรมให้ความรู้เกี่ยวกับการทำงานวิจัย การวางแผน การออกแบบงานวิจัย ตลอดจนการ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณคณะกรรมการทุกท่าน ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพานิชกุล, รองศาสตราจารย์ ดร.กชิตศ หนูทอง และ ดร.ปิยะนุช ฐิติวุฒิกเกียรติ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าร่วมเป็น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ที่เซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki)

ขอขอบคุณศูนย์หม่อมใหม่เฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ

จังหวัดศรีสะเกษ ที่อนุเคราะห์รังไหมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณปิยะรัตน์ สังข์พันธุ์ คุณรุ่งนภา แยมเดช คุณกันยาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์ และสมาชิกห้องปฏิบัติการชีววัสดุทางการแพทย์ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำ รวมทั้งความช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอขอบคุณ คุณศุภกานดา สุขแพทย์ นักศึกษาร่วมวิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำและให้การช่วยเหลือเกี่ยวกับการวิจัยในสัตว์ทดลองจน งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ สถานที่ทำวิจัย ได้แก่ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวภาพ และ ห้องปฏิบัติการชีววัสดุ อาคารอนุศาสน์ยंत्रกรรม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ทดสอบ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิจัย และความอนุเคราะห์เอื้อเพื่อในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็น กำลังใจ ให้การสนับสนุนการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาจนดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1	16
บทนำ.....	16
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	16
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	17
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	17
1.3.1 ขึ้นรูปอนุภาคไมโครของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยวิธีอิมัลชันแบบ น้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) และเชื่อมขวางอนุภาคทางเคมีด้วย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์.....	17
1.3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของอนุภาคทรงกลม.....	17
1.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลม.....	18
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
2.1 เจลาติน.....	19
2.1.1 แหล่งที่มา.....	19
2.1.2 โครงสร้างเจลาติน.....	20
2.1.3 การสกัดเจลาตินจากคอลลาเจน.....	22
2.1.4 สมบัติทั่วไปของเจลาติน	24
2.1.5 สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน.....	25

2.1.6 การประยุกต์ใช้งานเจลลาติน	27
2.2 ไหม (silk)	28
2.2.1 โครงสร้างและสมบัติของไหม	28
2.2.2 ไฟโบรอิน.....	29
2.2.3 สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไฟโบรอิน.....	30
2.2.4 การประยุกต์ใช้งานของไหมไฟโบรอิน.....	33
2.3 อนุภาคไมโคร (microspheres).....	36
2.4 การเชื่อมขวาง (crosslinking)	38
2.4.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ.....	39
2.4.2 การเชื่อมขวางทางเคมี.....	39
2.5 อนุภาคไมโครสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	41
2.6 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง	45
2.7 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	47
2.8 ผลกระทบทางการค้า.....	50
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	52
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	52
3.2 อุปกรณ์.....	53
3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	55
3.4.1 การเตรียมสารละลายเจลลาตินชนิดเอและสารละลายไฟโบรอินไหมไทย	56
3.4.1.1 สารละลายเจลลาตินชนิดเอ.....	56
3.4.1.2 สารละลายไฟโบรอินไหมไทย	56
3.4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารละลาย	56
3.4.3 การขึ้นรูปอนุภาคไมโครของเจลลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย	57

3.4.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของอนุภาคไมครอน	58
3.4.5 การศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคไมโครที่ผลิตได้.....	60
3.4.6 ศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครในระดับ สัตว์ทดลอง	62
3.4.6.1 ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงใน สัตว์ทดลอง.....	63
3.4.6.2 วิเคราะห์ปริมาตรก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นและความหนาแน่นของหลอดเลือด เกิดใหม่.....	63
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	64
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	65
4.1 สมบัติของสารละลายและอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย	65
4.1.1 สมบัติของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย	65
4.1.2 สมบัติของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย.....	69
4.1.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่ออนุภาคขนาดไมครอนที่ผลิตได้ด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำใน น้ำมัน.....	70
4.1.2.2 ร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระหลังทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์	77
4.1.2.3 โครงสร้างสัณฐาน (Morphology)	82
4.1.2.4 อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาค (Swelling ratio)	84
4.1.2.5 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคไมครอนในระดับ ห้องปฏิบัติการ (In vitro biodegradability)	85
4.2 ผลการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคขนาดไมครอนเจลาตินและไฟโบรอิน ไหมไทยต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนูและเซลล์มะเร็งปากมดลูก.....	89
4.2.1 ผลการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาค	89
4.2.2 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคไมครอน.....	95

4.2.2.1 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคที่มีอัตราส่วนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยแตกต่างกัน	95
4.2.2.2 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคที่มีปริมาณเนื้อสารรวมแตกต่างกัน	98
4.2.2.3 ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่มีอัตราส่วนเจลาตินและไฟโบรอินแตกต่างกันและเนื้อสารรวมแตกต่างกัน	104
4.2.2.4 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ CaSki บนอนุภาคที่มีขนาดแตกต่างกัน	107
4.3 ผลการศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในสัตว์ทดลอง	111
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	124
5.1 สรุปผลการวิจัย	124
5.2 ประโยชน์ที่ได้รับ	126
5.3 ข้อเสนอแนะ	126
รายการอ้างอิง	127
ภาคผนวก ก	137
ภาคผนวก ข	139
ภาคผนวก ค	142
ภาคผนวก ง	145
ภาคผนวก จ	147
ภาคผนวก ฉ	148
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	149

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	กรดอะมิโน 18 ชนิด ในเจลาตินชนิดเอจากหนังหมู และชนิดบีจากกระดูกวัว (Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) 2012).....	21
ตารางที่ 2.2	องค์ประกอบของไหม <i>Bombyx mori</i> (Mondal M.K. 2007).....	29
ตารางที่ 2.3	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้งานไหมไฟโบรอินทางวิศวกรรมการแพทย์.....	34
ตารางที่ 2.4	วิธีการขึ้นรูปอนุภาคไมโคร (พิมพร 2008 และ Kataria S. และคณะ 2011).....	37
ตารางที่ 2.5	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในสัตว์ทดลอง โดยแสดงจำนวนเซลล์ในการปลูกถ่าย ขนาดก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นในแต่ละเวลา และสูตรที่ใช้คำนวณปริมาตรก้อนมะเร็ง.....	46
ตารางที่ 4.1	ร้อยละผลได้ ของอนุภาคขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน 80/20 โดยน้ำหนัก (7.5% โดยน้ำหนัก) และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.05 %โดยปริมาตร	72
ตารางที่ 4.2	ร้อยละผลได้ของอนุภาคขนาดไมครอน อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอินโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ถูกขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน โดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน 1 ต่อ 30 ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 3000 รอบ/นาที และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.05 %โดยปริมาตร	75
ตารางที่ 4.3	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย และอัตราการดูดซับน้ำของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์.....	85
ตารางที่ 4.4	ค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) ของการย่อยสลายอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยในเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 0.5 หน่วย/มิลลิลิตร ภายหลังการทดสอบเป็นเวลา 10 วัน.....	87
ตารางที่ 4.5	จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังเป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO ₂ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.4×10^5 , 1.6×10^5 และ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม .	95
ตารางที่ 4.6	จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง L929 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki บนอนุภาคไมครอนเจลาตินและไฟโบรอินที่อัตราส่วนต่าง ๆ เป็น	

เวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์..... 100

ตารางที่ 4.7 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนู L929 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki บนอนุภาคไมครอนเจลลาตินและไฟโบรอินที่มีปริมาณเนื้อสารรวมแตกต่างกัน เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์..... 102

ตารางที่ 4.8 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki บนอนุภาคไมครอนเจลลาตินและไฟโบรอินที่มีขนาดแตกต่างกัน เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ . 110

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักหนูทดลองก่อนฉีด (วันที่0) และหลังปลูกมะเร็งปากมดลูก ณ วันต่าง ๆ..... 114

ตารางที่ 4.10 ร้อยละความหนาแน่นเส้นเลือดฝอยเฉลี่ยบริเวณรอบก้อนเนื้อเยื่อ (n=3) ที่เวลา 30-33 วัน หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง เมื่อวิเคราะห์จากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ของกลุ่มการทดลองที่ 1-4..... 122

ตารางที่ จ.1 ปริมาตรก้อนเนื้อเยื่อ/มะเร็งที่เกิดขึ้นภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งไปยังหนูผู้ดมซึ่งที่ระยะเวลาต่าง ๆ..... 147

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 การสกัดเจลาตินชนิดเอ (basic gelatin) และชนิดบี (acidic gelatin).....	23
รูปที่ 2.2 ตัวอย่างงานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติของบริษัท AMS Biotechnology (Europe) Limited.....	50
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติของบริษัท Advanced BioMatrix, Inc.....	51
รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	55
รูปที่ 4.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ที่พีเอช 5.8.....	67
รูปที่ 4.2 ค่าความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย.....	69
รูปที่ 4.3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มี ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ (ก.) 3000 รอบ/นาที (ข.) 4000 รอบ/นาที	71
รูปที่ 4.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่เพิ่ม อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอินโดยน้ำหนักที่ต่าง ๆ ขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน	76
รูปที่ 4.5 ปริมาณหมู่เอมีโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ขนาด 32-75 μm ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์	80
รูปที่ 4.6 ร้อยละการลดลงของหมู่เอมีโนอิสระของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ขนาด 32-75 μm ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์	81
รูปที่ 4.7 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร โดยวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 250 และ 1400 เท่า.....	83
รูปที่ 4.8 ร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ แสดงที่เวลา 24 ชั่วโมง (.....)	88
รูปที่ 4.9 (ก) จำนวนเซลล์ผิวหนังหนูที่ยึดเกาะบนอนุภาคที่เวลา 6 ชม. (ข) ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ผิวหนังบนอนุภาคที่เวลา 6 ชม.	92

รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ผิวหนังที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาติน (100/0) ที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 75-100 μm จำนวน 3 มิลลิกรัม	94
รูปที่ 4.11 (ก.) จำนวนเซลล์ผิวหนัง L929 (ข) จำนวนเซลล์มะเร็ง CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาค G100 , อนุภาค G90SF10 และอนุภาค G80SF20 (7.5%โดยน้ำหนัก) จำนวน 3 มิลลิกรัม	101
รูปที่ 4.12 (ก.) จำนวนเซลล์ผิวหนัง L929 (ข) จำนวนเซลล์มะเร็ง CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคที่มีเนื้อสารรวม 2.5 5 และ 7.5%โดยน้ำหนัก จำนวน 3 มิลลิกรัม เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม.....	103
รูปที่ 4.13 แสดงการยึดเกาะของเซลล์ผิวหนังบนอนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 1400 และ 3000 เท่า.....	105
รูปที่ 4.14 แสดงการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนอนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 1400 และ 3000 เท่า.....	106
รูปที่ 4.15 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาค (ก.) อนุภาคเจลาติน G100 7.5 %น้ำหนัก (ข.) อนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย G80/SF20 5 %น้ำหนัก ขนาด 32-75, 75-100 และ 75-100 μm ตามลำดับ เป็นเวลา 14 วัน	109
รูปที่ 4.16 แสดงการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนอนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินที่มีขนาดต่างกัน หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 1400 เท่า	111
รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เพาะเลี้ยงบน อนุภาคเจลาติน (G100) ที่มีความเข้มข้นของแข็งรวม 7.5 %โดยน้ำหนัก ขนาด 32-75 (ก) อนุภาค G100 3 มิลลิกรัม โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม (ข) อนุภาค G100 3 มิลลิกรัม โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม	113
รูปที่ 4.18 การฉีดปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดบนหลังบริเวณ dorsal skin-fold chamber ซึ่งในขณะที่ฉีดหุทดลองจะได้รับยาสลบ Isoflurane 5 เปอร์เซ็นต์.....	115
รูปที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงปริมาตรเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง Caski ที่เวลาต่าง ๆ	116

รูปที่ 4.20 การวัดขนาดก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นหลังจากปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในหนูทดลองเป็นเวลา 30 วัน โดยจะวัดด้านที่ยาวที่สุดและสั้นที่สุดของก้อนเนื้อเยื่อ เพื่อคำนวณเป็นปริมาตร (Yoysungnoen-Chintana P. และคณะ (2010) 119

รูปที่ 4.21 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่ง ตำแหน่งบริเวณก้อนมะเร็งและอนุภาคไมครอน ของกลุ่มการทดลองที่ 3 หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลง หนูทดลองเป็นเวลา 33 วัน..... 122

รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่ง ๆ รอบ ๆ ก้อนมะเร็ง หลังการปลูกถ่ายเป็นเวลา 30 และ 33 วัน..... 123



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

อนุภาคไมโคร (microspheres) เป็นทรงกลมขนาดเล็กที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-1000 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถผลิตได้จากพอลิเมอร์ทางธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน กรดไฮยาลูรอนิก และอัลจินต เป็นต้น (Kataria S. และคณะ 2011) และพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิแลคติกแอซิด พอลิเอทิลีนไกลคอล และ พอลิคาร์โพรแลคโตน เป็นต้น โดยพอลิเมอร์ทางธรรมชาตินั้นได้รับความนิยมนำมาใช้งานในการขึ้นรูปเป็นรูปแบบต่าง ๆ เนื่องจาก เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น พอลิเมอร์ธรรมชาติจึงได้รับความนิยมในการประยุกต์ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อาทิเช่น อนุภาคของทรงกลมของโคโตซานในการควบคุมการปลดปล่อยสารเพื่อการเจริญเติบโต (growth factor) ชนิด TGF- β 1 เพื่อกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก (Sun E.K. และคณะ 2003) โครงเลี้ยงเซลล์ของโคโตซานและพอลิแลคติกแอซิด โคลไกลโคลิคแอซิดในการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก (Tao J. และคณะ 2006) และอนุภาคทรงกลมของไหมและเจลาตินในการนำส่งยาเคอร์คูมินและไฟเพอริน (Ratanavaraporn J. และคณะ 2014) เป็นต้น

ลักษณะของอนุภาคทรงกลมมีทั้งแบบอนุภาคตัน (solid microspheres) และแบบอนุภาคกลวง (hollow microspheres) ซึ่งการใช้งานจะขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ ในการพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีลักษณะเป็นทรงกลมนั้นจะมีข้อดีที่ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบอื่น คือ มีขนาดเล็ก จึงมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง สามารถควบคุมขนาดได้ง่าย มีกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน องค์ประกอบที่สำคัญของระบบเพาะเลี้ยงเซลล์มีด้วยกัน 3 ส่วน คือ เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ และตัวควบคุม ตัวอย่างเช่น สารเพื่อการเจริญเติบโต ฮอร์โมน เป็นต้น โดยองค์ประกอบที่มีความสำคัญที่สุด คือ โครงเลี้ยงเซลล์ เปรียบเสมือนที่อยู่ของเซลล์ เซลล์สามารถยึดเกาะ (cell adhesion) และเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนได้ดี (proliferation) และมีส่วนของ extracellular matrix ที่เหมาะสมเพื่อช่วยในการค้ำจุนโครงสร้างของเซลล์หรือหน้าที่สำคัญอื่น ๆ อาจมีรูปร่างหรือคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไปตามความเหมาะสม นอกจากนี้ โครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีสมบัติให้สารต่าง ๆ เช่น สารอาหาร และของเสีย ผ่านเข้าออกได้

Sinthop S. และคณะ (2014) ได้มีการพัฒนาอนุภาคไมโครของเจลาตินและไหมไฟโบรอินที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพื่อเป็นต้นแบบของโครงเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูและเซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม โดยอนุภาคที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 300-700 ไมครอน จากรายงานพบว่า อนุภาคเจลาตินที่มีขนาดเล็กที่สุด (300 ไมครอน) จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาแบ่งตัวทวีคูณสูงที่สุด ซึ่งอนุภาคที่มีขนาดเล็กจะส่งเสริมการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ได้มาก งานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาอนุภาคไมโครของเจลาตินและไหมไฟโบรอินที่มีขนาดอยู่ในช่วงต่ำกว่า 100 ไมครอน เนื่องจากขนาดเหมาะสมในการฉีดผ่านหัวเข็มการแพทย์ได้ ด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) เพื่อคาดหวังให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดใหญ่ โดยผู้วิจัยจะทดสอบอนุภาคทรงกลมเพื่อใช้เป็นพาหะของเซลล์ (cell carrier) โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki เป็นต้นแบบเซลล์ เพื่อกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเป็นมะเร็ง เพื่อเป็นต้นแบบในการทดลองหรือศึกษาด้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดและองค์ประกอบของอนุภาคไมโครเจลาติน/ไฟโบรอินไหมไทยต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสและเซลล์มะเร็ง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ขึ้นรูปอนุภาคไมโครของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) และเชื่อมขวางอนุภาคทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ โดยตัวแปรที่จะศึกษาได้แก่

- ร้อยละความเข้มข้นของของแข็งรวม คือ 2.5, 5 และ 7.5 โดยน้ำหนัก
- อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไหมไฟโบรอิน คือ 100:0, 90:10 และ 80:20
- อัตราส่วนผสมน้ำต่อน้ำมันคือ 1:15 และ 1:30
- ความเร็วรอบในการปั่นกวนคือ 3000 และ 4000 รอบต่อนาที

1.3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของอนุภาคทรงกลม

- โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

- อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาค
- ร้อยละการเชื่อมขวางทางเคมีด้วยวิธีนินไฮดริน (Ninhydrin)

1.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลม

- การย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro biodegradation)
- การยึดเกาะและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู (L929) และเซลล์มะเร็งบนอนุภาค (นอกร่างกาย)
- ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครลงใน สัตว์ทดลอง โดยศึกษาปริมาณก้อนมะเร็ง และปริมาณหลอดเลือดเกิดใหม่



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เจลาติน

2.1.1 แหล่งที่มา

เจลาตินสามารถสกัดได้จากคอลลาเจน ซึ่งคอลลาเจนจะประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดโพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ในปริมาณสูง (Piez K. 1976) โครงสร้างของคอลลาเจนมีสายเปปไทด์ (peptides) 3 สาย เกี่ยวพันกันในลักษณะเกลียว (helix) โดยอาศัยแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (intermolecular) เชื่อมต่อกัน (Ramachandran G. 1976, Light N. และคณะ 1982) เจลาตินที่สกัดจากคอลลาเจนจะมีแหล่งที่มาแตกต่างกัน ได้แก่

ก.) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

เจลาตินที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถจำแนกได้ 2 ชนิด คือ ชนิดเอ (type A) และชนิดบี (type B) โดยเจลาตินชนิดเอสามารถสกัดได้จากหนังสุกรโดยใช้กรด และเจลาตินชนิดบีสามารถสกัดได้จากหนังวัวโดยใช้เบส เจลาตินทั้งสองชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน คือ มีค่าตั้งแต่ 10 ถึง 400 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเจลาตินเมื่ออยู่ในสถานะเจล รวมถึงค่าไอโซอิเล็กทริกและจุดหลอมเหลวของสารละลายเจลาติน เจลาตินจากสุกรและวัวนั้นเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการงานด้านต่าง ๆ มากมาย

ข.) ปลา

เจลาตินจากปลาสามารถสกัดได้จากบริเวณหนังปลาและกระดูกปลา ซึ่งมีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบของอยู่ร้อยละ 30 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีการสกัดเจลาตินจากปลาคอด (cod) ปลาแฮก (hake) ปลามังกร (megrim) และปลาทิลapia (tilapia) เป็นต้น คุณภาพและปริมาณของเจลาตินที่สกัดได้ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ (species) ของปลาแต่ละชนิด และกระบวนการสกัดที่มีค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเตรียมวัสดุ (pre-treatment) ที่แตกต่างกัน

ค.) แมลง

กระบวนการในการสกัดเจลาตินจากแมลงนั้นมีด้วยกัน 3 กระบวนการ คือ การใช้กรดอ่อนและน้ำกลั่นในการสกัด การใช้น้ำกลั่นในการสกัด และการใช้น้ำร้อนในการสกัด โดยที่วิธีการใช้น้ำ

ร้อนในการสกัดจะสามารถสกัดเจลาตินได้ในปริมาณมากที่สุด และการใช้น้ำกลั่นในการสกัดจะสามารถสกัดเจลาตินได้ในปริมาณน้อยที่สุด นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เมื่อทำการสกัดเจลาตินจากแมลงชนิด *A. Viduatus* และ *A. Pubescens* โดยใช้สารละลายเบสจะให้ปริมาณเจลาตินต่ำกว่าการสกัดเมื่อใช้สารละลายที่เป็นกรดอ่อน เนื่องจากการสกัดโดยใช้สารละลายที่มีค่าความเป็นกรดต่างสูง (เบส) จะทำให้คอลลาเจนเกิดการสลายตัวมากกว่าการใช้สารละลายที่เป็นกรดอ่อน (Abdalbasit A.M. และคณะ 2013)

2.1.2 โครงสร้างเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ โครงสร้างมีการเกี่ยวพันกันระหว่างสายพอลิเปปไทด์ด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปเจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญ 18 ชนิด และมีกรดอะมิโนหลัก 3 ชนิด คือ ไกลซีน (glycine) โพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) (Gómez-Guillén M.C. และคณะ 2011) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

โครงสร้างเจลาตินสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะคือ โครงสร้างปฐมภูมิ และโครงสร้างทุติยภูมิ โดยโครงสร้างปฐมภูมิของเจลาตินมีลักษณะคล้ายคลึงกับโครงสร้างของคอลลาเจน แต่จะพบความแตกต่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือ กรดอะมิโนชนิดแอสพาราจีน (asparagine) และ กลูตามีน (glutamine) ในโครงสร้างของเจลาตินจะมีหมู่เอไมด์ (amide group) ลดลง แต่จะพบหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ในกรดอะมิโนชนิดแอสพาทิก (aspartic) และกลูตามิก (glutamic) มากกว่าในคอลลาเจน ส่งผลให้เจลาตินมีค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ต่ำลง นอกจากนี้ความสามารถในการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชัน (function group) ของเจลาตินขึ้นอยู่กับกระบวนการเตรียมวัสดุ (pretreatment) ตัวอย่างเช่น หากใช้สารละลายที่เป็นกรดอ่อนในการสกัดเจลาตินจากหนังสุกร จะทำให้หมู่เอไมด์ลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การใช้สารละลายที่เป็นกรดแก่ในการสกัดเจลาติน จะทำให้หมู่เอไมด์เกือบทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นหมู่คาร์บอกซิล นอกจากนี้ ในกระบวนการสกัดเจลาตินจะเกิดการกำจัดหมู่ยูเรีย (urea group) ออกจากโครงสร้างคอลลาเจนส่งผลให้กรดอะมิโนชนิดอาร์จินีน (arginine) ในคอลลาเจน เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนชนิดออร์นิติน (ornithine) ที่พบในโครงสร้างของเจลาติน โดยทั่วไป ระยะเวลาในการสกัดเจลาตินจากคอลลาเจนจะสอดคล้องกับระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนโครงสร้าง ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัดมาก จะพบการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโน หรือการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างร้อยละ

34 ส่งผลให้โครงสร้างเจลาตินมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active) ที่สูงขึ้น แต่เมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัดน้อยจะพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหรือการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างประมาณร้อยละ 3 เท่านั้น

สำหรับโครงสร้างทุติยภูมิ น้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายและการเกิดเจล ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลจะแตกต่างกันตามลักษณะการจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลแอลฟา (α -chain) และลำดับกรดอะมิโนในสายโซ่โอลิโกเมอร์ (oligomer) สายพอลิเปปไทด์ของโมเลกุลเจลาตินเป็นสายโซ่พอลิเมอร์ที่มีการจัดเรียงตัวหลายลักษณะ ประกอบด้วย สายโซ่โมเลกุลแอลฟา (α -chain) สายโซ่โมเลกุลเบต้า (β -chain) และสายโซ่โมเลกุลแกมมา (γ -chain) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 80×10^3 , 130×10^3 และ 300×10^3 ตามลำดับ (Harris P. 1990)

ตารางที่ 2.1 กรดอะมิโน 18 ชนิด ในเจลาตินชนิดเอจากหนังหมู และชนิดบีจากกระดูกวัว (Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) 2012)

กรดอะมิโน	เจลาตินชนิดเอ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	เจลาตินชนิดบี (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
Alanine	8.6	10.1
Arginine	8.3	5
Aspartic Acid	6.2	4.6
Cystine	0.1	0.4
Glutamic Acid	11.3	8.5
Glycine	26.4	24.5
Histidine	0.9	0.4
Hydroxylysine	1	0.7

กรดอะมิโน	เจลาตินชนิดเอ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	เจลาตินชนิดบี (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
Hydroxyproline	13.5	11
Isoleucine	1.4	1.3
Leucine	3.1	2.8
Lysine	4.1	2.1
Methionine	0.8	0
Phenylalanine	2.1	1.3
Proline	16.2	13.5
Serine	2.9	3.4
Threonine	2.2	2
Tyrosine	0.4	0
Valine	2.5	2.4

2.1.3 การสกัดเจลาตินจากคอลลาเจน

วิธีที่ง่ายที่สุดในการเปลี่ยนรูปของคอลลาเจนให้อยู่ในรูปของเจลาติน คือ การทำให้คอลลาเจนเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยกรดหรือเบส ซึ่งการไฮโดรไลซิสด้วยกรดนั้นจะใช้หลักการของการเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน (thermal denaturation) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำให้พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) และ พันธะส่วนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bonds) ในโครงสร้างของคอลลาเจนถูกทำลาย รวมถึงพันธะภายในโมเลกุลระหว่างสายโซ่เกลียว (helix) ของคอลลาเจน หลังจากกระบวนการไฮโดรไลซิส

คอลลาเจนพบว่า สายโซ่โม่เลกุลที่ได้จะมีการจัดเรียงตัวอยู่ 3 ลักษณะคือ สายโซ่โม่เลกุลแบบแอลฟา สายโซ่โม่เลกุลแบบเบต้า ซึ่งเป็นสายโซ่โม่เลกุลของแอลฟาสองสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ และสายโซ่โม่เลกุลแบบแกมมา ซึ่งเป็นสายโซ่โม่เลกุลของแอลฟาสามสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์

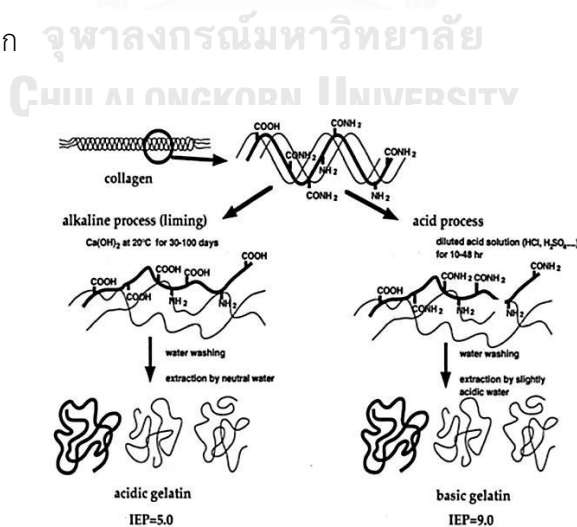
ประเภทของเจลาตินสามารถแบ่งได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสของคอลลาเจน คือ (Lupke M. และ Bruckner H. 1998, Tabata Y. และ Ikada Y. 1998)

1. เจลาตินชนิดเอ (type A gelatin หรือ basic gelatin)

เจลาตินชนิดเอสามารถเตรียมได้จากการไฮโดรไลซิสของคอลลาเจนจากหนังหมูหรือปลาโดยใช้สารละลายกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เป็นต้น กระบวนการไฮโดรไลซิสวิธีนี้จะทำให้ได้ค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ของเจลาตินใกล้เคียงกับค่าไอโซอิเล็กทริกของคอลลาเจน คือ 9 เนื่องจากกลุ่มพันธะเอไมด์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในคอลลาเจนมีจำนวนน้อย

2. เจลาตินชนิดบี (type B gelatin หรือ acidic gelatin)

เจลาตินชนิดบีสามารถเตรียมได้จากการไฮโดรไลซิสของคอลลาเจนจากหนังวัวหรือกระดูกวัวโดยใช้สารละลายเบส เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) เป็นต้น กระบวนการไฮโดรไลซิสวิธีนี้จะทำให้ได้ค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ของเจลาตินประมาณ 4-5 เนื่องจากเจลาตินที่ได้มีหมู่คาร์บอกซิลปริมาณมาก



รูปที่ 2.1 การสกัดเจลาตินชนิดเอ (basic gelatin) และชนิดบี (acidic gelatin)

(Tabata Y. และ Ikada Y. 1998)

2.1.4 สมบัติทั่วไปของเจลาติน

เจลาตินเป็นสารที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อเป็นของแข็งจะมีลักษณะใสและเปราะง่าย เจลาตินมีค่าร้อยละความชื้นประมาณ 8-13 โดยน้ำหนัก และมีความหนาแน่นสัมพัทธ์ 1.3-1.4 เจลาตินประกอบด้วยธาตุพื้นฐาน ได้แก่ คาร์บอน (ร้อยละ 50.5) ไฮโดรเจน (ร้อยละ 6.8) ไนโตรเจน (ร้อยละ 17) และออกซิเจน (ร้อยละ 25.2) เมื่ออุณหภูมิของเจลาตินถูกแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำ เจลาตินจะเกิดการบวม แต่เมื่ออุณหภูมิของเจลาตินถูกแช่ในน้ำอุณหภูมิสูง เจลาตินจะละลายเป็นสารละลาย (Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) 2012) เจลาตินสามารถละลายได้ในกลีเซอรอล (glycerol) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) หรือสารละลายที่มีขี้ผึ้งสูง และสารละลายอินทรีย์ ตัวอย่างเช่น กรดอะซิติก (acetic acid) ไตรฟลูออโรเอทานอล (trifluoro ethanol) และฟอร์มามิด (formamide) เป็นต้น เจลาตินไม่สามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ที่มีขี้ผึ้งต่ำ ตัวอย่างเช่น เบนซีน (benzene) อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohols) และไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethylformamide) (Finch C.A. 1977) เป็นต้น

เจลาตินสามารถละลายได้ทั้งสารละลายที่เป็นกรดและเบส ในสารละลายกรด เจลาตินจะแสดงประจุบวก (cation) และในสารละลายเบสนั้น เจลาตินจะแสดงประจุลบ (anion) (Janus J. และคณะ 1951) อีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของเจลาตินคือ เจลของแข็งของเจลาตินสามารถเปลี่ยนสถานะกลับเป็นสารละลายเจลาตินได้เมื่อได้รับความร้อน (thermoreversible gel) หรือกล่าวคือ เมื่อสารละลายเจลาตินมีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ถูกทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35-40 องศาเซลเซียส เจลาตินจะมีความหนืดสูงขึ้นและจะกลายเป็นเจลในที่สุด ซึ่งความแข็งแรงของเจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ การจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลภายในโครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุลของเจลาติน อีกทั้ง ความแข็งแรงของเจล (gel strength) และความหนืด (viscosity) ของเจลาตินจะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อให้ความร้อนสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส การกระจายตัวของค่าน้ำหนักโมเลกุลจะส่งผลต่อค่าความหนืดมากกว่าความแข็งแรงของเจล ตัวอย่างเช่น เจลาตินที่มีความแข็งแรงของเจลสูงอาจจะมีค่าความหนืดที่ต่ำกว่าเจลาตินที่มีความแข็งแรงของเจลต่ำ ซึ่งค่าความหนืดของเจลจะมีค่าแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน และแปรผกผันกับอุณหภูมิของสารละลายเจลาติน นอกจากนี้ ความหนืดยังเป็นปัจจัยสำคัญในการบอกความแข็งแรงของเจล ในงานทางด้านอาหารและอุตสาหกรรม ความแข็งแรงของเจลนั้น สามารถบอกเป็นระดับ (grade) ของเจลาตินได้ โดยจะทำการทดสอบภายใต้ strict guidelines คือ ทำการ

วัดน้ำหนักที่ใช้กดกระบอกลูกสูบทรงกระบอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายนอก 13 มิลลิเมตร และ เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร เมื่อบรรจุเจลลาตินความเข้มข้นร้อยละ 6.67 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ภายในกระบอกสูบ โดยปกติแล้วจะมีค่าความ แข็งของเจลลาตินอยู่ที่ 50-300 ซึ่งค่าความแข็งของเจลลาตินที่แตกต่างกันนั้นเป็นปัจจัยมาจาก กระบวนการไฮโดรไรซิสที่กำหนดสภาวะแตกต่างกัน เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ เอนไซม์ สภาวะกรดหรือเบส เป็นต้น ดังนั้น การประยุกต์ใช้งานของเจลลาตินจึงแตกต่างกัน เช่น เจลาตินชนิดบี ที่มีค่าความแข็งของเจล 125-250 จะใช้ในการผลิตลูกอม เจลาตินชนิดเอที่มีค่าความแข็งของเจล 70-90 จะถูกนำมาใช้ในกระบวนการกรองไวน์หรือน้ำผลไม้ เป็นต้น นอกจากนี้ เจลาตินสามารถย่อย สลายได้ตามธรรมชาติ หรืออยู่ในสภาวะที่มีเอนไซม์ จุลินทรีย์ และมีค่าความเป็นกรดต่างที่ เปลี่ยนแปลงไป เป็นต้น (stickley F. 1987 และ Jacobson R.E. 1967 และ Jones R.T. 1987 และ Harris P. 1990)

2.1.5 สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาติน

สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง

Wang S. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีพอลิแลคติก แอซิด (polylactic, PLA) ไพโบรอิน และเจลลาตินเป็นองค์ประกอบ และทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการโดยนำโครงเลี้ยงเซลล์มาเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนู (3T3 mouse fibroblasts) ที่มีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์/2 ตารางเซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นองค์ประกอบ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่มีความดันบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์สามารถ เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 14 วัน และมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่สูงกว่าเมื่อ เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิตินั้นมีอัตราส่วนของพื้นที่ต่อ ปริมาตรที่สูงกว่าและมีรูพรุนมากกว่า ดังนั้นจึงเหมาะแก่การยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ และ ทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ในระดับสัตว์ทดลองโดยปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ ขนาด $10 \times 10 \times 0.5$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร (กว้าง x ยาว x สูง) ลงในหนูทดลองสายพันธุ์ Sprague-dawley บริเวณใต้ผิวหนังส่วนหลัง (Subcutaneous Implantation) พบว่า หลังการปลูกถ่ายเป็นเวลา 1

และ 2 เดือน ไม่มีการตรวจพบเม็ดเลือดขาวชนิด macrophage และ lymphocyte ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าไม่เกิดการอักเสบน้อยมากและไม่มีการต่อต้านของสัตว์ทดลอง และหลังจากการปลูกถ่ายลงหนูทดลองเป็นเวลา 3 เดือน เริ่มมีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดขึ้นและรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดเล็กซึ่งสามารถบ่งบอกได้ถึงการย่อยสลายได้ทางชีวภาพด้วยเช่นกัน

จากงานวิจัยของ Ghasemi-Mobarakeh L. และคณะ (2008) ได้ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ของพอลิคาโพรแลกโตน (poly-caprolactone) และเจลาตินในอัตราส่วนต่าง ๆ สำหรับเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ประสาท (C172) พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของเจลาตินสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้นานกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีพอลิคาโพรแลกโตนเป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว

สมบัติความชอบน้ำ

Jiankang H. และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติของไคโตซานและเจลาตินเพื่อพัฒนาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อจำลองลักษณะการทำงานของตับ และได้ศึกษาผลของการดูดซับน้ำ (swelling) เมื่อแช่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที โดยจะสังเกตผล ทุก ๆ 10 นาที พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีร้อยละการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้น 600 เท่าโดยน้ำหนัก กล่าวได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์นี้มีความชอบน้ำสูง สารอาหารหรือของเสียในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์สามารถไหลเข้าออกโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี

Shalumon K.T. และคณะ (2015) ได้ทำการทดสอบค่ามุมสัมผัสของแผ่นฟิล์ม ที่มีส่วนประกอบของ Poly-L-lactic acid (PLLA) และเจลาติน โดยมีความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีองค์ประกอบของ PLLA อย่างเดียวนั้น มีค่ามุมสัมผัสของน้ำและแผ่นฟิล์มที่มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 145° ซึ่งแสดงถึงความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์ม PLLA ที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบความเข้มข้นของร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก มีค่ามุมสัมผัสน้ำ 135° , 127° และ 121° ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลาติน แผ่นฟิล์มจะมีสมบัติความชอบน้ำที่เพิ่มขึ้น

สมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพ

Ratanavaraporn J. และคณะ (2014) ได้ทำการทดสอบความสามารถการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคไมโครของไหมและเจลาตินที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านกระบวนการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร โดยทำการทดสอบด้วยเอนไซม์ คอลลาจีเนสที่มีความเข้มข้น 163 หน่วย/มิลลิกรัม ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าอนุภาคไมโครที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเจลาตินและ ไฟโบรอินเท่ากับ 100:0 ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ทั้งหมด ที่อัตราส่วนการผสม 70:30 ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพียงร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และที่อัตราส่วนการผสม 50:50 และ 30:70 นั้นถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อย

Gaowa A. และคณะ (2014) ได้ทำการทดสอบการปลดปล่อยของสายเปปไทด์ที่ถูกกักเก็บอยู่ในอนุภาคนาโน โดยเปรียบเทียบการปลดปล่อยสายเปปไทด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ซัลเฟตและในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีความเข้มข้นของ fetal bovine serum (FBS) แตกต่างกัน (ร้อยละ 5-100 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อนุภาคนาโนที่ถูกแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ซัลเฟตจะมีปริมาณของสายเปปไทด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาน้อยที่สุด และอนุภาคนาโนที่ถูกแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM จะมีปริมาณสายเปปไทด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ FBS เนื่องจากใน FBS นั้น มีเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้

2.1.6 การประยุกต์ใช้งานเจลาติน

เจลาตินถูกนำมาใช้ในงานต่างๆ มากมาย เช่น การทำให้เกิดโฟม (foaming) การทำอิมัลชัน (emulsifying) และ เป็นสารช่วยเคลือบผิว (wetting agent) ในทางอาหาร ยา และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active) นอกจากนั้นแล้ว เจลาตินยังเป็นสารชนิดแรกๆ ที่นำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียสำหรับเนื้อสัตว์ในอุตสาหกรรมอาหาร จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการนำเจลาตินมาช่วยในการจำแนกชนิดของชา รวมถึงการกักเก็บสารอาหารหรือยาในลักษณะของแคปซูล (capsule) สำหรับการทำอิมัลชัน ต้องมีอัตราส่วนของเจลาตินและน้ำมันที่เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงการเกาะรวมกลุ่มกันของอนุภาค

เจลาตินถูกนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านอุตสาหกรรมของยาอย่างมากมาย ส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้สำหรับการกักเก็บยา เนื่องจากเจลาตินจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เจลาตินที่มีค่าความแข็งประมาณ 0-140 จะถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแคปซูลในการกักเก็บ

วิตามินเอ ดี และอี และในปัจจุบันนั้นแคปซูลเจลาตินนั้นถูกนำมาใช้เก็บสารต่าง ๆ มากมาย เนื่องจากเจลาตินสามารถป้องกันความชื้น ความร้อน และสภาวะที่รุนแรงได้ (Gibbs และคณะ 1999)

การประยุกต์ใช้งานของเจลาตินในทางวิศวกรรมการแพทย์สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.2

2.2 ไหม (silk)

ไหมเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สกัดได้จากต่อมไหมของสัตว์ขาปล้องหลายชนิด (arthropods) เช่น หนอนไหม แมงมุม และผึ้งบางชนิด เป็นต้น ไหมที่ได้จากหนอนไหมซึ่งได้จากการสังเคราะห์โปรตีนในต่อมที่ทำหน้าที่พิเศษ 2 ต่อมที่อยู่บริเวณหัวของหนอนไหมและโปรตีนไหมจะถูกปั่นหรือพ่นออกมาจากท่อพ่น (spinneret) บริเวณด้านข้างของปากหนอนไหม จนกลายเป็นเส้นใยธรรมชาติในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยทั่วไปไหมสามารถจำแนกออกได้ 2 ประเภท คือ ไหมเลี้ยงหรือไหมบ้าน (domesticated mulberry silk worm) ไหมชนิดนี้จะกินใบหม่อนเป็นอาหาร มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* จัดอยู่ในวงศ์ *Bombycidae* อีกประเภทหนึ่งคือไหมป่า (wild non-mulberry silkworm) จัดอยู่ในวงศ์ *Saturniidae* (Koha L. 2015)

2.2.1 โครงสร้างและสมบัติของไหม

ไหมเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสมบัติสำคัญ 2 ชนิด คือ ไฟโบรอินและเซรีซิน และมีส่วนประกอบอื่นอีกเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 2.2 (Charu V. และคณะ 2007) โดยไฟโบรอินเป็นโปรตีนเส้นใยที่เป็นส่วนทำให้โมเลกุลของไหมมีความแข็งแรง และเซรีซินเป็นโปรตีนก้อนกลม ทำหน้าที่เชื่อมเส้นใยไฟโบรอินให้อยู่รวมกันเป็นมัดเส้นใยที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของไหม *Bombyx mori* (Mondal M.K. 2007)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ไฟโบรอิน	70-80
เซรีซิน	20-30
ไขมันและขี้ผึ้ง	0.8-1.0
สารอินทรีย์และวัตถุเคมี	0.2-0.7
รวม	100

2.2.2 ไฟโบรอิน

เส้นใยไฟโบรอินในไหมบ้านหรือไหมเลี้ยง (*B. mori*) มีขนาดเส้นใยผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 ไมโครเมตร ประกอบด้วยสายโซ่โมเลกุลโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีสายโซ่โมเลกุลต่ำ (light chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 kDa และโปรตีนที่มีสายโซ่โมเลกุลสูง (heavy chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 390 kDa ซึ่งพบโปรตีนทั้งสองชนิดในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งถูกเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Ruby A.J. และคณะ 1995) พันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีนลำดับที่ 20 (cys-c20) จากโมเลกุลส่วนปลายคาร์บอกซิล (20^{th} residue of carboxyl terminus) ในโปรตีนสายโซ่โมเลกุลสูง จะเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนซิสเทอีน 172 (cys-172) ของโปรตีนสายโซ่โมเลกุลต่ำ ส่งผลให้โมเลกุลไหมไฟโบรอินสามารถอยู่รวมกันได้

สายโซ่โมเลกุลสูง จะประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของกรดอะมิโนที่จัดเรียงตัวกันเป็นระเบียบ และมีความไม่ชอบน้ำเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้สายโซ่โมเลกุลส่วนนี้แสดงความเป็นผลึก (crystalline structure) ส่วนสายโซ่โมเลกุลต่ำ จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แสดงความเป็นประจุ และมีความชอบน้ำ นอกจากนี้เส้นใยไฟโบรอินยังมีส่วนไกลโคโปรตีน ที่เรียกว่า P25 มีน้ำหนักประมาณ 30 kDa ที่สายโซ่ถูกเชื่อมด้วยอัตราการกิริยาของส่วนไม่ชอบน้ำ เป็นองค์ประกอบ ซึ่งโมเลกุล

ของไหมไฟโบรอินจะประกอบด้วยสายโซ่โมเลกุลชนิดต่าง ๆ (H-fibroin, L-fibroin และ P25) ในอัตราส่วน 6:6:1 (Banani K. และคณะ 2013)

องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโมเลกุลของไหมไฟโบรอินประกอบด้วย ไกลซีน 43%, อะลานีน 30% และเซอรีน 12% พหุสัณฐาน (polymorphs) ของไหมไฟโบรอินสามารถจำแนกได้สามชนิด คือ ไหม I (silk I) มีโครงสร้างแบบ random coil ที่อยู่ในสภาวะของเหลวในตอมของหนอนไหมก่อนการตกผลึกเป็นเส้นใยโปรตีน สามารถละลายน้ำได้ (water-soluble state) และสามารถเปลี่ยนพหุสัณฐานเป็น ไหม II (silk II) ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับความร้อน, แรงทางกายภาพ, เอทานอล หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ (Kudug E. 2004) สำหรับไหม II นั้น จะมีโครงสร้างทุติยภูมิแบบแผ่นพับเบต้า (β -sheet structure) ซึ่งเป็นโครงสร้างอสมมาตร (asymmetrical) เนื่องจากสายโซ่โมเลกุลข้างหนึ่งประกอบด้วย สายโซ่ข้างของไฮโดรเจนจากกรดอะมิโนชนิดไกลซีน สายโซ่อีกข้างหนึ่งประกอบด้วย สายโซ่ของเมทิลจากกรดอะมิโนชนิดอะลานีนที่แสดงความไม่ชอบน้ำ ซึ่งโครงสร้างแผ่นพับเบต้านี้สามารถจัดเรียงตัวแบบสลับระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทิลได้ ส่งผลให้เกิดเป็นโครงสร้างผลึกที่มีความแข็งแรง ยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ที่แข็งแรง (Bhardwaj N. 2011) มากพอที่สามารถป้องกันการแยกของสายโซ่โมเลกุลไหม II จึงไม่ละลายน้ำ รวมถึงตัวทำละลายบางชนิด แต่สามารถละลายในตัวทำละลายที่เป็นเกลือความเข้มข้นสูง เช่น ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) และลิเทียมไซโอไซยาเนต (LiSCN) เป็นต้น พหุสัณฐานของไหมไฟโบรอินอีกชนิดหนึ่งคือ ไหม III (silk III) โมเลกุลจะเรียงตัวแบบเกลียวเฮลิค (helical structure) ซึ่งเป็นส่วนสัมผัสกับน้ำและอากาศระหว่างโมเลกุลไฟโบรอิน (Bhardwaj N. 2011 และ Gupta V. และคณะ 2009 และ Manju S. 2011)

ไหมไฟโบรอิน เป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติ ที่มีสมบัติทางกลที่ดีกว่าพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดอื่น จากงานวิจัยของ Cilurzo F. และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาสมบัติทางกลของไหมไฟโบรอินเปรียบเทียบกับวัสดุอื่น ๆ จะพบว่าไหมไฟโบรอินมีค่ามอดูลัส (modulus) ความแข็งแรงต่อการแตกหัก (breaking strength) และความแข็งแรงต่อการยืดตัว (elongation) ที่ดี ส่งผลให้ไฟโบรอินมีความแข็งแรง ทนทาน และมีความเหนียวสูง

2.2.3 สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไฟโบรอิน

สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง

Biman B. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human foreskin fibroblast) เมื่อเพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ของไหมไฟโบรอินที่มีร้อยละน้ำหนัก โดยปริมาตรแตกต่างกันคือ 2, 4 และ 6 โดยขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส พบว่าความหนาแน่นของรูพรุน (porosity) และขนาดของรูพรุน (pore size) ที่เกิดขึ้นจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไหมไฟโบรอิน เนื่องจากมีสัดส่วนมวลต่อปริมาตรที่เพิ่มขึ้น และเมื่อลดอุณหภูมิของการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ความหนาแน่นของรูพรุนจะเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของรูพรุนจะมีค่าลดลง เนื่องจากการใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง อัตราเร็วในการเยือกแข็งจะต่ำ ดังนั้น ผลึกของน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจึงมีขนาดใหญ่กว่าการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งจะเกิดผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กกว่า และเมื่อนำไปทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่นของรูพรุนสูงและขนาดรูพรุนเล็ก อาจมีการเชื่อมกันระหว่างรูพรุน จะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มากที่สุด (อุณหภูมิที่ใช้การเยือกแข็งเท่ากับ -197 องศาเซลเซียส) และพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อุณหภูมิในการเยือกแข็งเท่ากับ -20 และ -80 องศาเซลเซียสนั้น เซลล์จะเริ่มตายช้ากว่า เพราะโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อุณหภูมิในการเยือกแข็งเท่ากับ -196 องศาเซลเซียส จะมีความหนาแน่นของรูพรุนสูง ส่งผลให้รูพรุนมีโอกาสการเชื่อมติดกัน ทำให้เซลล์สามารถเกิดการเคลื่อนย้าย และมีการเจริญเติบโตที่มากกว่า เซลล์จึงเริ่มตายเร็วกว่า

Chamchongkaset J และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลกระทบจากการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจุกเกตเจลาตินของโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไฟโบรอินของไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ซึ่งขึ้นรูปด้วยวิธีการกำจัดเกลือออก พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการคอนจุกเกต มีโครงสร้างที่แข็งแรง โดยดูจากค่าความต้านทานแรงกด ซึ่งมีค่าสูงขึ้น คิดเป็นร้อยละ 93 เป็นผลทำให้เกิดการส่งเสริมการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ mouse osteoblast บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดี

สมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพ

Okhawalai M. และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ขอเจลาตินและไหมไฟโบรอิน พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ โดยทดสอบอัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิกรัม ที่ค่าความเป็นกรด

ต่างเท่ากับ 7 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไหมมากจะมีอัตราการย่อยสลายที่ช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนของเจลาตินมาก

Li M. และคณะ (2003) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของการย่อยสลายทางชีวภาพของเมมเบรนไหมไฟโบรอิน โดยทำการเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ ได้แก่ เอนไซม์คอลลาจีเนส IA เอนไซม์โปรตีเอส XIV และเอนไซม์ไคโมทริปซิน ที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่า ภายในระยะเวลา 15 วัน ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของเมมเบรนไฟโบรอินที่แช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส IA เอนไซม์โปรตีเอส XIV เอนไซม์ไคโมทริปซิน และสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ไม่มีเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ 48, 30, 68 และ 68 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์โปรตีเอส XIV สามารถย่อยสลายไหมไฟโบรอินได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เอนไซม์คอลลาจีเนส IA โดยพบว่าเอนไซม์โปรตีเอส XIV จะมีความจำเพาะเจาะจงกับโครงสร้างไหมไฟโบรอินมากกว่าเอนไซม์คอลลาจีเนส IA ซึ่งภายในระยะเวลา 15 วัน ของการย่อยสลายไหมไฟโบรอินด้วยสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนชนิดอะลานีน (Ala), ซีสเทอีน (Cys), ไกลซีน (Gly) และเมธโอนีน (Met) นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ไคโมทริปซิน ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนไฟโบรอิน เนื่องจากน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสารละลายเอนไซม์ไคโมทริปซิน มีค่าเท่ากับน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินที่อยู่ในสภาวะไม่มีเอนไซม์

Wongnarat C. และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายของเส้นไหมไฟโบรอินที่แช่ในสารละลายเอนไซม์ต่างชนิดกัน ได้แก่ เอนไซม์โปรตีเอส XIV และเอนไซม์โปรตีเอส XXIII ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่า ภายในระยะเวลา 49 วัน ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของเส้นไหมไฟโบรอินที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV และสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XXIII มีค่าเท่ากับ 17.5 และ 27.5 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์โปรตีเอส XIV มีความจำเพาะเจาะจงกับไหมไฟโบรอินมากกว่าเอนไซม์โปรตีเอส XXIII

Yongzhong W. และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ไหมไฟโบรอินในหลอด nude และ lewis โดยทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการจำกัดเกลือออกซึ่งใช้สารละลายในการเตรียมสารละลายไหมแตกต่างกันคือ น้ำ (วิธี 1) และตัวทำละลายอินทรีย์เฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (hexafluoroisopropanol, HFIP) (วิธี 2) พบว่าเมื่อปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ลงในสัตว์ทดลอง โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปแบบวิธีที่ 1 สามารถย่อยสลายได้ภายใน 2 ถึง 6 เดือน และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปด้วยวิธีที่ 2 ใช้เวลาย่อยสลายประมาณ 1 ปี และพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้น

รูปด้วยวิธีที่ 1 นั้น จะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่า นอกจากนี้การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ไฟโบรอินในสัตว์ทดลองขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างพื้นฐาน และการจัดเรียงตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์นั้น ๆ

2.2.4 การประยุกต์ใช้งานของไหมไฟโบรอิน

ไหมถูกนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างมากจนได้รับสมญานามว่า ราชินีแห่งเส้นใย เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีในเรื่องของการระบายอากาศ ดูดซับความร้อนไว้ที่เนื้อผ้าและระบายความชื้นได้ดี สามารถดูดซับน้ำได้ดีกว่าผ้าฝ้าย 1.5 เท่า จึงถูกนำมาผลิตเป็นชุดสวมใส่มากมาย นอกจากนั้นแล้วไหมยังสามารถประยุกต์ใช้งานในด้านของเวชสำอาง โปรตีนไหมไฟโบรอินเป็นสารที่ให้ความชุ่มชื้นถึง 300 เท่าของน้ำหนัก จึงสามารถป้องกันผิวแห้งได้ดี จึงถูกนำมาผลิตเป็นครีมบำรุงความชุ่มชื้น และยังถูกผลิตเป็นเครื่องสำอางมากมาย ซึ่งพบว่าสามารถเข้ากับใบหน้าได้ดีกว่าเครื่องสำอางชนิดอื่น (วีระศักดิ์ 2542)

ไหมไฟโบรอินเป็นวัสดุทางชีวภาพที่ถูกนำมาใช้งานทางการแพทย์เนื่องจากสามารถขึ้นรูปได้หลายรูปแบบ เช่น แผ่นฟิล์ม เส้นใย อนุภาคทรงกลม และไฮโดรเจล เป็นต้น (Kasoj N. และคณะ 2012) และถูกประยุกต์ใช้งานในรูปแบบต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น โครงเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกส่งเสริมให้เซลล์ข้างเคียงมายึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี (Malay O.D. และคณะ 2008) ยังมีการนำมาใช้ในงานด้านศัลยกรรมคือเป็นวัสดุทดแทนหลอดเลือดและเส้นประสาท (Kasoj N. และคณะ 2012) นอกจากนั้นแล้ว ไหมไฟโบรอินยังสามารถใช้ในงานด้านการนำส่งยา เช่น เมมเบรนไฟโบรอินใช้เป็นตัวนำส่งยาและควบคุมการปลดปล่อยยาผ่านผิวหนัง (Wenk E. 2011) ซึ่งเหตุผลหลักในการเลือกไหมไฟโบรอินมาเป็นชีววัสดุในการใช้งานคือ มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีความสามารถเข้ากับเซลล์ได้ดี และสามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ

การประยุกต์ใช้งานของใหม่ไฟโบรอินในทางวิศวกรรมการแพทย์สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้งานใหม่ไฟโบรอินทางวิศวกรรมการแพทย์

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบ	การประยุกต์ใช้งานโครงเลี้ยงเซลล์	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ที่กักเก็บ/ชนิดของเซลล์	แบบจำลองสัตว์ทดลอง	อ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน	กระดูก	BMP-2	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells	-	Li C. และคณะ (2006)
ไฮโดรเจลไฟโบรอิน	กระดูก	-	Osteoblasts	กระต่าย	Fini M. และคณะ (2005)
เส้นใยไฟโบรอิน	หลอดเลือดเกิดใหม่	-	Endothelial cells	-	S. Fuchs. และ คณะ (2006)
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีรูพรุน	กระดูกอ่อน	-	Mesenchymal stem cells	-	Wang Y. และคณะ (2005)
เส้นใยไฟโบรอินด้วยระบบไฟฟ้าสถิต	ซ่อมแซมบาดแผล	-	Keratinocytes และ fibroblasts	-	Min B.M. และคณะ (2004)

ชนิดของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีไฟบรินเป็นองค์ประกอบ	การประยุกต์ใช้งาน โครงเลี้ยงเซลล์	สารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ	ที่เก็บ/ชนิดของเซลล์	แบบจำลอง สัตว์ทดลอง	อ้างอิง
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟบริน (สายพันธุ์ นางน้อยศรีสระเกษ) คอนจูเกตด้วย เจลาตินชนิดเอ	กระดูกอ่อน	-	osteoblast-like cells (MC3T3-E1)	-	Chamchongkaset J. และคณะ (2008)
โครงเลี้ยงเซลล์ไฟบริน (สายพันธุ์ นางน้อยศรีสระเกษ) คอนจูเกต ด้วยไฮดรอกซีอะพาไทต์	กระดูก	-	bone-marrow derived mesenchymal stem cell (MSCs)	-	Tritanipakul S. และคณะ (2009)
แผ่นฟิล์มไฟบริน(สายพันธุ์นาง น้อยศรีสระเกษ)คอนจูเกตด้วยเจ ลาตินชนิดเอและไฮดรอกซีอะพา ไทต์	กระดูก	-	osteoblast-like cells (MC3T3-E1) และ bone-marrow derived mesenchymal stem cell (MSCs)	-	Vachiraroj V. และ คณะ (2009)

2.3 อนุภาคไมโคร (microspheres)

อนุภาคไมโครเป็นอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-1000 ไมโครเมตร ซึ่งอนุภาคไมโครสามารถผลิตได้จากวัสดุทางธรรมชาติ (natural materials) และวัสดุจากการสังเคราะห์ (synthetic materials) โดยทั่วไปลักษณะของอนุภาคมี 2 ลักษณะ คือ ทรงกลมตัน (solid microspheres) และ ทรงกลมกลวง (hollow microspheres)

สำหรับกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคไมโครมีด้วยกันหลายวิธี สรุปดังตารางที่ 2.3 ซึ่งแต่ละวิธีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของวัสดุตั้งต้นและการประยุกต์การใช้งาน ตัวอย่างเช่น

1) การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying)

วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย จะใช้พอลิเมอร์ที่สามารถละลายได้ในสารละลายที่ระเหยได้ง่าย เช่น ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และอะซิโตน (acetone) เป็นต้น สารละลายพอลิเมอร์จะถูกพ่นออกมาเป็นลักษณะของอนุภาคขนาดเล็กพร้อมกับลมร้อน ซึ่งช่วยในการระเหยของตัวทำละลาย ทำให้เหลือส่วนของแข็งของอนุภาคทรงกลม หลังจากนั้นอนุภาคทรงกลมจะถูกแยกออกจากลมร้อนด้วยกระบวนการของเครื่องไซโคลน (cyclone separator) ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (aseptic condition) ได้ และเป็นกระบวนการผลิตที่รวดเร็ว

2) การสกัดตัวทำละลายออก (solvent extraction)

วิธีการสกัดตัวทำละลายออกนั้น พอลิเมอร์จะถูกละลายในสารละลายอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ จากนั้นจะถูกนำมาปั่นกวนในวัฏภาคของเหลวซึ่งต้องเป็นสารชนิดที่ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ข้างต้น และปั่นกวนด้วยความเร็วรอบสูงจนเกิดเป็นลักษณะอนุภาคขนาดเล็ก จากนั้นทำให้อนุภาคแข็งตัว และสกัดตัวทำละลายอินทรีย์นั้นออกด้วยความร้อน

3) การเกิดอิมัลชัน (emulsion)

ระบบอิมัลชันจะประกอบด้วยของเหลวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป โดยของเหลวแต่ละชนิดไม่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ ตัวอย่างเช่น น้ำและน้ำมัน เมื่อมีการให้แรงแก่สารละลายผสม เช่น แรงจากการปั่นกวน ของเหลวจะเกิดการกระจายตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็ก เรียกว่า วัฏภาคภายในหรือส่วนกระจายตัว (internal or dispersed phase) โดยกระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเรียกว่า วัฏภาคภายนอกหรือส่วนต่อเนื่อง (external or continuous phase) หากแบ่งชนิดของ

อิมัลชันจากชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในและภายนอก สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด ชนิดแรก คือ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในคือน้ำ และวัฏภาคภายนอกคือน้ำมัน ชนิดที่สองคืออิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion) วัฏภาคของอิมัลชันชนิดนี้จะสลับกับชนิดแรก คือ มีวัฏภาคภายใน คือน้ำมัน และวัฏภาคภายนอก คือน้ำ ชนิดที่สาม คือ อิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ เป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น น้ำในน้ำมันในน้ำ (water in oil in water emulsion) หรือ น้ำมันในน้ำในน้ำมัน (oil in water in oil emulsion) เป็นต้น (Kataria S. และคณะ 2011)

ตารางที่ 2.4 วิธีการขึ้นรูปอนุภาคไมโคร (พิมพร 2008 และ Kataria S. และคณะ 2011)

วิธีการขึ้นรูป	ข้อดี	ข้อเสีย
การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying)	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถขึ้นรูปอนุภาคทรงกลม ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ - กระบวนการผลิตรวดเร็ว - ได้อนุภาคที่เสถียร 	<ul style="list-style-type: none"> - สารอาจเสียภาพเนื่องจากความร้อน - ค่าใช้จ่ายสูง
การสกัดตัวทำละลายออก (solvent extraction)	<ul style="list-style-type: none"> - ได้อนุภาคที่เสถียร 	<ul style="list-style-type: none"> - อาจเหลือสารเคมีตกค้างในระบบ
การเกิดอิมัลชัน (emulsion)	<ul style="list-style-type: none"> - กระบวนการผลิตไม่ซับซ้อน - ใช้ได้กับสารหลายประเภท - ได้อนุภาคที่เสถียร 	<ul style="list-style-type: none"> - กรณีที่ใช้สารลดแรงตึงผิว อาจตกค้างในระบบ

กลไกการเกิดอิมัลชัน

โดยทั่วไปเมื่อนำของเหลวสองชนิดที่ไม่สามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกันมาผสมกัน ของเหลวทั้งสองชนิดจะเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น เนื่องจากเกิดแรงตึงผิวระหว่างผิวของของเหลวแต่ละชนิด แต่เมื่อมีการเพิ่มพลังงานแก่ระบบ เช่น การเขย่า จะทำให้เกิดการเพิ่มของพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวทั้งสองชนิด ทำให้ของเหลวกระจายตัวเป็นหยดเล็ก ๆ ในอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงเกิดเป็นลักษณะของอิมัลชัน แต่จะเกิดเพียงชั่วคราวเท่านั้น กล่าวคือเมื่อเราหยุดให้พลังงานแก่ระบบ ของเหลวจะกลับมาแยกชั้นกันเหมือนเดิม ซึ่งหลักการทางเทอร์โมไดนามิกส์ สามารถอธิบายได้ว่า การเขย่าเป็นการเพิ่มพลังงานอิสระแก่พื้นผิว (surface free energy) ของเหลวสองชนิดจึงสามารถเข้ากันได้ชั่วคราว

ถือว่าเป็นสถานะที่ไม่คงตัว เนื่องจากเมื่อหยุดเขย่าหรือกวน ของเหลวสองชนิดนั้นจะกลับมารวมกัน และแยกชั้นเหมือนเดิม เนื่องจากของเหลวแต่ละชนิดจะปรับสถานะให้อยู่ในจุดคงตัว โดยการลดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างกันให้น้อยที่สุด แต่การเกิดอิมัลชันนั้นสามารถทำให้เกิดขึ้นอย่างถาวรได้ คือของเหลวชนิดหนึ่งสามารถกระจายตัวในของเหลวอีกชนิดหนึ่งได้อย่างคงตัว ไม่แยกชั้น โดยการเติมตัวทำอิมัลชันลงไปเพื่อป้องกันการเกาะรวมกลุ่มกันของอนุภาค ส่งผลให้อนุภาคของของเหลวเกิดความคงตัว และกระจายตัวได้ดี (พิมพร 2008)

การเกิดอิมัลชันต้องอาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน คือ

1) การทำให้ของเหลวในส่วนวัฏภาคภายในกระจายตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็กในวัฏภาคภายนอก โดยอาศัยการให้พลังงาน เช่น พลังงานความร้อน (heat) พลังงานทางกล (mechanical agitation) การสั่นสะเทือนโดยคลื่นเสียง (ultrasonic vibration) และพลังงานไฟฟ้า (electricity) เป็นต้น

2) การทำให้อนุภาคเล็ก ๆ กระจายตัวในวัฏภาคภายนอกได้อย่างคงตัว เช่น การใช้ตัวทำอิมัลชันหรือใช้สมบัติของของเหลวแต่ละชนิด

นอกจากนั้น เวลาที่ใช้ในการทำให้เกิดความคงตัวในอิมัลชันจะแตกต่างกันตามคุณสมบัติของสารและเทคนิคที่ใช้ ซึ่งมักจะได้รับการทดลองโดยต้องมีช่วงเวลาที่เหมาะสม กล่าวคือ หากใช้เวลาน้อยกว่าระยะเวลาที่เหมาะสม อิมัลชันที่เกิดขึ้นจะไม่คงตัว แต่ถ้าใช้เวลาในการให้พลังงานมากเกินไป อิมัลชันอาจไม่คงตัวเนื่องจากฟิล์มที่ทำหน้าที่ป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคเกิดการสลายตัวด้วยแรงที่มากเกินไป (Hacharoen N. 2011)

2.4 การเชื่อมขวาง (crosslinking)

การเชื่อมขวางเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์วิธีหนึ่ง เพื่อปรับปรุงให้โครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติเชิงกลที่ดี มีความแข็งแรงมากขึ้น ชะลอการย่อยสลายทางชีวภาพ มีความสามารถในการบวมน้ำได้มากขึ้น และมีความเสถียรขององค์ประกอบของสารสูงขึ้น เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น (Ma L. และคณะ 2003) โดยทั่วไปการเชื่อมขวางมีด้วยการหลายวิธี แต่สามารถจำแนกประเภทหลัก ๆ ได้ 2 ประเภท คือ การเชื่อมขวางทางกายภาพ และการเชื่อมขวางทางเคมี

2.4.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ

การเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT)

การเชื่อมขวางโดยการใช้ความร้อน เป็นการเชื่อมขวางระหว่างสายโซ่ (interchain crosslink) ของโปรตีนที่อยู่ใกล้กัน โดยความร้อนจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมขวางของหมู่เอมีน (amine group) และหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxyl group) เกิดเป็นพันธะเอไมด์ (amide) และมีการปลดปล่อยโมเลกุลของน้ำออกมา ซึ่งการเชื่อมขวางนี้จะกระทำภายใต้สุญญากาศที่ความดัน 0 มิลลิบาร์ อุณหภูมิคงที่ และระยะเวลาเหมาะสมตามการประยุกต์ใช้งาน (Ueda H. และคณะ 2002) การเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนนั้น จะทำให้หมู่เอมีนอิสระลดลง และความสามารถในการกักเก็บน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ทนต่อแรงดึงเพิ่มมากขึ้น และมีอัตราการย่อยสลายช้าลง (Pieper J.S. และคณะ 1998) ข้อดีของการเชื่อมขวางวิธีนี้ คือ ไม่มีสารเคมีตกค้างภายในโครงเลี้ยงเซลล์ แต่มีข้อเสีย คือ สามารถเชื่อมขวางโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ใกล้กันเท่านั้น ดังนั้นความสามารถในการเชื่อมขวางได้จึงมีค่าต่ำ (Friess W. 1998, Haugh M.G. และคณะ 2009)

การเชื่อมขวางโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV-irradiation)

การเชื่อมขวางวิธีนี้เป็นที่นิยมสำหรับการเชื่อมขวางของคอลลาเจนและเจลาติน เนื่องจากไม่มีการใช้ความร้อนในกระบวนการ การเชื่อมขวางโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นการเชื่อมขวางอนุมูลอิสระ (free radical) ของหมู่อะโรมาติกของกรดอะมิโน ซึ่งปริมาณหมู่อะโรมาติกของกรดอะมิโนนี้สามารถบ่งบอกถึงความหนาแน่นในการเชื่อมขวางโมเลกุลของโปรตีน (Bhat R. และ Karim A.A 2009)

2.4.2 การเชื่อมขวางทางเคมี

การเชื่อมขวางโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde, GA)

กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเคมีที่ใช้เชื่อมขวางสำหรับโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ โดยจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ในโมเลกุลกลูตารัลดีไฮด์ และหมู่เอมีน (-NH₂) ของโมเลกุลโปรตีน ข้อดีของการเชื่อมขวางวิธีนี้ คือ โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น มีสมบัติเชิงกลที่ดี มีอัตราการย่อยสลายช้าลง และโครงเลี้ยงเซลล์มีความชอบน้ำลดลง แต่มีข้อเสีย คือ กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเคมีที่มีพิษและอันตราย ดังนั้น อาจมีสารเคมีตกค้างอยู่ในวัสดุหลังเสร็จสิ้นกระบวนการ จึงมีความจำเป็นต้องกำจัดสารเคมีตกค้างออก โดยการใช้สารละลายไกลซีนชำระล้างออก เนื่องจาก

หมู่เอมีนของไกลซีนจะไปทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยา (Ma L. และคณะ 2003, และ Lee C.R. 2001)

การเชื่อมขวางโดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

EDC เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการเชื่อมขวาง เนื่องจากเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์ และส่วนใหญ่จะใช้ EDC เชื่อมขวางร่วมกับ N-hydroxysuccinimide (NHS) และบัฟเฟอร์ 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) เพื่อให้เกิดกระบวนการเชื่อมขวางที่สมบูรณ์และเสถียรที่สุด กระบวนการเชื่อมขวางจะเริ่มจาก EDC จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ในโมเลกุลของโปรตีน เกิดเป็น O-acylisourea intermediate ซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียร หลังจากนั้น NHS จะทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่เสถียรนี้ เกิดเป็น NHS-ester และจะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน (-NH₂) ในโมเลกุลของโปรตีน เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ที่มีความเสถียร และเกิดอนุพันธ์ของยูเรีย คือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea สามารถกำจัดออกได้โดยการละลายน้ำ จึงไม่มีสารเคมีตกค้างและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Pieper J.S. และคณะ 2000)

นฤนาท (2550) ได้ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ของเจลาตินและโคโตโซนด้วยวิธีการทำแห้งและเปรียบเทียบการเชื่อมขวางด้วยวิธีการต่าง ๆ คือ การเชื่อมขวางแบบแช่ และแบบอบไอของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.03, 0.06, 0.085 และ 0.12 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเชื่อมขวางแบบแช่สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืด และเชื่อมขวางแบบอบไอสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.0047 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืด สามารถเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีที่สุด และเมื่อทำการเปรียบเทียบการเชื่อมขวางทั้งหมด 4 วิธี คือ การเชื่อมขวางแบบใช้ความร้อน (DHT) การเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์แบบแช่ การเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC แบบแช่ร่วมกับความร้อน และการเชื่อมขวางด้วยวิธีอบไอด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่า การเชื่อมขวางด้วยวิธีใช้ความร้อนและการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์แบบแช่ โครงเลี้ยงเซลล์มีการหดตัวประมาณร้อยละ 5 และการเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC แบบแช่ร่วมกับความร้อน และการเชื่อมขวางด้วยวิธีอบไอด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการหดตัวมากถึงร้อยละ 40 สามารถสรุปได้ คือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย

สารละลายกลูตาไรต์ไฮด์มีระดับการเชื่อมขวางมากที่สุด และโครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติเชิงกลดีที่สุด นอกจากนี้ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางแบบใช้ความร้อนและอบไอน้ำด้วยสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ มีลักษณะสมบัติที่ไม่แตกต่างกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC

2.5 อนุภาคไมโครสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

ระบบของการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1967 Van Wezel ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ลงบนอนุภาคไมโครของไดเอทิลอะมิโนเอทิลเดกซ์แทรน (diethyl amino ethyl dextran, DEAE) และได้มีการพัฒนาระบบเลี้ยงเซลล์นี้ไปเป็นพาหะเลี้ยงเซลล์ (microcarrier cell culture) ด้วยเช่นกัน พาหะขนาดเล็ก (microcarrier) ได้ถูกนำมาใช้ในงานทางด้านชีวภาพ การแพทย์ และวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่าง ๆ มากมาย เช่น ผสมวัคซีน เอนไซม์ ฮอร์โมน หรือสารทางชีวภาพต่าง ๆ เข้ากับพาหะขนาดเล็กนี้ ซึ่งข้อดีของอนุภาคอนุภาคไมโครมีมากมาย ตัวอย่างเช่น อนุภาคมีขนาดเล็ก มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ทำให้สารสำคัญสามารถถูกกักเก็บไว้ได้ในปริมาณมาก หรือเซลล์สามารถเกาะบนอนุภาคไมโครได้มาก และเป็นการผลิตพื้นที่การเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว (monolayer cultures) รวมไปถึงปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิของไตลิง (Van W 1972) เซลล์ไตสุกร (Meignier และคณะ 1979) เซลล์ผิวหนังของไก่ (Giard และคณะ 1977 Mered และคณะ 1980) เซลล์ผิวหนังมนุษย์ (Griffiths และ Thornton 1980) และเซลล์รังไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (Crespi และ Thilly 1981) บนอนุภาคไมโครโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าการเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้แล้วการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโครสามารถควบคุมสภาวะสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงเซลล์ได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ

ในปัจจุบันได้มีการขึ้นรูปอนุภาคไมโครจากวัสดุหลายชนิดด้วยกัน เช่น เดกซ์แทรน (dextran) คอลลาเจน (collagen) เจลาติน (gelatin) พอลิสไตรีน (polystyrene) พอลิ อะคริลิลาไมด์ (polyacrylamide) และเซลลูโลส (cellulose) เป็นต้น ซึ่งเมื่อใช้วัสดุตั้งต้นที่แตกต่างกัน สมบัติต่าง ๆ ของวัสดุที่ได้ก็แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อลักษณะการแบ่งตัว และเจริญเติบโตของเซลล์ (Guanghui M.A. 2013)

คุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับอนุภาคไมโครในการเพาะเลี้ยงเซลล์

คุณสมบัติที่เหมาะสมของอนุภาคไมโคร (Guanghui M.A. 2013) สามารถสรุปได้ดังนี้

- 1) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (nontoxicity)
- 2) สนับสนุนการเกาะของเซลล์บนอนุภาค
- 3) อนุภาคควรมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ (1.03-1.05 กรัม/มิลลิลิตร)
- 4) ขนาดของอนุภาคแต่ละอนุภาคใกล้เคียงกัน
- 5) อนุภาคมีลักษณะที่จะสามารถสังเกตการณ์เกาะของเซลล์ได้
- 6) มีระบบไหลเวียนของของไหลที่ดี

ผลของประจุบนพื้นผิวและความหนาแน่นของประจุต่อการเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโคร

เซลล์สัตว์ส่วนใหญ่จะมีประจุที่พื้นผิวเป็นลบ (negative surface charge) จึงสามารถเกาะบนพื้นผิวที่มีประจุบวก (positive surface charge) ได้ดี วัสดุที่นำมาขึ้นรูปเพื่อประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงเซลล์นั้นมีประจุรวมเป็นลบด้วยเช่นกัน แต่สามารถปรับปรุงพื้นผิวโดยการเติมประจุบวกให้แก่อนุภาคนั้นได้ เพื่อใช้เป็นสะพาน (bridge) เชื่อมการเกาะระหว่างเซลล์และอนุภาค (Maroudas 1975) นอกจากนั้นแล้วความหนาแน่นของประจุมีผลต่อการเกาะของเซลล์ด้วยเช่นกัน กล่าวคือ ถ้าอนุภาคมีความหนาแน่นของประจุต่ำ เซลล์สามารถเกาะบนอนุภาคได้ และเมื่อเซลล์เริ่มเจริญเติบโตจะสามารถหลุดออกจากอนุภาคได้ ในทางกลับกัน ถ้าอนุภาคมีความหนาแน่นของประจุที่สูงเกินไป เซลล์สามารถเกาะอนุภาคได้อย่างรวดเร็ว แต่จะไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เนื่องจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) ที่มีมากเกินไประหว่างเซลล์และอนุภาคจะยับยั้งกระบวนการปลดปล่อยของสารต่าง ๆ ของเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จากงานวิจัยของ Levine และคณะ (1978) ได้ทำการขึ้นรูปอนุภาคของโพลีเอทิลอะซิเตตที่มีอนุภาคที่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากับ 2 มิลลิโมล/กรัม ซึ่งเหมาะสมต่อการเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เมื่อเพิ่มความหนาแน่นของประจุเป็น 3.5 และ 9 มิลลิโมล/กรัม พบว่าเซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยแต่ละเซลล์และวัสดุจะมีประจุที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้น แรงดึงดูดทางไฟฟ้าระหว่างเซลล์และวัสดุจะมีความแตกต่างด้วยเช่นกัน

ผลของความชอบน้ำต่อการเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโคร

เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในสภาวะที่มีความชอบน้ำ (hydrophilic) และมีงานวิจัย พบว่า ถ้าเพิ่มส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ลงบนบริเวณพื้นผิวของวัสดุ จะสามารถสนับสนุนการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้มากขึ้น (Horbett และคณะ 1985, Van W และคณะ 1987, Ikada 1994, Tamada และ Ikada 1994)

Reuveny และคณะ (1983) ได้ทำการเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ของอัลคิลแอมีน (alkylamines) ที่มีความยาวของสายโซ่ของอัลคิล (alkyl chain, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ เมื่อ $n = 2, 4, 6$ และ 8) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไตของทารกหนูแฮมเตอร์ พบว่า บิวทิลแอมีน (butylamine) และเฮกซิลแอมีน (hexylamine) มีการเจริญเติบโตของเซลล์มากที่สุด โดยความยาวของสายโซ่อัลคิลสามารถบ่งบอกถึงความไม่ชอบน้ำได้ ดังนั้น โครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีควรมีความไม่ชอบน้ำในสัดส่วนที่เหมาะสม

Verma S. และ Kumar N. (2010) ได้ขึ้นรูปอนุภาคไมโครของ PLGA ด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลาย (solvent evaporation) และได้ปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคไมโครด้วยสายโซ่โพรตีน (P-15, GTPGPQGIAGQRGVV) ขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่ได้เท่ากับ 103 ไมโครเมตร และได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ Osteoblast (MG-63) โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันคือ 2×10^5 เซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโคร PLGA และ อนุภาคไมโคร PLGA ที่ได้รับการปรับปรุงพื้นผิว พบว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชม. จำนวนเซลล์เกาะยึดเกาะบนอนุภาคมีค่าเท่ากับ 3.2×10^4 และ 7.3×10^4 เซลล์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน จำนวนเซลล์ที่เกาะบนอนุภาคไมโคร PLGA ที่ได้รับการปรับปรุงพื้นผิว มีจำนวนมากกว่าบนอนุภาคไมโคร PLGA ซึ่งค่ามุมสัมผัสที่วัดได้บน PLGA และ PLGA ที่ได้รับการปรับปรุงพื้นผิว มีค่า 65.93° และ 57.21° แสดงให้เห็นว่า วัสดุที่ได้รับการปรับปรุงพื้นผิวด้วยสายโซ่โพรตีนจะแสดงความชอบน้ำที่มากกว่า จึงสนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่า

ผลของขนาดอนุภาคต่อการเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมโคร

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องเลือกขนาดของอนุภาคให้เหมาะสมกับชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ตัวอย่างเช่น อนุภาคขนาดเล็กประมาณ 38-75 ไมโครเมตร เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบปั่นกววน (stirred tank bioreactor) อนุภาคขนาดใหญ่ประมาณ 150-300 ไมโครเมตร เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิดไดซ์ (fluidized bioreactor) เนื่องจากมีอัตราการตกตะกอนสูง (sedimentation rate)

ถ้าอนุภาคมีการกระจายตัวน้อย จะส่งผลดีต่อการปั่นกวนที่สมบูรณ์ (well mixing) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดี (Handbooks GE healthcare, 2005)

Zhu X.H. และคณะ (2006) ได้ทำการขึ้นรูปอนุภาคไมโครของ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลาย พบว่าได้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 153, 242 และ 362 ไมครอน และได้นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับโดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันคือ 2.5×10^4 เซลล์ พบว่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มีค่าเท่ากับ 29, 26 และ 21 ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคเป็นเวลา 12 วัน พบว่าอนุภาคขนาดเฉลี่ย 153 ไมครอน มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (μ) ที่สูงที่สุด คือ 8.87×10^{-3} ชม.⁻¹ และมีเวลาแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 78.09 ชม.

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโคร

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิตินั้น จะมีลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ 2 ลักษณะ คือ

- 1) เซลล์เกาะและเจริญเติบโตระหว่างอนุภาค
- 2) เซลล์เกาะและเจริญเติบโตภายในอนุภาค

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบสามมิติเป็นการจำลองระบบให้คล้ายกับการเจริญเติบโต การแสดงออก และการทำงานของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต (Hoffman R.M. 1993) การเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิตียังสามารถช่วยให้ได้จำนวนเซลล์ตามที่ต้องการและเพียงพอต่อการวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของเซลล์ การปลูกถ่ายเซลล์ หรือการฟื้นฟูร่างกายด้วยเซลล์บำบัด (cell therapy) ซึ่งเป็นการฉีดอนุภาคขนาดเล็กเข้าสู่ร่างกายโดยตรง สิ่งที่สำคัญที่สุดสำหรับการประยุกต์ใช้งานอนุภาคไมโครในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ สามารถเข้ากันได้ดีกับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) และเมื่อย่อยสลายแล้วต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (non-toxicity) (Guanghui M.A. 2013)

Sintop S. และคณะ (2014) ได้ศึกษาและพัฒนาอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอิน ด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางอนุภาคทางกายภาพด้วยความร้อน และทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งอนุภาคไมโครที่ได้มีขนาดในช่วง 300-700 ไมโครเมตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า

อนุภาคไมโครเจลาติน (G100) มีการยึดเกาะของเซลล์มากที่สุด และอนุภาคไมโครที่มีขนาดประมาณ 300 ไมโครเมตร ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร จะมีอัตราการเจริญเติบโตและเวลาการแบ่งทวีคูณสูงที่สุด ซึ่งมีค่า 6.4×10^{-3} ชั่วโมง และ 108.3 ± 0.4 ชั่วโมง ตามลำดับ

2.6 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกปลูกถ่ายลงสัตว์ทดลอง เพื่อกระตุ้นให้เกิดก้อนมะเร็ง จึงได้รวบรวมจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายลงสัตว์ทดลองและปริมาณก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.4



ตารางที่ 2.5 งานวิจัยที่ศึกษาข้อจำกัดการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในสัตว์ทดลอง โดยแสดงจำนวนเซลล์ในการปลูกถ่าย ขนาดก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นในแต่ละเวลา และสูตรที่ใช้คำนวณปริมาตรก้อนมะเร็ง

ลำดับ	จำนวนเซลล์	ขนาดก้อนมะเร็ง (mm ³)	สูตรคำนวณ tumor volume	ระยะเวลา (วัน)	อ้างอิง
1	20 × 10 ⁶	7813	ด้านที่สั้นที่สุด ² × ด้านยาว × 0.5	30	Choo, C.K., (และคณะ 2000)
		1300		15	
2	10 × 10 ⁶	2600	ด้านที่สั้นที่สุด ² × ด้านยาว × 0.52	28	Yoysungnoen Chintana, P. และคณะ (2014)
		104		14	
3	10 × 10 ⁶	236	ด้านที่สั้นที่สุด ² × ด้านยาว × 0.5	28	Mahasiripanth T. และคณะ (2012)
		200		15	
		1000		30	
4	5 × 10 ⁶	2800	ด้านที่สั้นที่สุด ² × ด้านยาว × 0.5	40	Guo, F., และคณะ (2010)
		800		15	
5	4 × 10 ⁶	1000	ด้านที่สั้นที่สุด ² × ด้านยาว × 0.52	21	Mohd S. Z. และคณะ (2016.)
		800		15	

2.7 ลิขสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

สิทธิบัตรในประเทศ

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นรูปอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอิน การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนอนุภาคไมโคร และการใช้อนุภาคไมโครเป็นพาหะของเซลล์ในการปลูกถ่ายลงสัตว์ทดลอง ยังไม่มีรายงาน

สิทธิบัตรต่างประเทศ

1. Patent : US 7282220 B1, October 16, 2007

เจ้าของสิทธิบัตร : Sumg H.w และคณะ

ชื่อสิทธิบัตร Genipin-crosslinked gelatin microspheres as drug carrier

การเตรียมอนุภาคไมโครเจลาติน ด้วยวิธีการสกัดตัวทำละลายในระบบอิมัลชัน เพื่อใช้ในระบบควบคุมการปลดปล่อยยาในระดับสัตว์ทดลอง ซึ่งทำได้โดย ละลายเจลาตินที่ได้จากหนังหมู 2.5 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายเจลาตินที่ได้ (วฎุภาคน้ำ) ในน้ำมันข้าวโพด (วฎุภาคน้ำมัน) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นกวนสารละลายผสม เป็นเวลา 20 นาที จนเกิดเป็นระบบอิมัลชัน และลดอุณหภูมิของระบบเป็น 4 องศาเซลเซียส จะเกิดเป็นอนุภาคเจลาติน และล้างน้ำมันออกจากอนุภาคด้วยอะซิโตนจำนวนมาก และทำแห้งอนุภาคเจลาติน จากนั้นทำการเชื่อมขวางอนุภาคเจลาตินด้วยสารละลายเจนิพิน ความเข้มข้น 0.44 โมลต่อลิตร หรือสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.22 โมลต่อลิตร อันตบการเชื่อมขวางอนุภาค สามารถวิเคราะห์ด้วย ninhydrin assay จากนั้นศึกษาความเข้ากันได้และความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคเจลาตินที่ทำการปลดปล่อยด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 70 ในระดับสัตว์ทดลอง โดยฉีดอนุภาคเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์หรือเจนิพินลงในหนูทดลองบริเวณกล้ามเนื้อ จากผลการศึกษาพบว่า ขนาดอนุภาคทรงกลมเจลาตินสามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดขนาด light-scattering particle-size analyzer ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 20-100 ไมโครเมตร และอันตบของปฏิกิริยาการเกิดการอักเสบภายหลังการทดสอบในหนูทดลองพบว่า อนุภาคไมโครเจลาติน

ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ทำให้เกิดการอักเสบในสัตว์ทดลองมากกว่าอนุภาคไมโครเจลลาตินที่เชื่อมขวางด้วยเจนิพิน และอนุภาคไมโครสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ

ข้อถ้อยสิทธิ์บัตร

- วิธีการขึ้นรูปอนุภาคไมโครเจลลาตินใช้วิธีการสกัดตัวทำละลายในระบบอิมัลชัน และได้อนุภาคที่มีขนาดในช่วง 20-100 ไมโครเมตร
- ระบบการนำส่งจะประยุกต์ใช้วิธีการทางปากและการฉีดเข้ากล้ามเนื้อของคนไข้

2. Patent : CN 102172498 B, Sep 7, 2011

เจ้าของสิทธิ์บัตร : Cheng-hong P. และคณะ

ชื่อสิทธิ์บัตร : Three-dimensional porous chitosan/gelatin microspheres, preparation method thereof and application in liver cell culture

การเตรียมอนุภาคไมโครของไคโตซานและเจลลาตินชนิดบี ที่ถูกเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายโซเดียมไตรฟอสเฟต และการเตรียมอนุภาคไมโครของไคโตซานและเจลลาตินชนิดเอ ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลาย EDC/NHS หลังจากทำอนุภาคแห้งแบบเยือกแข็ง อนุภาคมีขนาด 300-800 ไมโครเมตร และมีขนาดรูพรุน 50-200 ไมโครเมตร เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ตับในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ในความหนาแน่นที่สูงและเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดี เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นคือ 4.2×10^5 เซลล์ และมีจำนวนเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง เท่ากับ 2.8×10^6 เซลล์

ข้อถ้อยสิทธิ์บัตร

- การขึ้นรูปอนุภาคไมโครของไคโตซานและเจลลาตินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวล เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ

3. Patent : US 20120187591 A1, Jul 26, 2012

เจ้าของสิทธิ์บัตร : Wang X. และ Kaplan D.L.

ชื่อสิทธิ์บัตร : Silk nanospheres and microspheres and methods of making same

การเตรียมอนุภาคนาโนและอนุภาคไมโครของไฟโบรอินและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ด้วยวิธีการแยกวัฏภาคโดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อใช้ในการนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ และศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อขนาด และรูปร่างของอนุภาคที่ได้ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้

เป็นต้น การขึ้นรูปด้วยวิธีการแยกแก้วภาคจะได้เป็นฟิล์มผสมของไฟโบรอินและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ จากนั้นนำฟิล์มพอลิเมอร์ผสมไปล้างน้ำ พร้อมกับให้แรงทางกายภาพ จะทำให้ฟิล์มละลายกลายเป็นอนุภาคไมโครและอนุภาคนาโนของพอลิเมอร์ผสม ซึ่งอนุภาคไมโครที่ได้มีการกระจายตัวของขนาดในช่วงแคบ ซึ่งมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 5-10 ไมโครเมตร และ อนุภาคนาโนที่ได้มีขนาดประมาณ 330 นาโนเมตร และมีดัชนีการกระจายตัวของขนาดต่ำกว่า 0.4

ข้อถือสิทธิบัตร

วิธีการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินที่มีช่วงขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร และ ไมโครเมตร ประกอบด้วย

- การผสมสารละลายไฟโบรอินด้วยสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์
- กระบวนการทำแห้งสารละลายให้เกิดเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ผสม แล้วนำฟิล์มที่ได้ไปละลายน้ำ
- ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินที่ใช้น้อยกว่าร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนความเข้มข้นของไฟโบรอินต่อพอลิไวนิลแอลกอฮอล์อยู่ในช่วง 1:1 ถึง 1:4 โดยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยอยู่ในช่วง 30,000-124,000 ดาลตัน
- อนุภาคของพอลิเมอร์จะถูกกรองและปั่นเหวี่ยง เพื่อให้ได้อนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กในช่วง 330-500 นาโนเมตร ถึงช่วง 1-5 ไมโครเมตร

4. Patent : WO 2013100109 A1, May 15, 2013

เจ้าของสิทธิบัตร : Rui G. และคณะ

ชื่อสิทธิบัตร : Silk fibroin composite scaffold loaded with vancomycin/gelatin microspheres and preparation method of silk fibroin composite scaffold

ยาแวนโคไมซินปริมาณ 10-50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครของ เจลาติน ซึ่งถูกเตรียมด้วยวิธีอีมีลชัน และเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตาร์ดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยมวล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำแห้งอนุภาคด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นผสมอนุภาคในสารละลายไฟโบรอินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2-10 โดยน้ำหนัก และทำแห้งแบบเยือกแข็ง จะได้โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีอนุภาคไมโครเจลาตินที่กักเก็บยาแวนโคไมซินอยู่ภายใน โดยมีความหนาแน่นของรูพรุนบนโครงเลี้ยงเซลล์ร้อยละ 75-95 และขนาดรูพรุน 50-200 ไมโครเมตร ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์สามารถปลดปล่อยยาได้นานและมีประสิทธิภาพ

ข้อถ้อยสิทธิบัตร

- ยาแวนโคไมซินปริมาณ 10-50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครของเจลตินที่มีขนาด 50-300 ไมครอน
- กระบวนการขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ของไฟโบรอินที่มีอนุภาคไมโครประกอบ และประยุกต์ใช้ในการปลดปล่อยยาแวนโคไมซิน

2.8 ผลกระทบทางการค้า

1. โครงสร้างเซลล์สามมิติของบริษัท AMS Biotechnology (Europe) Limited

โครงสร้างเซลล์สามมิติจากพอลิสไตรีน (polystyrene) ในงานเพาะเลี้ยงแบบหลุม โดยโครงสร้างเซลล์มีความหนาแน่นของรูพรุนมากกว่าร้อยละ 90 และขนาดรูพรุนประมาณ 36-40 ไมครอน และความหนาของโครงสร้างเซลล์ประมาณ 200 ไมครอน และได้มีการทดสอบโครงสร้างเซลล์สามมิติเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงสองมิติจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น เมื่อทำการทดสอบเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์ตับ (primary hepatocyte) ในระบบการเพาะเลี้ยงสองมิติและสามมิติในโครงสร้างเซลล์พอลิสไตรีน พบว่ามีจำนวนเซลล์ตายเกิดขึ้นในระบบเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติน้อยกว่าร้อยละ 10-50 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยจำนวนเริ่มต้นต่าง ๆ และเมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารแอลบูมินของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบสองและสามมิติ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบสามมิติ จะมีการผลิตสารแอลบูมินที่สูงกว่า 4-5 เท่า เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิตินั้น จะสนับสนุนการเกาะของเซลล์และกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ ได้ดีกว่า ระบบเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างงานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติของบริษัท AMS Biotechnology (Europe) Limited (<http://www.amsbio.com/alvetex.aspx> สืบค้นวันที่ 28 มิถุนายน 2559)

2. โคร่งเลี้ยงเซลล์ทรงกลมขนาดไมครอนของบริษัท Advanced BioMatrix, Inc. (USA)

โคร่งเลี้ยงเซลล์อนุภาคทรงกลมจะถูกเคลือบพื้นผิวไว้ด้วย คอลลาเจน Type I ของมนุษย์ ที่มาจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human fibroblast) อนุภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125-212 ไมโครเมตร และมีพื้นที่ผิว 360 ซม²/กรัม และที่ผ่านมาได้มีการทดสอบกับเซลล์ hMSC มาแล้ว และเหมาะกับการเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (Suspension cell culture) โดยขนาดผลิตภัณฑ์ 10 กรัม ราคา €225.50 (ประมาณ 8,700 บาท)



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างโคร่งเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติของบริษัท Advanced BioMatrix, Inc. (<https://www.advancedbiomatrix.com> สืบค้นวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2561)

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 ไหมไทย (พันธุ์เหลืองโพโรจัน, ศูนย์หม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ)

3.1.2 เจลาตินชนิดเอ (pl = 9, Nitta Gelatin Inc, Tokyo, Japan, lot # 160328)

3.1.3 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr; Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Germany, lot # STBF0310V)

3.1.4 น้ำมันถั่วเหลือง (Thanakorn Vegetable Oil Products Co.,Ltd, Thailand)

3.1.5 อะซิโตน (Acetone, Qrec , New Zealand, cat #67-64-1)

3.1.6 กลูตารัลดีไฮด์ (25%, Fluka, Buchs, Germany, lot # LM06291311)

3.1.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl 36.5-38%, J.T. Baker, USA, cat # 7647010)

3.1.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Ajax Finechem, Pty, Ltd, Australia, lot # J731401R0X)

3.1.9 ไกลซีน (Sigma-Aldrich, Germany, cat # 1306251661)

3.1.11 เอทานอล (99.7-100%, VWR International Ltd, England, cat # E702512501)

3.1.12 บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS, pH 7.3-7.5, Bio basic Inc., Canada, lot # J910R0G)

3.1.13 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, pH 5.8)

3.1.14 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide (DMSO), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2 = 78.13 \text{ g/mol}$, Riedel-de Haen®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, USA, lot # 1411057)

3.1.15 Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with EDTA, Hyclone, Thermo Scientific, USA, cat # SH30042.02)

3.1.16 Minimum Essential Medium powder (MEM; HyClone® Powdered Tissue Culture Media, Thermo Scientific Supplier: Thermo Scientific, USA, cat # SH30008.02)

3.1.17 Fetal bovine serum (FBS; HyClone, Thermo Scientific, USA, cat # SV30160.03)

3.1.18 Penicillin-Streptomycin Solution (Pen/Strep, Hyclone, Australia, cat # SV30010)

3.1.19 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, USA, lot # 1661374)

3.1.20 Trypan blue Stain 0.4% (Gibco, USA, cat # SV30084.01)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 320R, Hettich, Germany)

3.2.2 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (CHRIST®, Germany)

3.2.3 UV-Vis spectrophotometer (UV -2450, Shimudzu, Japan)

3.2.4 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope Nikon, Eclipse 80i, Japan)

3.2.5 กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan)

3.2.6 เครื่อง microplate reader (FLUOstar, Omega, BGM LABTECH, Germany)

3.2.7 ตู้เย็น (NR-BU343, Panasonic, Thailand)

3.2.8 ตู้เย็น -20 °C (Sandenintercool, Thailand)

3.2.9 ตู้เย็น -40 °C (Haier, China)

3.2.10 เครื่อง sonicated bath (CREST, Malaysia)

3.2.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter, professional meter, pp-50, Germany)

3.2.12 Hotplate Stirrer (Cimarac 3, Thermolyne, USA)

3.2.13 ขวดแก้วกันกลม ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (Becthai, Thailand)

3.2.14 Overhead stirrer (Model IKA Labortechnik, Germany)

3.2.15 Homogenizer (Model IKA Labortechnik, Germany)

3.2.16 เครื่อง Zetasizer (650, Malvern, England)

3.2.17 ใบพัด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร

3.2.18 Autopipette (Eppendorf, Germany)

3.2.19 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (1235 PC, Shel-Lab, USA)

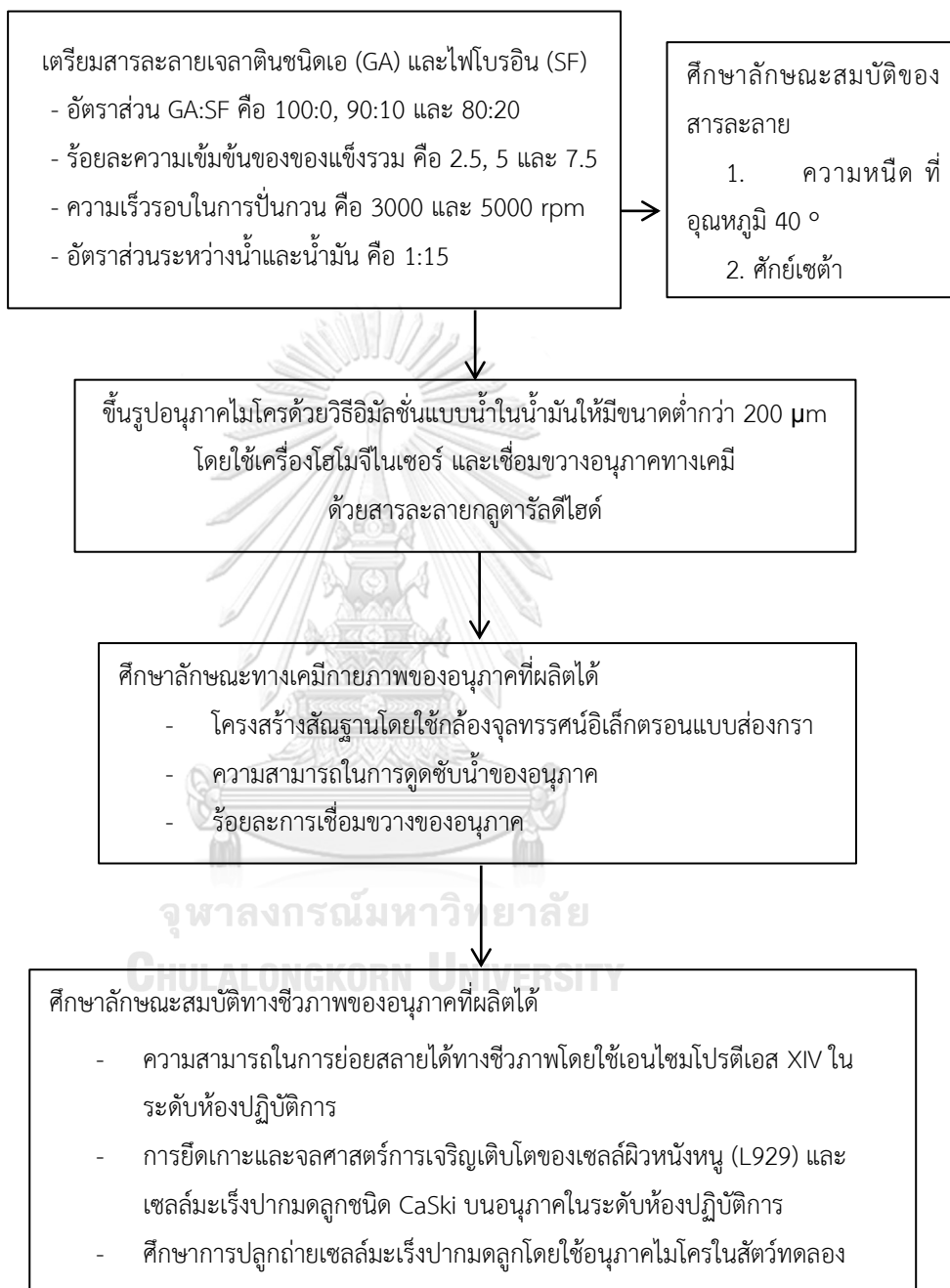
3.2.20 ตะแกรงคัดแยกขนาด 32, 75, 100 ไมครอน (Sieve OSAKA IIDA, Co. Ltd, Japan)

3.2.21 เข็มฉีดยา ชนิด U-100 INSULIN (1 ml, 29Gx1/2”, TERUMO, New Jersey, USA)



3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยทั้งโครงการแสดงได้ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอและสารละลายไฟโบรอินไหมไทย

3.4.1.1 สารละลายเจลาตินชนิดเอ

การเตรียมสารละลายเจลาติน สามารถทำได้โดยแช่เจลาตินชนิดเอ (pl = 9, Nitta Gelatin Inc, Tokyo, Japan) ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สายโซ่โมเลกุลของเจลาตินบวมตัวอย่างเต็มที่ จากนั้นปั่นกวนสารละลายพร้อมกับให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารละลายเจลาตินที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.1.2 สารละลายไฟโบรอินไหมไทย

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (ดัดแปลงจากวิธีของ Kim U.J และคณะ 2005 และ Ratanavaraporn J และคณะ 2013) ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยนำเส้นใยไฟโบรอินของไหมไทย สายพันธุ์เหลืองไฟโรจน์ จำนวน 8 กรัม ละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร จำนวน 32 กรัม (ในอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อลิเทียมโบรไมด์เท่ากับ 1:4) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดไอออนของลิเทียมโบรไมด์ออกโดยการนำสารละลายที่ได้มาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 15 นาที ในชั่วโมงแรก หลังจากนั้นวัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำปราศจากไอออน และเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนที่ใช้ในการไดอะไลซ์จนกว่าค่าการนำไฟฟ้าของน้ำจะเท่ากับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำปราศจากไอออนก่อนการไดอะไลซ์ สารละลายไฟโบรอินไหมไทยหลังจากการไดอะไลซ์ จะถูกนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนต่าง ๆ สารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 6-7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก หลังจากนั้น เก็บสารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ได้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารละลาย

ก. ค่าศักย์เซต้า (zeta potential) ของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

ค่าศักย์เซต้าของสารละลายสามารถแสดงถึงค่าประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวของอนุภาคที่อยู่ในสารละลาย ซึ่งขึ้นกับค่าความเป็นกรดต่าง ค่าการนำไฟฟ้า ความเข้มข้นและประเภทของไอออน และปริมาณของอนุภาคที่ใส่เข้าไปเพื่อสัมผัสกับโมเลกุล เช่น สารลดแรงตึงผิวเป็นต้น โดยอาศัยหลักการ

กระเจิงแสงของอนุภาคแบบพลวัต (Dynamic Light Scattering Technique) ที่เคลื่อนที่แบบ Brownian motion ซึ่งจะวัด backscattered light ที่มุม 173 องศา แล้วหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เคลื่อนที่ (Electric mobility) ซึ่งอนุภาคในของไหลเคลื่อนที่ได้ เมื่อให้สนามไฟฟ้าแก่ของผสม จะทำให้ประจุไฟฟ้าใน electrical double layer เคลื่อนที่ไปยังขั้วอิเล็กโทรดที่มีประจุตรงข้าม ซึ่งโมเลกุลต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่ต่างกัน ทำให้สามารถวัดความเร็วที่อนุภาคเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ และแปลงเป็นค่าศักย์เซต้า (Brian J. และคณะ 2004) ซึ่งการทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้โดย นำสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักระหว่างเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทย เท่ากับ 100:0, 90:10 และ 80:20 ที่มีความเข้มข้นรวมร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.8 (n=4) มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง zeta sizer (650, Malvern, United kingdom)

ข. ค่าความหนืด (apparent viscosity)

ความหนืด คือ ความเสียดทานที่เกิดขึ้นภายในของไหล แรงเสียดทานที่ต้านการเคลื่อนที่ของของไหล จะเรียกว่า แรงหนืด (Viscous force) ของไหลที่มีความหนืดมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าของไหลที่มีความหนืดน้อย ซึ่งความหนืดของสารละลายผสมจะมีผลต่อขนาดอนุภาคที่ผลิตได้ สามารถวัดความหนืดได้ด้วยเครื่อง Sine-Wave Vibro Viscometer ที่อาศัยวิธีการวัดแบบ Tuning-fork Vibration ที่ความถี่ 30 เฮิร์ตซ์ การทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้โดย นำสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 2.5, 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนผสมระหว่างเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทยคือ 100:0, 90:10 และ 80:20 (n=4) มาวิเคราะห์ค่าความหนืดด้วยเครื่อง viscometer (sv-10 vibro viscometer, A&D company Ltd., Japan)

3.4.3 การขึ้นรูปอนุภาคไมโครของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย

อนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยถูกเตรียมได้ด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (ดัดแปลงจากวิธีของ Ratanavaraporn J และ คณะ 2013 และ Li J.K และคณะ 1997) โดยใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ซึ่งประกอบด้วยวัฏภาคน้ำ คือ สารละลายผสมของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย และวัฏภาคน้ำมัน คือ น้ำมันถั่วเหลือง จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของของแข็งรวมเท่ากับ 2.5, 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักระหว่างเจลาตินต่อ

ไฟโบรอินไหมไทย เท่ากับ 100:0, 90:10 และ 80:20 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างวัตถุน้ำต่อน้ำมัน เท่ากับ 1 ต่อ 15 และ 1 ต่อ 30 ซึ่งวัตถุน้ำมันถูกเตรียมโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้น หยตวัตถุน้ำที่เตรียมไว้ลงในวัตถุน้ำมัน และทำการปั่นกวนสารละลายด้วย เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้วัตถุน้ำกระจายตัวอยู่ในวัตถุน้ำมันในลักษณะ อิมัลชันที่คงตัว จากนั้นลดอุณหภูมิของระบบเป็น 4 องศาเซลเซียส อย่างรวดเร็วโดยใช้น้ำแข็งอ้อม ภาชนะที่ใช้ในการขึ้นรูป ปั่นกวนต่อด้วยโฮโมจีไนเซอร์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมอะซิโตนเย็น เพื่อล้างน้ำมันที่อยู่รอบผิวอนุภาค ปั่นกวนต่อเป็นเวลา 10 นาที และแยกอนุภาคออกจากสารละลาย โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยอะซิโตนเย็นพร้อมกับกำจัดน้ำมันส่วนเกินออกจากอนุภาค จำนวน 5-6 ครั้ง และแยกขนาดอนุภาคด้วยตะแกรงคัดขนาด ที่มีขนาดในช่วงที่ใหญ่กว่า 100, 75-100 และ 32-75 ไมโคร จากนั้นชั่งน้ำหนักอนุภาคเพื่อคำนวณหาร้อยละผลได้ของอนุภาคก่อนการเชื่อมขวาง และเพื่อให้ อนุภาคได้มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น อนุภาคจะถูกเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Tabata Y และคณะ 1998 และ Ratanavaraporn J และ คณะ 2013) โดยนำ อนุภาคไมโคร 1 กรัม แช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก ใน สารละลายผสมของน้ำและอะซิโตนที่มีอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เชื่อมขวางอนุภาคในที่มีด อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นล้างอนุภาคด้วย สารละลายไกลซินความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เพื่อกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออก และล้างอนุภาคด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดไกลซินและ กลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้าง ออก จากนั้น นำอนุภาคที่ได้มาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการคัดแยกขนาดอนุภาคภายหลังการเชื่อมขวางโดยใช้ตะแกรงคัดแยก ขนาดที่มีขนาดในช่วงที่ใหญ่กว่า 100, 75-100, และ 32-75 ไมโครเมตร จากนั้นชั่งน้ำหนักอนุภาค เพื่อคำนวณหาร้อยละผลได้ของอนุภาคไมโครภายหลังการเชื่อมขวาง

3.4.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของอนุภาคไมครอน

ก. โครงสร้างสัณฐาน (morphology)

การศึกษาโครงสร้างสัณฐานของอนุภาคไมโครที่ผลิตได้สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM, JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan) โดยนำอนุภาคไมโครแห้งไปติดบนแท่นเตรียมชิ้นงาน จากนั้นเคลือบทองบน

อนุภาคเพื่อให้เกิดการนำไฟฟ้า และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยายต่าง ๆ นอกจากนี้ การศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคไมโครแบบเปียก (สภาวะที่ใช้งานจริง) สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon, Eclipse 80i, Japan) โดยนำอนุภาคไมโครที่แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 4 และ 10 เท่า บันทึกภาพและวิเคราะห์ขนาดอนุภาคไมโครที่ได้ด้วยโปรแกรม Image J (n=100)

ข. อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาค

อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครสามารถวิเคราะห์ได้โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค เมื่อแช่ในสารละลายอะซิโตน (W_d) และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคเมื่อแช่ในสารน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (W_s) (n=100) จากนั้น คำนวณหาอัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาค ได้จากสมการ

$$\text{อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาค} = \frac{W_s}{W_d} \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ W_d = เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคเมื่อแช่ในสารละลายอะซิโตน

W_s = เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคเมื่อแช่ในสารน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค. ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาค

ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาควิเคราะห์จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค นินไฮดริน (Clercq, K.D. และคณะ 2016) วิธีการนี้เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเชื่อมขวางโมเลกุลของโปรตีน โดยกรดอะมิโนจะทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินและเกิดเป็นสารประกอบไฮดรินแดนดิน อัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับไฮดรินแดนดินและนินไฮดริน เกิดเป็นสารประกอบที่ให้สีน้ำเงินม่วง การวิเคราะห์ทำได้โดย เตรียมสารละลายผสมของกรดซिटริกความเข้มข้นร้อยละ 4.20 โดยน้ำหนัก โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.60 โดยน้ำหนัก และทินไดคลอไรด์ไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.16 โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากไอออน และเตรียมสารละลายนินไฮดรินความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ในเมทอกซีเอทานอล หลังจากนั้นผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดในอัตราส่วน 1 : 1 และปั่นกวนในที่มืดเป็นเวลา 45 นาที เติมสารละลายผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอนุภาคขนาดไมครอน

5 มิลลิกรัม ที่ถูกแช่ในน้ำปราศจากไอออน 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติมไอโซโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และนำผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไกลซีน ซึ่งมีหมู่ $-NH_2$ จำนวน 1 หมู่ ต่อ 1 โมล ($n=4$) จากนั้น คำนวณร้อยละการเชื่อมขวางได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละการเชื่อมขวาง} = \frac{(-NH_2)_i - (-NH_2)_f}{(-NH_2)_i} \quad (4)$$

เมื่อ $(-NH_2)_i$ = ปริมาณหมู่อะมิโนที่พบก่อนการเชื่อมขวาง

$(-NH_2)_f$ = ปริมาณหมู่อะมิโนที่พบหลังการเชื่อมขวาง

3.4.5 การศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคไมโครที่ผลิตได้

ก. ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสและโปรตีเอส XIV ในระดับห้องปฏิบัติการ

ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคสามารถทดสอบได้ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส XIV เอนไซม์ที่เลือกมาทำการศึกษามีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยได้ ซึ่งทำได้โดยแช่อนุภาคไมโครในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV (Protease XIV = 3.5 หน่วย/มิลลิกรัม, Sigma-Aldrich, เยอรมัน) ความเข้มข้น 0.5 หน่วยต่อมิลลิกรัม ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 (Sungkhaphan P. และคณะ 2017) และเติมสารละลายโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยจะเปลี่ยนเอนไซม์ทุก ๆ 2 วัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บผลตามช่วงเวลาครบ 10 วัน จากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งของอนุภาคภายหลังการทดสอบการย่อยสลาย ($n=4$) จากนั้นคำนวณหาร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาค ได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad (6)$$

เมื่อ W_i = น้ำหนักแห้งของอนุภาคไมโครก่อนแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส

W_f = น้ำหนักแห้งของอนุภาคไมโครหลังแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส

ข. การยึดเกาะ (attachment) และอัตราการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ผิวหนังหนู (L929) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki บนอนุภาคทรงกลมในระดับห้องปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนู ชนิด L929 จะเพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์แบบชั้นเดียว (monolayer) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นองค์ประกอบ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่มีความดันบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimal Essential Medium (MEM) ที่ประกอบด้วย Fetal Bovine Serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และเติมสารป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด Penicillin – Streptomycin ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร และควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่มีความดันบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนที่เพียงพอต่อการทดลองต่อไป

การศึกษาปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะรวมถึงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ สามารถทำได้โดยหาความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคทรงกลม ซึ่งจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใช้มีค่าเท่ากับ $0.2 \times 10^5 - 3.2 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัมอนุภาค ทำการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 3 มิลลิกรัม ใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิตร (1.8 ml, SPL Life Sciences Co., Ltd Korea) ที่สภาวะความดันบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker 5170, RNew Brunswick Galaxy, USA) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นประเมินจำนวนเซลล์ที่สามารถยึดเกาะบนอนุภาคด้วยเทคนิค MTT assay โดยสาร MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) มีโครงสร้างเป็นวงแหวนสี่เหลี่ยมของเกลือ Tetrazolium จะถูกเปลี่ยนเป็นผลึก Formazan ซึ่งมีสีม่วง เมื่อถูกทำลายด้วยเอนไซม์ Dehydrogenase ซึ่งอยู่ภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิต แต่ผลึกสีม่วงยังไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) และวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง micro plate

reader เพื่อประเมินจลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคไมโครภายในระยะเวลา 14 วัน โดยนับจำนวนเซลล์และคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ , specific growth rate) และเวลาแบ่งตัวทีคูณ (t_d , population doubling time) ได้ดังสมการ
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ , specific growth rate) ;

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (7)$$

เวลาแบ่งตัวทีคูณ (t_d , population doubling time) ;

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

เมื่อ X_1 = จำนวนเซลล์เมื่อเวลา t_1

X_2 = จำนวนเซลล์เมื่อเวลา t_2

3.4.6 ศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปอกมดลูกที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครในระดับ สัตว์ทดลอง

การวิจัยในสัตว์ทดลองจะดำเนินการตามมาตรฐานการดูแลและใช้สัตว์ทดลอง Home office guideline on the scientific use of animal (Scientific procedure) Act 1986 โดยมีการขออนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขทะเบียนรับโครงการวิจัยเลขที่ ศสท.003/2561 ซึ่งอยู่ในขั้นตอนพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการ

หนูชนิดไมซ์สายพันธุ์ BALB/c น้ำหนัก 20-25 กรัม จากบริษัท Nomura Siam International Co., Ltd ถูกเลี้ยงตามแนวปฏิบัติของ Home office guideline on scientific use of animal (scientific procedures) Act 1986 และควบคุมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 60 ± 10 วงจรการให้แสง 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด มีการถ่ายเทอากาศเพียงพอ ดูแลให้อาหารและน้ำที่อาคารพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.6.1 ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปวกมดลูกลงในสัตว์ทดลอง

ดำเนินการทดลองโดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Lertworapreecha, M. แล คณะ (2009) และ Yoysungnoen-Chintana, P. แล คณะ (2014)

การศึกษาลักษณะการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปวกมดลูกบริเวณใต้ผิวหนังส่วนหลังหนู (dorsal skin-fold chamber) สามารถแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปวกมดลูกชนิด CaSki โดยตรง จำนวน 2×10^6 เซลล์ ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 2 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปวกมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโคร จำนวน 2×10^6 เซลล์ ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 3 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปวกมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโคร จำนวน 1×10^6 เซลล์ ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 4 การปลูกถ่ายอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน 6 มิลลิกรัม ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

3.4.6.2 วิเคราะห์ปริมาณก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นและความหนาแน่นของหลอดเลือดเกิดใหม่

การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปวกมดลูกในแต่ละกลุ่มการทดลอง สามารถวิเคราะห์ก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นได้โดยวัดขนาดก้อนมะเร็งด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ทุก ๆ 4-5 วัน จากนั้นคำนวณหาปริมาณก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้น ได้ตั้งสมการที่ 6 และทำการวัดปริมาณหลอดเลือดเกิดใหม่ (Neocapillary density; NCD) ด้วยวิธี Intravital fluorescence microscopy เมื่อปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปวกมดลูกครบ 30 วัน ทำได้โดยให้ยาสลบ (pentobarbital sodium) ในอัตราส่วนโดยปริมาตรของยาสลบต่อน้ำเกลือ (normal saline) คือ 1:3 เป็นปริมาตร 0.15 มิลลิตร/หนู 1 ตัว จากนั้นฉีดสีฟลูออเรสเซิน (fluorescein isothiocyanate; FITC) เข้าทางหลอดเลือดดำ (jugular vein) หลังจากนั้นบันทึกภาพหลอดเลือดฝอย (microvascular) บริเวณรอบก้อนมะเร็งเรื้องปวกมดลูกด้วยกล้องคอนโฟคอล (confocal microscope) จากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นของหลอดเลือดเกิดใหม่ด้วยโปรแกรม NIS elements (Reynolds M.M 1989)

$$\text{ปริมาตรก้อนมะเร็ง} = a^2 \times b \times 0.52 \quad (9)$$

โดย a = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่สั้นที่สุดของก้อนมะเร็ง

b = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ยาวที่สุดของก้อนมะเร็ง

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยนำมาหาค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p -value < 0.05)



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ผลิตอนุภาคขนาดไมครอนที่มีองค์ประกอบของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ 100/0, 90/10 และ 80/20 และความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 2.5 และ 5 โดยน้ำหนัก ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ 80/20 จากนั้นทำการเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร และศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของอนุภาคไมครอน และศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติบนอนุภาคไมครอนที่ผลิตได้กับเซลล์ผิวหนังหนู (L929) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Caski) ในระดับห้องปฏิบัติการ และศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในสัตว์ทดลองเมื่อใช้อนุภาคขนาดไมครอนเป็นพาหะของเซลล์ (cells carrier)

4.1 สมบัติของสารละลายและอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

4.1.1 สมบัติของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

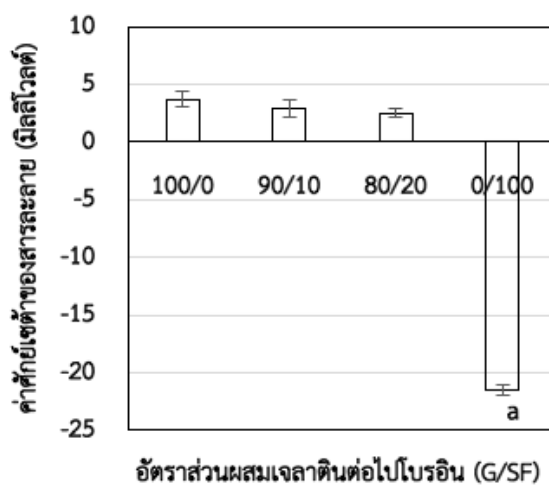
ก. ศักย์เซต้า (Zeta potential)

ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) คือความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างประจุไฟฟ้าในชั้นของสารละลายและประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวของอนุภาค โดยค่าศักย์ไฟฟ้าสามารถบอกถึงความเสถียรของการกระจายตัวของอนุภาคได้ หากค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นค่าบวกหรือลบมาก จะเกิดการหักล้างของประจุต่อกัน ดังนั้นอนุภาคมีความเสถียรในการกระจายตัวสูง และถ้าค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นค่าบวกหรือลบน้อย ๆ จะไม่มีแรงป้องกันอนุภาคอื่นที่เข้ามา ดังนั้นอนุภาคเกิดการรวมกลุ่มกันหรือไม่เสถียรในการกระจายตัว ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าศักย์เซต้าคือ ค่าพีเอช และค่าการนำไฟฟ้าของตัวกลางซึ่งขึ้นกับความเข้มข้น ประเภทไอออน และปริมาณของอนุภาคที่มีในระบบ (Hunter R และคณะ (1981))

เมื่อพิจารณาค่าศักย์เซต้าของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากไอออน ที่พีเอช เท่ากับ 5.8 ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่า สารละลายเจลาตินแสดงประจุบวกซึ่งเป็นลักษณะของเจลาตินชนิดเอ และมีค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ $+3.71 \pm 0.68$ มิลลิโวลต์ และสารละลายไฟโบรอินแสดงประจุลบค่อนข้างสูง ซึ่งมีค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -21.53 ± 0.47

มิลลิโวลต์ เนื่องจากสารละลายเจลาตินที่ใช้ในการวิเคราะห์มีค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) เท่ากับ 9 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าพีเอชของสารละลายเจลาตินที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ค่าศักย์ไฟฟ้า ส่งผลให้สารละลายเจลาตินแสดงประจุบวก ในขณะที่เดียวกันสารละลายไฟโบรอินมีค่าไอโซอิเล็กทริก ประมาณ 3.8-4.2 (Malay O. และคณะ (2007)) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าพีเอชของสารละลายไฟโบรอินที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ค่าศักย์ไฟฟ้า ส่งผลให้สารละลายไฟโบรอินแสดงประจุลบ (ที่พีเอชเท่ากับ 5.8)

นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารละลายไฟโบรอินเท่ากับร้อยละ 10 และ 20 โดยน้ำหนัก จะพบว่า สารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินจะมีค่าประจุมรวมเป็นบวกน้อยลง คือ $+2.89 \pm 0.77$ และ $+2.50 \pm 0.36$ มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Sinthop S. และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินที่อัตราส่วนการผสมต่าง ๆ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 0-100 โดยน้ำหนัก พบว่า สารละลายเจลาตินมีค่าศักย์เซต้าเป็นบวก ซึ่งเท่ากับ $+2.96 \pm 0.21$ มิลลิโวลต์ เมื่อทำการเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายไฟโบรอินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมที่ได้จะมีค่า -0.45 ± 0.30 มิลลิโวลต์ ซึ่งค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมจะแสดงประจุลบมากขึ้น เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินในระบบเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินจะมีค่าเป็นลบมากที่สุด ซึ่งเท่ากับ -3.07 ± 0.32 มิลลิโวลต์



รูปที่ 4.1 ค่าศึกย์เซต้าของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทย ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ที่พีเอช 5.8

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบค่าศึกย์เซต้าของสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนัก เท่ากัน แต่อัตราส่วนมี G/SF ต่าง ๆ)

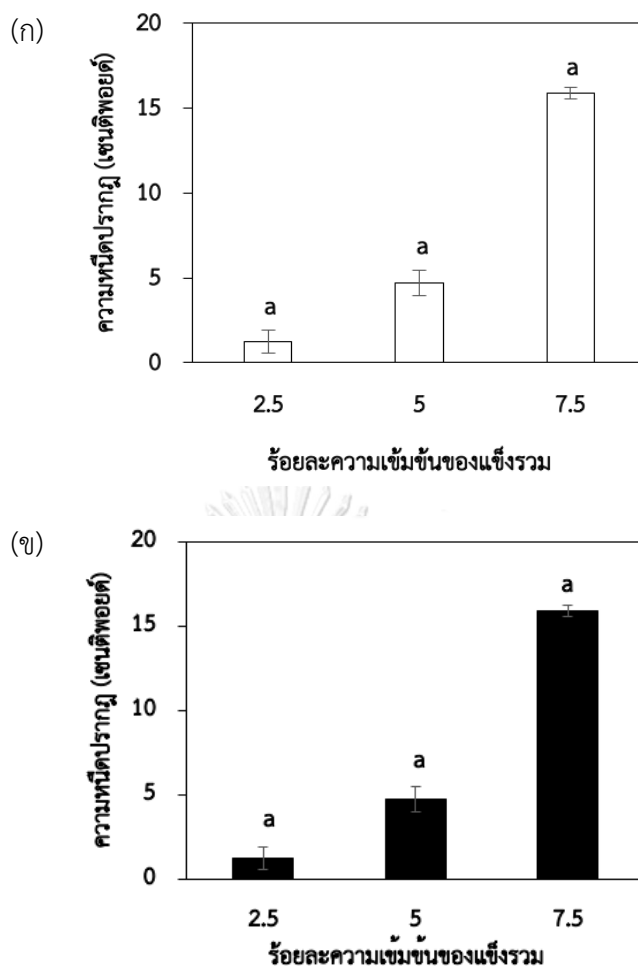
ข. ความหนืด (Viscosity)

ความหนืด เป็นสมบัติของของเหลวที่บอกถึงความต้านทานการไหล โดยความหนืดของสารละลายแต่ละชนิดจะขึ้นกับ ความเข้มข้น อุณหภูมิ และน้ำหนักโมเลกุลของสารพอลิเมอร์ โดยในการทดลองนี้ได้ทำการวิเคราะห์ความหนืดของสารละลายโดยใช้เครื่องวัดความหนืดแบบสั่นสะเทือน (Vibro viscometer) ซึ่งอาศัยหลักการสั่นสะเทือนของของไหลส่งผ่านไฟฟ้าแม่เหล็กที่แช่ในสารละลายความถี่ 30 เฮิร์ต

เมื่อพิจารณาค่าความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอิน ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก และมีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอิน 100/0, 90/10 และ 80/20 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่ามีค่าความหนืดเท่ากับ 13.44 ± 0.04 , 1.47 ± 0.01 และ 15.89 ± 0.01 เซนติพอยด์ ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอิน สารละลายผสมจะมีความหนืดมากขึ้น เนื่องจากสารละลายไฟโบรอินมีความหนืดมากกว่าสารละลายเจลาติน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Sinthop S. และคณะ (2014) ได้ศึกษาความหนืดของสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าความหนืดของสารละลายที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 4.42 ± 0.04 และ 5.22 ± 0.05 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า

สารละลายไฟโบรอินมีความหนืดมากกว่าสารละลายเจลาติน ดังนั้นที่ความเข้มข้นของสารละลายที่เท่ากัน การเพิ่มสัดส่วนของสารละลายไฟโบรอินในระบบ ส่งผลให้สารละลายผสมมีความหนืดเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินมีค่าประมาณ 390 กิโลดาลตัน (Kaewprasit K. และคณะ 2014) ซึ่งมากกว่าน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินชนิดเอทีใช้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 100.6 กิโลดาลตัน และเมื่อพิจารณาความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินในอัตราส่วนผสมเท่ากับ 80/20 แต่มีความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกันคือ 2.5, 5 และ 7.5 โดยน้ำหนัก พบว่าความหนืดมีค่าเท่ากับ 1.24 ± 0.03 , 4.71 ± 0.01 และ 15.89 ± 0.01 เซนติพอยด์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายผสม ความหนืดที่ได้จะมีค่าเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Somvipart S. และคณะ (2013) ได้ศึกษาความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสม 50/50 ที่ความเข้มข้นของแข็งรวม 5-15 โดยน้ำหนัก พบว่า ความหนืดมีค่าประมาณ 40-290 เซนติพอยด์ และจากรายงานของ Das S. และคณะ (2013) ได้ศึกษาความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอิน ที่ความเข้มข้นของเจลาตินร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก และไฟโบรอินเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าความหนืดมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินเนื่องจากสารละลายผสมมีความเข้มข้นของแข็งในส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความหนืดของสารละลายผสมเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเจลาตินที่ใช้

ทั้งนี้ ความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอิน ที่อัตราส่วนการผสม และความเข้มข้น ต่าง ๆ จะมีผลต่อลักษณะอนุภาคที่ผลิตได้ด้วยเทคนิคอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน ซึ่งจะกล่าวถึงในลำดับถัดไป



รูปที่ 4.2 ค่าความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย (ก) ที่อัตราส่วนเจลาตินต่อไฟโบรอินคงที่ 80/20 (ข) ที่อัตราส่วน G/SF ต่างๆ (7.5 %โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบความหนืดของสารละลายที่มีอัตราส่วน G80S/F20 เดียวกัน ที่ร้อยละความเข้มข้นของเชิงรวมแตกต่างกัน b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบความหนืดของสารละลายที่มีร้อยละความเข้มข้นของเชิงรวม 7.5%โดยน้ำหนัก ที่อัตราส่วนแตกต่างกัน)

4.1.2 สมบัติของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

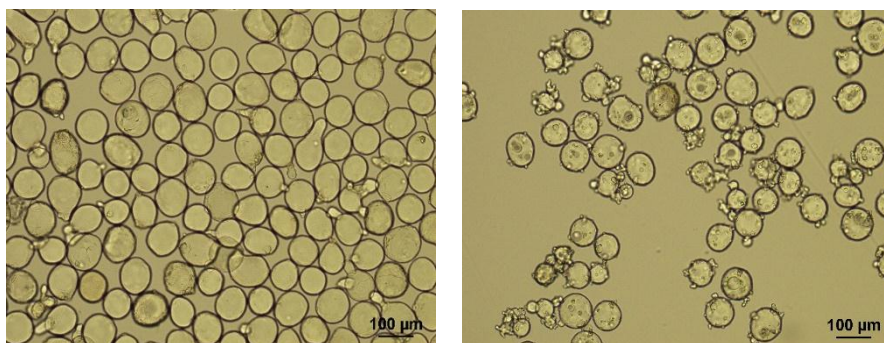
ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนให้มีขนาดอนุภาคต่ำกว่า 100 ไมครอน เป็นพาหะขนส่งเซลล์ (cell carriers) โดยอนุภาคที่ใช้จะต้องสามารถฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ขนาด 27G (0.41x12.7 มิลลิเมตร) ได้เป็นอย่างดี ซึ่งพบว่าอนุภาคขนาดในช่วง 32-75 ไมครอน สามารถฉีดผ่านหัวเข็มฉีดขนาดดังกล่าวได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาปัจจัยที่

มีผลต่ออนุภาคขนาดไมครอนที่ผลิตได้ด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน ซึ่งได้แก่ ความเร็วรอบในการปั่นกวน อัตราส่วนของน้ำและน้ำมัน และอัตราส่วนของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอิน

4.1.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่ออนุภาคขนาดไมครอนที่ผลิตได้ด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน

ก. ผลของความเร็วยรอบในการปั่นกวน

ในการทดลองผู้วิจัยได้ทำการทดลองขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน โดยใช้เครื่องปั่นผสมความเร็วรอบสูง (homogenizer) ในการปั่นกวน เพื่อให้วัฏภาคน้ำแตกตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็กกระจายตัวในวัฏภาคน้ำมัน ที่ความเร็วรอบ 3000, 4000 และ 5000 รอบ/นาที ผู้วิจัยได้ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมที่มีความเข้มข้นของสารละลายร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนการผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน 80/20 โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน 1/15 โดยปริมาตร พบว่า ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 3000 รอบ/นาที อนุภาคที่ขึ้นรูปได้เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงมีลักษณะค่อนข้างกลม และกระจายตัวดี ดังรูปที่ 4.3 และเมื่อเพิ่มความเร็วยรอบในการปั่นกวนเป็น 4000 รอบ/นาที พบว่า อนุภาคที่ผลิตได้นั้นมีลักษณะเป็นทรงกลมเกาะรวมกลุ่มกันบางส่วน และมีฟองอากาศอยู่บริเวณพื้นผิวของอนุภาค ทั้งนี้ การทำให้เกิดเป็นอนุภาคทรงกลมจะอาศัยหลักการทำงานของเครื่องปั่นผสมความเร็วรอบสูง ที่ควบคุมให้ของเหลวผ่านวาล์วขนาดเล็กโดยใช้ความเร็วสูง จึงทำให้ระบบเกิดแรงเฉือน แรงกระแทก และเกิดการแตกตัวของฟองอากาศขนาดเล็ก ส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของวัฏภาคน้ำในวัฏภาคน้ำมันเกิดเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก อีกทั้งเมื่อใช้ความเร็วรอบในการปั่นกวนสูงเกินไป อาจทำให้อากาศสามารถผ่านวาล์วไฮโมจิเนสส์เข้าไปรวมกับส่วนของเหลว (Pornchaloempong P และคณะ(2010)) อนุภาคไมครอนที่เกิดขึ้นจึงมีฟองอากาศรวมอยู่บริเวณพื้นผิวอนุภาค ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้เลือกความเร็วรอบในการปั่นกวน 3000 รอบ/นาที มาใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคขนาดไมครอนเพื่อศึกษาในการทดลองถัดไป เนื่องจากที่ความเร็วรอบนี้จะทำให้เกิดอนุภาคไมครอนที่เป็นทรงกลม ไม่เกิดฟองอากาศรวมอยู่พื้นผิวอนุภาค อีกทั้ง อนุภาคไมครอนที่เกิดขึ้นกระจายตัวได้ดี ไม่เกาะรวมกลุ่มกัน



รูปที่ 4.3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มี อัตราส่วนผสม G/SF 80/20 โดยน้ำหนัก (7.5 %โดยน้ำหนัก) ที่ถูกขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน โดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 1 ต่อ15 โดยปริมาตร ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ (ก.) 3000 รอบ/นาที (ข.) 4000 รอบ/นาที

ข. ผลอัตราส่วนโดยปริมาตรของน้ำต่อน้ำมัน

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนโดยปริมาตรของน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน 80/20 (7.5% โดยน้ำหนัก) และใช้อัตราส่วนโดยปริมาตรของน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 1 ต่อ 15 และ 1 ต่อ 30 หลังจากนั้นเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร จากนั้นทำแห้งอนุภาคด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง ผลการศึกษาพบว่า ร้อยละผลได้ของอนุภาคที่ผลิตได้ มีค่าประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน ตารางที่ 4.1 โดยอัตราส่วนน้ำต่อน้ำมันทุกสัดส่วนที่ใช้จะมีร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาด 32-75 ไมครอน มากที่สุด และเมื่อพิจารณาแต่ ละอัตราส่วนน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ พบว่า อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน เท่ากับ 1 ต่อ 30 สามารถผลิตอนุภาคขนาดไมครอนในช่วงขนาด 32-75 ไมครอน ได้มากกว่าการผลิตอนุภาคโดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน เท่ากับ 1 ต่อ 15 เนื่องจากเมื่อมีการเพิ่มส่วนวัตถุดิบน้ำมันเข้าไปในระบบอิมัลชัน เปรียบเสมือน การเพิ่มส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปในระบบ ทำให้วัตถุดิบน้ำที่ประกอบด้วยสารละลายเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยถูกล้อมรอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำจากวัตถุดิบน้ำมันจำนวนมาก เมื่อระบบเกิดเป็นอิมัลชันที่มีอนุภาคไมครอน ส่วนของวัตถุดิบน้ำหรืออนุภาคนั้นจะพยายามลดพื้นที่ผิวสัมผัสกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำในวัตถุดิบของน้ำมัน ส่งผลให้อนุภาคที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กลง

Peng Z.Y. และคณะ (2012) ได้เปรียบเทียบอัตราส่วนน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคไมครอนของเจลาตินด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันที่อัตราส่วน 1 ต่อ 5 และ 1 ต่อ 7 โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายเจลาตินคงที่ 0.25 กรัม/มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นกวนคงที่ 300 รอบ/นาที พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยของการใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน 1 ต่อ 5 มีขนาดมากกว่าอัตราส่วน 1 ต่อ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าเมื่อใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมันที่มากกว่าในการขึ้นรูปอนุภาคด้วยวิธีอิมัลชัน จะทำให้ขนาดอนุภาคมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำให้มากขึ้น แรงเฉือนที่กระทำต่ออนุภาคน้ำเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของอนุภาคมีค่าลดลง ทำให้อนุภาคที่เกิดขึ้นจึงมีขนาดใหญ่กว่า

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลได้ ของอนุภาคขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน 80/20 โดยน้ำหนัก (7.5% โดยน้ำหนัก) และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.05 %โดยปริมาตร

อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน	ร้อยละผลได้ของอนุภาคที่ช่วงขนาดต่าง ๆ			ร้อยละผลได้ของอนุภาคทั้งหมด
	32-75 μm	75-100 μm	100-200 μm	
1 ต่อ 15	39.44 \pm 6.3	26.75 \pm 5.9	33.81 \pm 2.9	62.62 \pm 7.1
1 ต่อ 30	69.38 \pm 6.9 ^b	23.74 \pm 2.1	6.88 \pm 3.2	82.79 \pm 6.9

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มขนาดอนุภาคที่มี w/o คือ 1/15

b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มขนาดอนุภาคที่มี w/o คือ 1/30)

ค. ผลของอัตราส่วนผสมของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

เนื่องด้วยผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตอนุภาคขนาดไมครอน เพื่อประยุกต์ใช้งานเป็นพาหะขนส่งเซลล์ไปยังสัตว์ทดลอง เพื่อต้องการให้เกิดก้อนมะเร็งบนสัตว์ทดลองในระยะเวลาประมาณ 14 วัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะให้อนุภาคขนาดไมครอนย่อยสลายทางชีวภาพภายใน 14 วัน จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2014) ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพระดับห้องปฏิบัติการด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (163 หน่วย/มิลลิกรัม, พีเอช 7.4) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของอนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 10

โดยน้ำหนัก อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอินต่าง ๆ และผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนร้อยละของโหมมากกว่าและเท่ากับ 30 โดยน้ำหนัก จะมีน้ำหนักคงเหลือเมื่อทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นเวลา 14 วัน มีค่ามากกว่าร้อยละ 80 โดยน้ำหนัก ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เลือกอัตราส่วนผสมของเจลาตินและไฟโบรอินโหมไทยเท่ากับ 100/0, 90/10 และ 80/20 โดยน้ำหนัก มาใช้ในการผลิตอนุภาคขนาดไมครอนในการทดลองนี้

เมื่อทำการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน 100/0, 90/10 และ 80/20 โดยน้ำหนัก (7.5 %โดยน้ำหนัก) ด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน โดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน 1 ต่อ 30 และ ความเร็วรอบในการปั่นกววนเท่ากับ 3000 รอบ/นาที หลังจากนั้นเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร และทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าร้อยละผลได้ของอนุภาคที่ผลิตได้ทั้งหมดมีค่าประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ และร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาด 32-75 ไมครอน ในแต่ละอัตราส่วนการผสมของเจลาตินและไฟโบรอินโหมไทยมีมากที่สุด ซึ่งร้อยละผลได้ของอนุภาคแต่ละช่วงขนาดที่ผลิตได้นั้นไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากความหนืดของสารละลายผสมเจลาตินและไฟโบรอินโหมไทยทั้งสามอัตราส่วนการผสมมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งจากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าความหนืดเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคที่ผลิตได้ แต่ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าความหนืดของทั้งสามสารละลายผสมมีค่าไม่แตกต่างกัน (13-16 เซนติพอยด์) ส่งผลให้ร้อยละผลได้ของอนุภาคในแต่ละช่วงขนาดไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาลักษณะอนุภาคที่ผลิตได้ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนผสมของเจลาตินและไฟโบรอินโหมไทย ได้แก่ 100/0, 90/10 และ 80/20 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าลักษณะอนุภาคเป็นทรงกลมและกระจายตัวดี ในทุกอัตราส่วนผสมของเจลาตินและไฟโบรอินโหมไทยและทุกช่วงขนาด

ง. ผลของร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวม

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวมของอนุภาค (2.5, 5 และ 7.5) ที่มีอัตราส่วนผสมของเจลาตินและไฟโบรอินโหมไทย 80/20 ขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำใน

น้ำมันอัตราส่วน 1 ต่อ 30 โดยปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 3000 รอบ/นาที และผ่านการเชื่อมขวางด้วย สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร และทำแห้งแบบเยือกแข็ง ผล การศึกษาพบว่าร้อยละผลได้ของอนุภาคที่ขึ้นรูปได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมต่าง ๆ มีค่าอยู่ใน ช่วง 69-83 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาขนาดของอนุภาคทุกความเข้มข้น ของแข็งรวมภายหลังการคัดแยกขนาดจะพบว่า อนุภาคทรงกลมที่มีขนาดในช่วง 32-75 ไมครอน จะมีร้อยละผลได้มากที่สุด รองลงมาคือ ขนาดในช่วง 70-100 ไมครอน และ 100-200 ไมครอน ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกัน จะส่งผลต่อร้อยละผลได้ของอนุภาค ที่ผลิตได้ โดยผลการทดลองพบว่า การใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก อนุภาค ทรงกลมจะมีร้อยละผลได้มากที่สุด เนื่องจากสารละลายผสมมีเนื้อสารเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เมื่อทำการขึ้น รูปอนุภาคทรงกลมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน วัฏภาคน้ำที่มีเนื้อสารเพิ่มขึ้น จะสามารถเกิดเป็น อนุภาคทรงกลมที่มีความเสถียรมากขึ้น ร้อยละผลได้ของอนุภาคที่ผลิตได้ทั้งหมดจึงมีค่าเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาลักษณะอนุภาคที่ผลิตได้ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนผสมของเจลาตินและไฟโบ รินไหมไทย ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าอนุภาคที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 5 และ 7.5 โดย น้ำหนัก จะมีลักษณะกระจายตัวได้ดี แต่เมื่อลดความเข้มข้นของแข็งรวมในสารละลายผสม เท่ากับ ร้อยละ 2.5 อนุภาคที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเกาะรวมกลุ่มกันเป็นกลุ่มอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น อาจ เนื่องจากสารละลายผสมมีร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวมน้อยเกินไป วัฏภาคน้ำมีเนื้อสารที่ สามารถเกิดเป็นอนุภาคทรงกลมในปริมาณน้อย อนุภาคทรงกลมที่เกิดขึ้นจึงไม่เสถียรเมื่ออยู่ในระบบ อิมัลชัน ส่งผลให้เกิดการรวมกลุ่มกันของแต่ละอนุภาค ทำให้เกิดเป็นกลุ่มอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้น ร้อยละผลได้ของช่วงขนาดอนุภาค 100-200 μm จึงมีค่ามากที่สุด

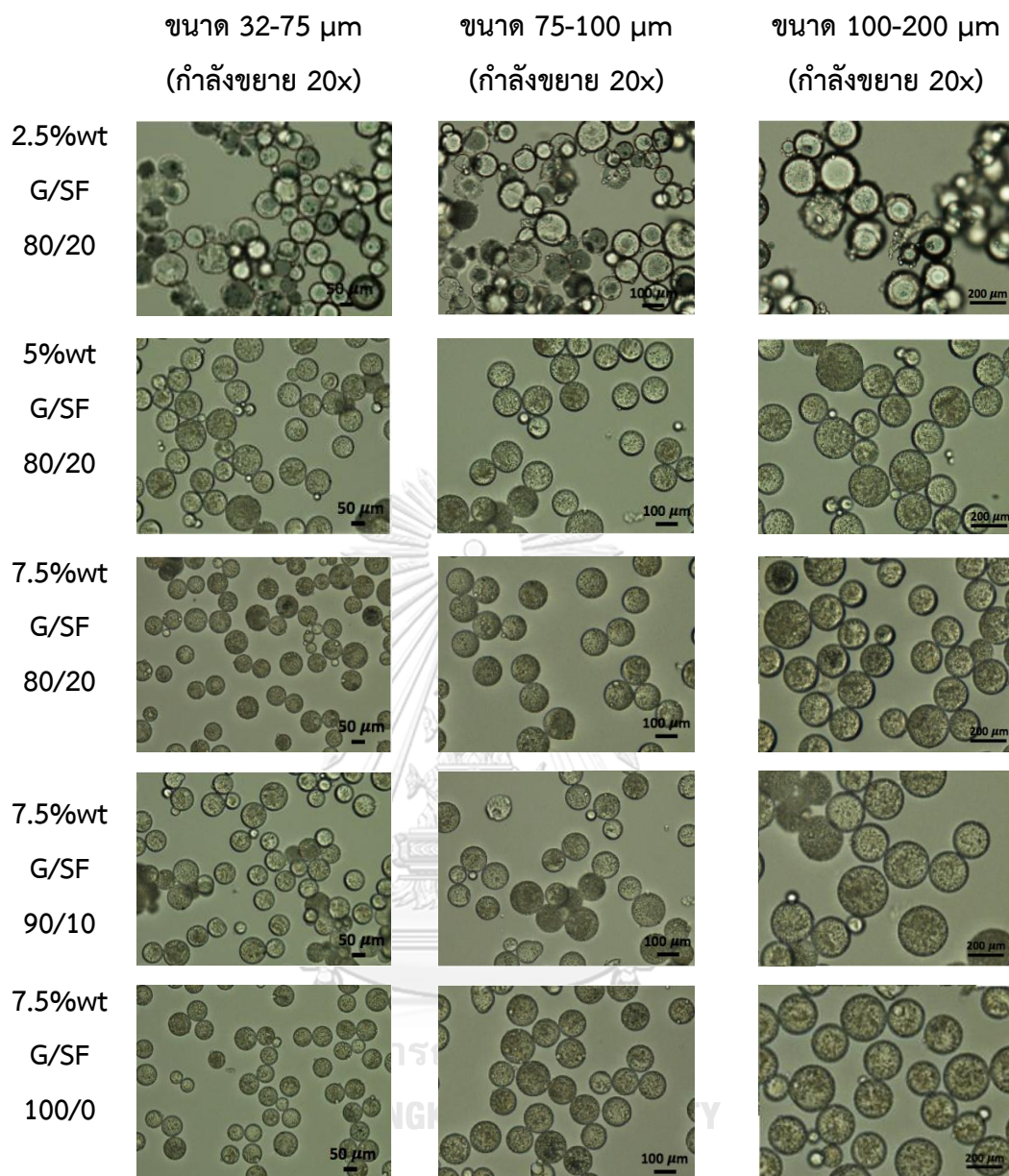
ตารางที่ 4.2 ร้อยละผลได้ของอนุภาคขนาดไมครอน อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอินโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ถูกขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน โดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน 1 ต่อ 30 ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบ/นาที และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.05 %โดยปริมาตร

ร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวม	อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน	ร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาดต่าง ๆ			ร้อยละผลได้ของอนุภาคทั้งหมด
		32-75 μm	75-100 μm	100-200 μm	
2.5	80/20	51.20 \pm 2.8 ^c	28.69 \pm 6.0	20.13 \pm 3.2	69.77 \pm 4.2
5.0	80/20	52.41 \pm 7.3 ^c	30.12 \pm 3.7	17.47 \pm 5.3	68.94 \pm 8.1
7.5	80/20	69.38 \pm 2.1 ^{a,c}	23.74 \pm 2.1 ^c	6.88 \pm 3.2 ^{a,c}	82.79 \pm 6.9
7.5	90/10	61.56 \pm 4.8 ^c	25.58 \pm 5.1	12.86 \pm 6.5	80.35 \pm 4.5
7.5	100/0	70.85 \pm 2.1 ^c	19.84 \pm 3.7	9.31 \pm 2.6	65.26 \pm 4.4

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลได้ของขนาดอนุภาค G80/SF20 ที่มีร้อยละความเข้มข้นแตกต่างกัน

b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลได้ของขนาดอนุภาคที่มีร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวมเท่ากัน แต่มีอัตราส่วน G/SF แตกต่างกัน

c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลได้ขนาดต่าง ๆ ของอนุภาคที่มีร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวม และอัตราส่วน G/SF แตกต่างกัน)



รูปที่ 4.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน ไหมไทยที่ม อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอินโดยน้ำหนักที่ต่าง ๆ ขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 1/30 โดยปริมาตร ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบต่าง 3000 รอบ/นาที่ และผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร และทำแห้งแบบเยือกแข็ง

4.1.2.2 ร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระหลังทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์

กระบวนการเชื่อมขวางนั้นเป็นกระบวนการปรับปรุงคุณสมบัติของวัสดุให้มีความคงตัวมากขึ้นผ่านการสร้างพันธะเคมีภายในหรือระหว่างสายโซ่โมเลกุล ส่งผลให้สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของวัสดุเปลี่ยนแปลงไป

การนำเจลาตินมาประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงความสามารถในการละลายน้ำ การบวมตัวและการดูดซับน้ำของเจลาติน แต่เนื่องด้วยอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของเจลาตินค่อนข้างเร็ว ในงานวิจัยนี้จึงได้นำไฟโบรอินใหม่ไทยมาผสมกับเจลาติน ซึ่งโมเลกุลของไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อย แต่มีความแข็งแรงค่อนข้างสูง อีกทั้งผู้วิจัยได้ทำการเชื่อมขวางสารผสมของเจลาตินและไฟโบรอินด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งคาดหวังให้ความสามารถในการละลายน้ำ การดูดซับน้ำ ตลอดจนอัตราการย่อยสลายของสารผสมลดลง

การเชื่อมขวางทางเคมีของสารผสมเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ เป็นการเชื่อมขวางพันธะทางเคมีเกิดเป็นพันธะโคเวเลนต์ที่มีความแข็งแรง โดยหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ในโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์ จำนวน 1 โมเลกุล สามารถเกิดอันตรกริยากับหมู่อะมิโนอิสระ (-NH₂) ในโมเลกุลของสารโซ่โปรตีนเจลาติน หรือไฟโบรอินใหม่ไทย จำนวน 2 หมู่ และปลดปล่อยโมเลกุลของน้ำออกมา การวิเคราะห์ความสำเร็จในการเชื่อมขวางสามารถวิเคราะห์ได้จากปริมาณการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระในสายโซ่โปรตีนโดยเปรียบเทียบในสภาวะก่อนและหลังการเชื่อมขวาง โดยทำการตรวจวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยเทคนิคนินไฮดริน ซึ่งหมู่อะมิโนอิสระในสารโซ่โมเลกุลโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับสารนินไฮดริน เกิดเป็นสารประกอบไฮดรินแดนติน อัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับสารไฮดรินแดนตินและนินไฮดริน เกิดเป็นสารประกอบที่ให้สีน้ำเงินม่วง การวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เหลืออยู่สามารถวิเคราะห์โดยอ้างอิงจากกราฟมาตรฐานของสารละลายเบต้า-อะลานีน (1 โมเลกุลของเบต้า-อะลานีน ประกอบด้วยหมู่อะมิโนอิสระ -NH₂ จำนวน 1 หมู่)

รายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Sinthop S. และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลของขนาดอนุภาคไมครอน (100-315, 315-500 และมากกว่า 710 μm) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาค

ไมครอนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคไมครอนในขนาดต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่า ขนาดของอนุภาคไมครอนไม่มีผลต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่อยู่ในอนุภาค

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกอนุภาคขนาด 32-75 μm ที่สามารถฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ได้ มาทำการศึกษาความสำเร็จของการเชื่อมขวางทางเคมีในครั้งนี้

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนการผสมของเจลาตินต่อไฟโบรอิน เท่ากับ 100/0, 90/10 และ 80/20 โดยมีร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวมเท่ากับ 7.5 โดยน้ำหนัก อนุภาคขนาดไมครอนของเจลาติน (100/0) จะมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวางอนุภาคมากที่สุด คือ 2.81 ± 0.10 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม และเมื่ออัตราส่วนผสมของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจะมีค่าลดลง คือ อนุภาคขนาดไมครอนที่อัตราส่วนการผสมเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทย เท่ากับ 90/10 และ 80/20 มีค่า 2.74 ± 0.08 และ 2.58 ± 0.09 ตามลำดับ ซึ่งโดยปกติ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโมเลกุลของเจลาตินมีมากกว่าโมเลกุลไฟโบรอิน โดยกรดอะมิโนในเจลาติน และไฟโบรอินที่มีหมู่อะมิโนอิสระเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ Arginine, Asparagine, Glutamine และ Lysine ซึ่งในเจลาตินมีปริมาณ 5.3, 5.4, 8.9 และ 3.2 เปอร์เซ็นต์โมล ตามลำดับ และในไฟโบรอินมีปริมาณ 0.3, 1.63, 1.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์โมล ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมดในเจลาติน (22.8 เปอร์เซ็นต์โมล) มีมากกว่าหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมดในไฟโบรอิน (3.28 เปอร์เซ็นต์โมล) ดังนั้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอิน สารผสมจึงมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลง (Yasuhiko T. และ Yoshito I. (1998) และ Kaewprasit K. และคณะ (2014))

เมื่อพิจารณาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวางอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินต่อไฟโบรอินที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเท่ากับ 80/20 โดยใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกัน ได้แก่ 2.5, 5 และ 7.5 โดยน้ำหนัก จะพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมในปริมาณมากขึ้น หมู่อะมิโนอิสระที่ตรวจพบจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากระบบมีเนื้อสารเพิ่มขึ้น หมู่อะมิโนอิสระในโมเลกุลของสายโซ่โปรตีนเจลาตินและไฟโบรอินจึงมีปริมาณเพิ่มขึ้น

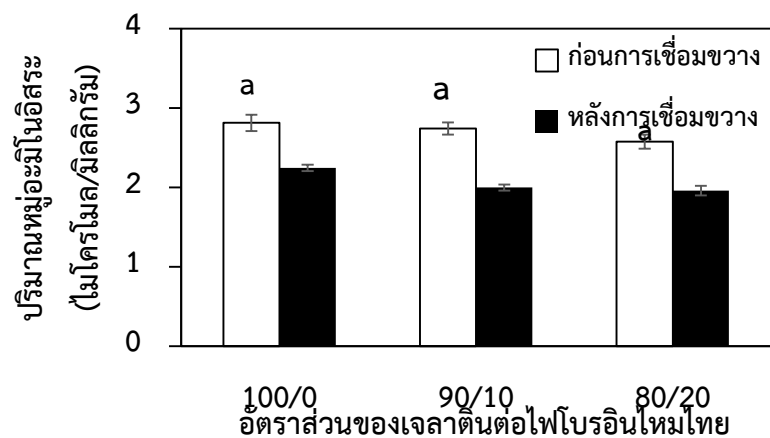
นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระภายหลังการเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ของอนุภาคขนาดไมครอนที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมเท่ากัน คือ 7.5

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ใช้อัตราส่วนการผสมของเจลาตินต่อไฟโบรอินแตกต่างกัน ได้แก่ 100/0, 90/10 และ 80/20 จะพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอิน ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนการผสม 100/0, 90/10 และ 80/20 จะมีร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเท่ากับ 20.29 ± 0.97 , 22.57 ± 1.08 และ 24.01 ± 0.82 ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคขนาดไมครอนทุกอัตราส่วนการผสมที่วิเคราะห์ได้ ภายหลังจากเชื่อมขวางมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เนื่องด้วยอนุภาคขนาดไมครอนที่มีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบมากที่สุด จะมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวางน้อยที่สุด ส่งผลให้เมื่อคำนวณร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระภายหลังจากการเชื่อมขวางมีค่ามากที่สุด

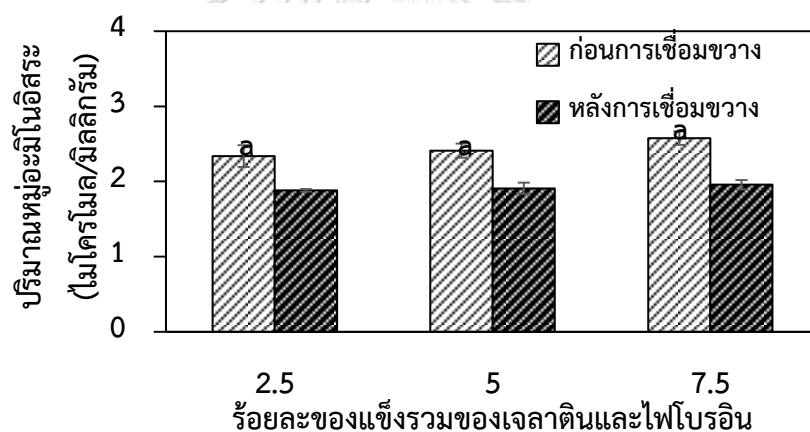
เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกัน ได้แก่ 2.5, 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ใช้อัตราส่วนการผสมเดียวกัน คือ 80/20 จะพบว่า ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคขนาดไมครอนที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 2.5, 5 และ 7.5 มีค่าเท่ากับ 26.62 ± 0.80 , 24.86 ± 0.46 และ 24.01 ± 0.82 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งจะเห็นว่า เมื่อลดความเข้มข้นของแข็งรวมในสารผสม จะทำให้ร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระภายหลังจากเชื่อมขวางอนุภาคทุกความเข้มข้นของแข็งรวม มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวางอนุภาคที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมน้อยที่สุด (2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) จะมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระน้อยที่สุด ส่งผลให้เมื่อคำนวณร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระภายหลังจากการเชื่อมขวาง อนุภาคขนาดไมครอนที่อัตราส่วนการผสม 80/20 ที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก จึงมีค่าร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุด

ทั้งนี้ ความสำเร็จของการเชื่อมขวางทางเคมีของอนุภาคอาจต้องคำนึงถึงสมบัติในด้านอื่นๆ ของวัสดุ นอกเหนือจากการพิจารณาร้อยละการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระ อาทิเช่น สมบัติในการดูดซับน้ำ และอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุ ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป

(ก)



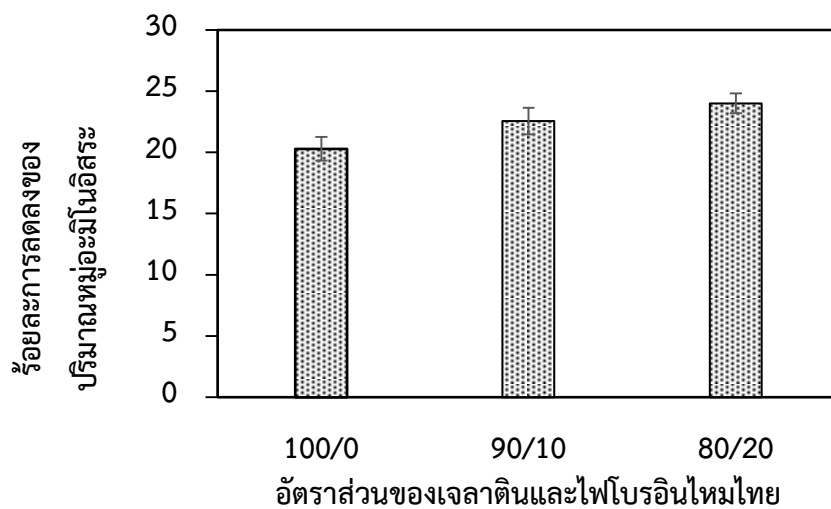
(ข.)



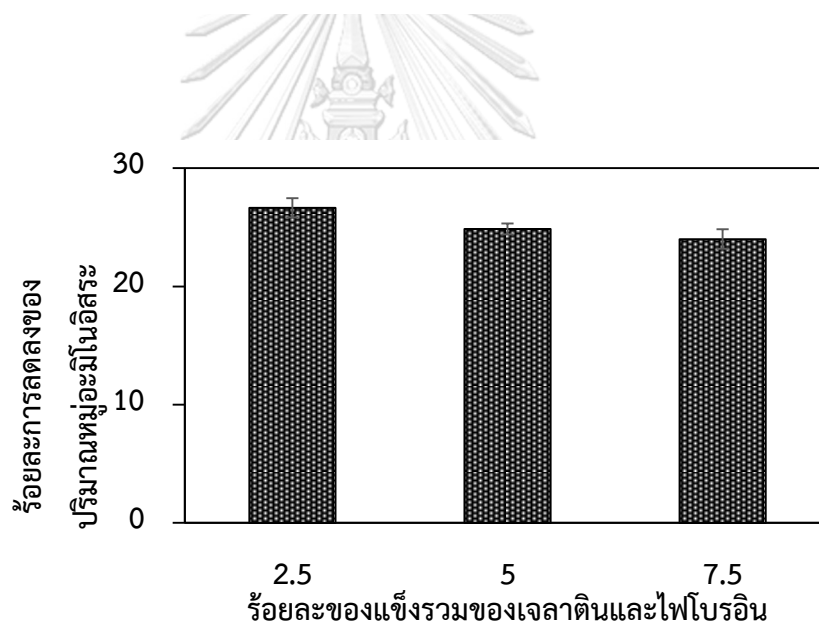
รูปที่ 4.5 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ขนาด 32-75 μm ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ก) อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก (ข.) อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสม 80/20 ที่ความเข้มข้นของแข็งรวมต่าง ๆ

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังเชื่อมขวาง ของอนุภาคไมโครอนุสรต่าง ๆ

(ก.)



(ข.)

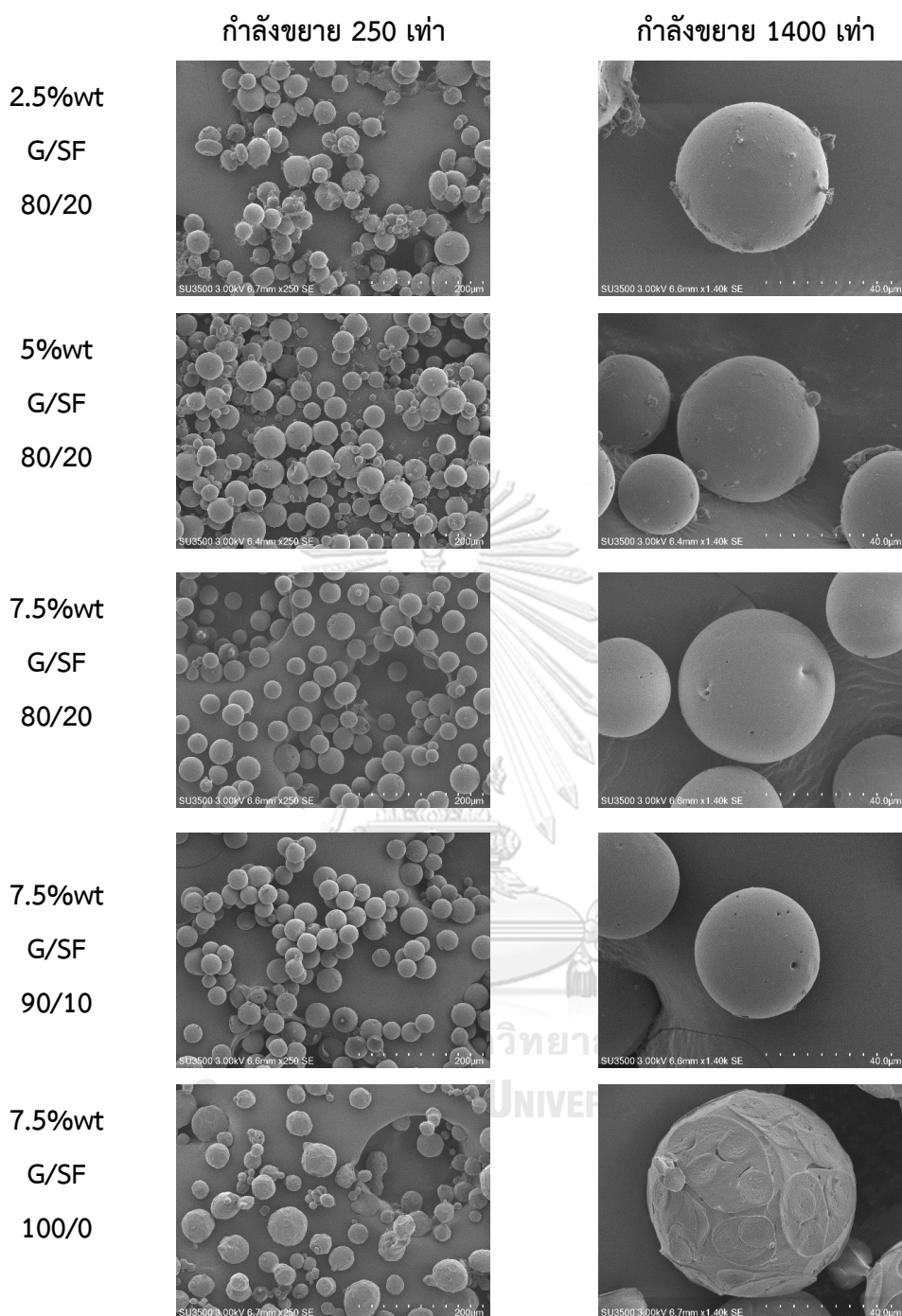


รูปที่ 4.6 ร้อยละการลดลงของหมู่อะมีโนอิสระของอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ขนาด 32-75 μm ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ก) อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสมต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก (ข.) อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนผสม 80/20 ที่ความเข้มข้นของแข็งรวมต่าง ๆ (a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$)

4.1.2.3 โครงสร้างสัณฐาน (Morphology)

การศึกษาลักษณะสัณฐานพื้นผิวของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน สามารถวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร ที่ใช้อัตราส่วนการผสมของเจลาตินต่อไฟโบรอินคงที่ เท่ากับ 80/20 แต่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมในการขึ้นรูปแตกต่างกัน ได้แก่ 2.5, 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อนุภาคที่ผลิตได้ภายหลังการคัดแยกขนาดในช่วง 32-75 ไมครอน มีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวได้ดี และอนุภาคที่ได้มีแนวโน้มเกาะรวมกลุ่มกันมากขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของแข็งรวม อาจเนื่องมาจากการลดความเข้มข้นของแข็งรวม ความคงตัวของอนุภาคที่ได้จึงน้อยลง ส่งผลให้มีบางกลุ่มอนุภาคเกิดการเกาะรวมกลุ่มกันจนกลายเป็นกลุ่มอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น

เมื่อพิจารณาอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.05 โดยปริมาตร และใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมคงที่ เท่ากับ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่เปรียบเทียบอัตราส่วนการผสมของเจลาตินต่อไฟโบรอินในการขึ้นรูปแตกต่างกัน ได้แก่ 80/20, 90/10 และ 100/0 จะพบว่าอนุภาคที่ผลิตได้ภายหลังการคัดแยกขนาดในช่วง 32-75 ไมครอน โดยใช้อัตราส่วนการผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน เท่ากับ 100/0 มีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวดี แต่พื้นผิวของอนุภาคมีความขรุขระ อาจเกิดจากขั้นตอนการขึ้นรูปอนุภาคด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน อนุภาคอาจเกิดการเกาะติดกันที่ผิวบางส่วน จึงทำให้พื้นผิวของอนุภาคไม่เรียบ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทย อนุภาคที่ได้ยังคงมีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีพื้นผิวเรียบ อาจเนื่องจากกระบวนการขึ้นรูปในระบบอิมัลชันสามารถเกิดเป็นอนุภาคทรงกลม อนุภาคไม่เกิดการเกาะติดกันที่ผิว พื้นผิวอนุภาคที่ได้จึงมีลักษณะเรียบมากกว่าระบบที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบมาก (อัตราส่วนการผสม 100/0)



รูปที่ 4.7 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร และทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยเปรียบเทียบการใช้อัตราส่วนการผสมของเจลลาตินต่อไฟโบรอิน และความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกัน โดยวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 250 และ 1400 เท่า

4.1.2.4 อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาค (Swelling ratio)

รายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Sinthop S. และคณะ (2014) ได้ศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครเจลลาตินที่อัตราส่วนต่าง ๆ 3 ช่วงขนาด ได้แก่ 100-315, 315-500 และมากกว่า 710 ไมครอน ผลการศึกษาพบว่า ร้อยละการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครแต่ละช่วงขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เลือกอนุภาคขนาดไมครอนของเจลลาตินและไฟโบรอิน ที่มีขนาดในช่วง 32-75 μm ซึ่งมีความเหมาะสมในการฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ได้เป็นอย่างดี มาทำศึกษาอัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาคขนาดไมครอนที่ผลิตได้

อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาคขนาดไมครอนสามารถอธิบายความสำเร็จในการเชื่อมขวางอนุภาคได้ กล่าวคือ อนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางจะมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไป คือความสามารถในการดูดซับน้ำลดลง และละลายน้ำได้น้อยลง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์อัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาคขนาดไมครอน โดยวัดขนาดของอนุภาคที่ผ่านการแช่ในสารละลายอะซิโตนเทียบกับอนุภาคที่ผ่านการแช่ในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบอัตราส่วนการผสมของเจลลาตินต่อไฟโบรอิน ได้แก่ 100/0, 90/10 และ 80/20 อนุภาคขนาดไมครอนของเจลลาติน (100/0) มีอัตราส่วนการดูดซับน้ำมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เนื่องจากเจลลาตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีความชอบน้ำสูง ส่งผลให้อนุภาคขนาดไมครอนที่มีเจลลาตินเป็นองค์ประกอบมากมีอัตราส่วนการดูดซับน้ำมาก นอกจากนี้ อัตราส่วนการดูดซับน้ำจะลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอินในสารผสม เสมือนเพิ่มโมเลกุลส่วนไม่ชอบน้ำให้กับสารผสม อนุภาคขนาดไมครอนจึงบวมตัวและดูดซับน้ำได้น้อยลง ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ กล่าวคือ ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออนุภาคขนาดไมครอนที่ไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2014) ได้ศึกษาค่ามุมสัมผัสของน้ำของแผ่นฟิล์มเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนของไฟโบรอินเท่ากับ 0-70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอิน ค่ามุมสัมผัสน้ำมีค่าเพิ่มขึ้น ($59.1-63.6^\circ$) ซึ่งแสดงถึงความชอบน้ำที่ลดลง

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบอนุภาคขนาดไมครอนที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกัน ได้แก่ 2.5, 5, และ 7.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ใช้อัตราส่วนการผสมของเจลลาตินต่อไฟโบรอินคงที่

เท่ากับ 80/20 จะพบว่า อนุภาคขนาดไมครอนที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมมาก (7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) จะมีความสามารถในการดูดซับน้ำน้อยที่สุด เนื่องจากเมื่อระบบมีเนื้อสารที่สามารถเกิดการเชื่อมขวางกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น โอกาสที่อนุภาคขนาดไมครอนจะเกิดการเชื่อมขวาง เกิดเป็นอนุภาคทรงกลมที่มีความคงตัวและมีความเสถียรจึงมีมากขึ้น ส่งผลให้อนุภาคขนาดไมครอนที่ได้มีความสามารถในการละลายน้ำและบวมตัวต่ำ อนุภาคที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมในปริมาณมาก จึงมีอัตราส่วนการดูดซับลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองร้อยละการเชื่อมขวาง กล่าวคือ อนุภาคขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการดูดซับน้ำน้อย จะมีร้อยละการเชื่อมขวาง อาจกล่าวได้ว่า ความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคแปรผกผันกับร้อยละการเชื่อมขวาง

ตารางที่ 4.3 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย และอัตราการดูดซับน้ำของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

ร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวม	อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน	ขนาดเฉลี่ยของอนุภาค		อัตราส่วนการดูดซับน้ำ (เปอร์เซ็นต์)
		แขในสารละลายอะซิโตน	แขในน้ำปราศจากไอออน 24 ชม.	
2.5	80/20	39.90 ± 6.08	41.42 ± 4.32	104.33 ± 5.13
5.0	80/20	39.83 ± 5.59	41.93 ± 7.71	105.84 ± 4.69
7.5	80/20	38.32 ± 3.55	41.01 ± 4.41	106.92 ± 1.61
7.5	90/10	38.40 ± 3.68	41.70 ± 8.94	107.76 ± 13.01
7.5	100/0	41.73 ± 5.47	47.02 ± 5.61	112.79 ± 1.35

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนการดูดซับน้ำของอนุภาคไมครอน)

4.1.2.5 ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro biodegradability*)

ไฟโบรอินใหม่ไทยเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีสมบัติทางกลที่ดี โมเลกุลมีความแข็งแรงสูง อัตราการย่อยสลายค่อนข้างช้า แต่สำหรับเจลาติน เป็นโมเลกุลที่มีความชอบน้ำสูง ละลายน้ำได้ดี ย่อยสลายทางชีวภาพได้เร็ว การนำพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดมาผสมกันเพื่อคาดหวังให้เกิดการปรับปรุงสมบัติของวัสดุ โดยส่วนนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินทางชีวภาพ ในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายขององค์ประกอบที่มี

ความแข็งแรงสูง คือ โปรตีนไฟโบรอิน โดยใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนไฟโบรอิน จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Li M. และคณะ (2002) ได้ศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน โดยแช่แผ่นฟิล์มในเอนไซม์ α -Chymotrypsin, คอลลาจีเนส IA, โปรตีเอส XIV และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่มีเอนไซม์ พบว่าร้อยละน้ำหนักคงเหลือของแผ่นฟิล์มภายหลังการแช่ในสารละลายที่มีเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 15 วัน มีค่าเท่ากับ 68, 48, 30 และ 68 ตามลำดับ จะเห็นว่าร้อยละคงเหลือของแผ่นฟิล์มเมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV มีค่าน้อยที่สุด และเอนไซม์ α -Chymotrypsin ไม่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายโปรตีนไฟโบรอิน เนื่องจากน้ำหนักคงเหลือของแผ่นฟิล์มที่แช่ในเอนไซม์ α -Chymotrypsin เท่ากับน้ำหนักคงเหลือแผ่นฟิล์มที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Wongnarat C. และคณะ (2013) ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์สำโรง และสายพันธุ์นางลาย โดยใช้เอนไซม์โปรตีเอส XIV และเอนไซม์โปรตีเอส XXIII ความเข้มข้น 1 หน่วย/มิลลิลิตร พบว่าน้ำหนักคงเหลือของเส้นใยไฟโบรอินสายพันธุ์สำโรงภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์ดังกล่าว ภายในระยะเวลา 49 วัน มีค่าเท่ากับ 72.5 และ 82.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำหนักคงเหลือของเส้นใยไฟโบรอินสายพันธุ์นางลาย มีค่าเท่ากับ 75 และ 87 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรตีเอส XIV มีความจำเพาะกับโปรตีนไฟโบรอินมากกว่าเอนไซม์โปรตีเอส XXIII ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เอนไซม์โปรตีเอส XIV ความเข้มข้น 0.5 หน่วย/มิลลิลิตร มาใช้ในการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคขนาดไมครอนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

จากรูปที่ 4.8 พบว่า อนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอส XIV ความเข้มข้น 0.5 หน่วย/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้หมดภายในระยะเวลา 10 วัน และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนผสมของเจลาตินต่อไฟโบรอินพบว่า อนุภาคที่มีอัตราส่วนการผสมเท่ากับ 100/0, 90/10 และ 80/20 ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาค เท่ากับ 27.33 ± 4.16 , 31.33 ± 6.43 และ 38.00 ± 6.00 ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายของอนุภาคขนาดไมครอนสามารถแสดงได้ด้วยค่าย่อยสลายครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า เมื่ออนุภาคขนาดไมครอนที่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมคงที่ เท่ากับ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีไฟโบรอินเป็น

องค์ประกอบในปริมาณมากขึ้นจะเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพโดยเอนไซม์โปรติเอส XIV ได้ช้าลง ทำให้มีค่าย่อยสลายครึ่งชีวิต และร้อยละน้ำหนักคงเหลือภายหลังการทดสอบการย่อยสลายมากขึ้น

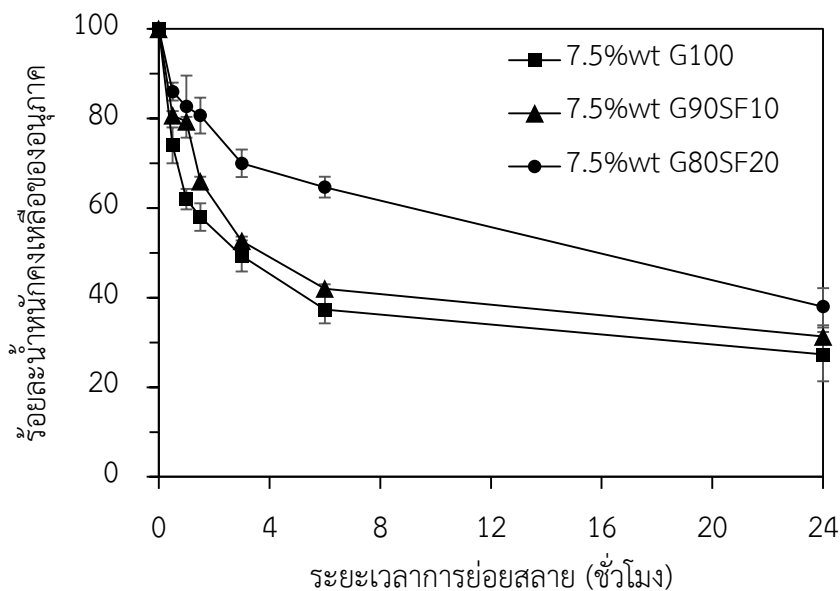
นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาอนุภาคที่มีอัตราส่วนการผสมของเจลาตินต่อไฟโบรอินคงที่เท่ากับ 80/20 แต่ใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกัน ได้แก่ 2.5, 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะพบว่า เมื่อความเข้มข้นของแข็งรวมเพิ่มขึ้น อนุภาคขนาดไมครอนจะมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพช้าลง จะเห็นได้จากค่าย่อยสลายครึ่งชีวิต และร้อยละน้ำหนักคงเหลือภายหลังการทดสอบการย่อยสลายมีค่าเพิ่มขึ้น โดยอนุภาคขนาดไมครอนที่มีความเข้มข้นของแข็งรวมเท่ากับ 2.5, 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะมีร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 8.67 ± 5.77 , 18.67 ± 4.16 และ 38.00 ± 6.00 ตามลำดับ ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางลดลงเมื่ออนุภาคมีความเข้มข้นของแข็งรวมเพิ่มขึ้น แสดงถึงอนุภาคเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพได้ช้าลง

ตารางที่ 4.4 ค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) ของการย่อยสลายอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยในเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 0.5 หน่วย/มิลลิลิตร ภายหลังการทดสอบเป็นเวลา 10 วัน

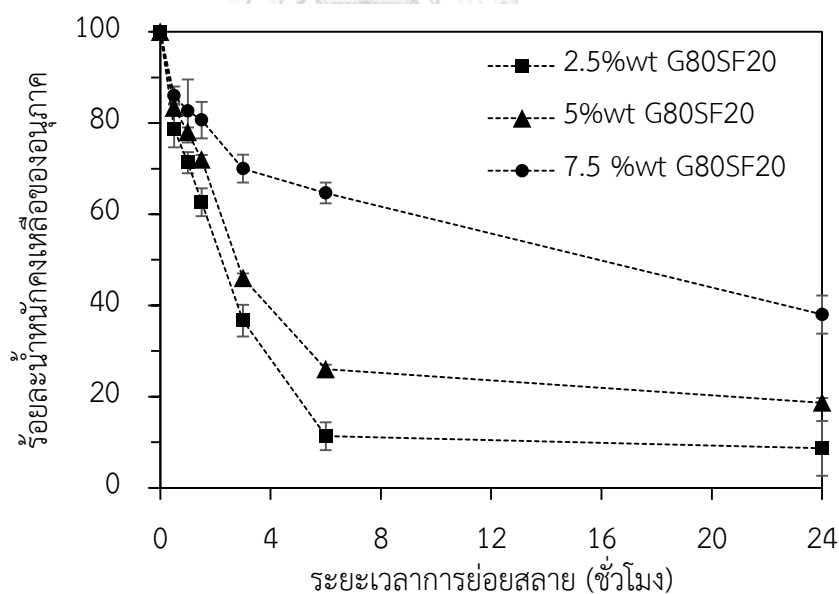
ร้อยละความเข้มข้นของแข็งรวม	อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน	ค่าครึ่งชีวิตของการย่อยสลาย (ชั่วโมง)
2.5	80/20	2.23
5.0	80/20	2.77
7.5	80/20	15.9
7.5	90/10	3.75
7.5	100/0	2.88

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบค่าครึ่งชีวิตของการย่อยสลายของอนุภาคไมครอน)

(ก.)



(ข.)



รูปที่ 4.8 ร้อยละน้ำหนักของน้ำที่ดูดซับของอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ แสดงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ก.) อนุภาคขนาดไมครอนที่ใช้ความเข้มข้นร้อยละของแข็งรวม 7.5 โดยใช้น้ำหนัก โดยใช้อัตราส่วนการผสมแตกต่างกัน (ข.) อนุภาคขนาดไมครอนที่ใช้อัตราส่วนผสมเจลาตินต่อไฟโบรอิน 80/20 และใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมแตกต่างกัน

4.2 ผลการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคขนาดไมครอนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนูและเซลล์มะเร็งปากมดลูก

การเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนู (L929) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Caski) บนอนุภาคไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคไมครอน และการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ โดยทำการศึกษาความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ และขนาดของอนุภาค เพื่อพัฒนาเป็นพาหะของเซลล์ในการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงในสัตว์ทดลอง

4.2.1 ผลการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาค

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Sinthop S. และคณะ (2014) ได้ศึกษาเปรียบเทียบร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cells, MCF-7) บนอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง โดยใช้อนุภาคขนาดเฉลี่ย 555.66 ± 23.58 ไมโครเมตร ศึกษาเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์ 2 วิธี ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีเขย่า (Agitation seeding) คือการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคและนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 % (Takahashi Y. และคณะ (2015)) และวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugal seeding) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 5 นาที ความเร็วรอบ 2500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Godbey W.T. และคณะ (2004)) โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.86×10^4 เซลล์/มิลลิกรัม เพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดก้นกลม ผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง อนุภาคไมโครในทุ้อัตราส่วนการผสมเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการเขย่าให้ค่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์สูงกว่าอนุภาคไมโครที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง คือ 37.39 และ 23.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการศึกษาข้างต้น ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการเขย่ามาใช้เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนู และเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อไป

ก. ผลการศึกษาการหาความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษาการหาความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นทำได้โดย เปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ผิวหนังหนู (L929) เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาติน (100/0) ในช่วง $0.2 \times 10^5 - 3.2 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ยึดเกาะและร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงบนอนุภาคขึ้น ปริมาณเซลล์ยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง มีค่าสูงขึ้นเช่นกัน และเมื่อคำนวณค่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง มีแนวโน้มที่ลดลง จากผลการทดลองนี้ สามารถแบ่งจำนวนเซลล์ยึดเกาะบนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง ได้เป็น 3 ช่วง ตามจำนวนเซลล์ยึดเกาะบนอนุภาค คือ ช่วงที่หนึ่งจำนวนเซลล์ยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง มีจำนวนน้อย เมื่อใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $0.2 \times 10^5 - 0.8 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม ช่วงที่สองจำนวนเซลล์ยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง มีจำนวนปานกลาง เมื่อใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1.6 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม และช่วงที่ 3 จำนวนเซลล์ยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง มีจำนวนมาก เมื่อใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $2.4 \times 10^5 - 3.2 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม

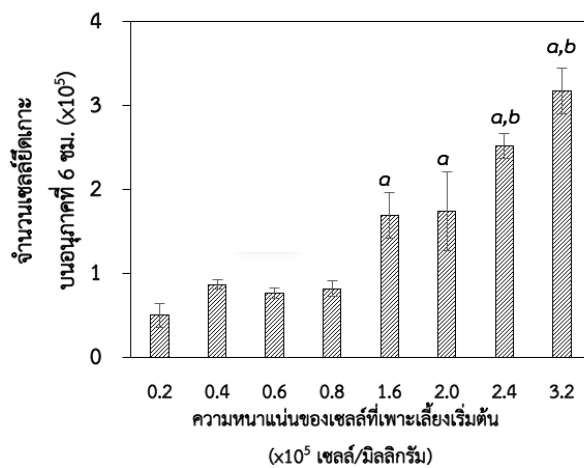
สำหรับผลการทดลองจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคช่วงที่หนึ่งนั้น (ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $0.2 \times 10^5 - 0.8 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม) พบว่า จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคของความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.4×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม มีค่ามากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.4×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม มาทดสอบในการทดลองต่อไป ผลการทดลองจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคในช่วงที่สอง (ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $1.6 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม) จำนวนเซลล์และร้อยละการยึดเกาะบนอนุภาคมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกความหนาแน่น 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม มาทดสอบในการทดลองต่อไป และผลการทดลองจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคในช่วงที่สาม (ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $2.4 \times 10^5 - 3.2 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม) เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม จะมีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง ที่สูงกว่า ดังนั้นจึงเลือกความหนาแน่นนี้มาทดสอบในการทดลองต่อไป

ผู้วิจัยได้ทำการเลือกความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ได้แก่ 0.4×10^5 , 1.6×10^5 และ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม เนื่องจากในช่วงความหนาแน่นดังกล่าว ให้ค่าปริมาณการยึดเกาะของเซลล์และร้อยละการยึดเกาะแตกต่างกัน เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาผลของความหนาแน่นของ

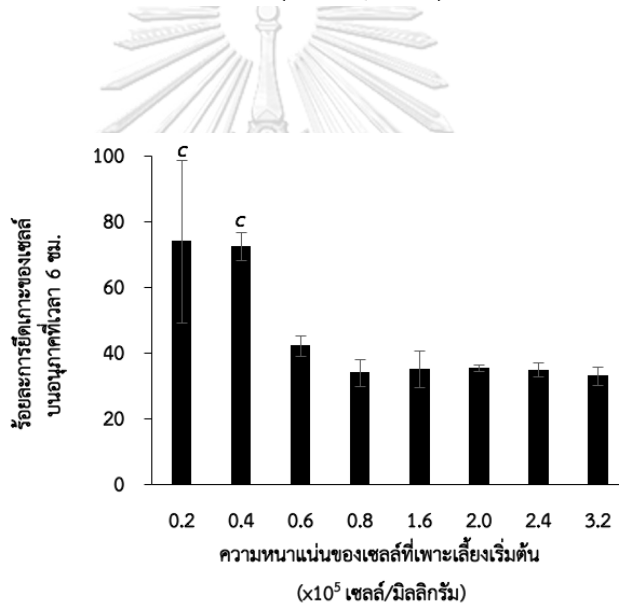
เซลล์เริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังบนอนุภาคขนาดไมครอน โดยจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป



(ก.)



(ข.)



รูปที่ 4.9 (ก) จำนวนเซลล์ผิวหนังหนูที่ยืดเกาะบนอนุภาคที่เวลา 6 ชม. (ข) ร้อยละการยืดเกาะของเซลล์ผิวหนังหนูบนอนุภาคที่เวลา 6 ชม. ภายหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.2×10^5 , 0.4×10^5 , 0.6×10^5 , 0.8×10^5 , 1.6×10^5 , 2.0×10^5 , 2.4×10^5 และ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม บนอนุภาคเจลาติน (100/0) 3 มิลลิกรัม

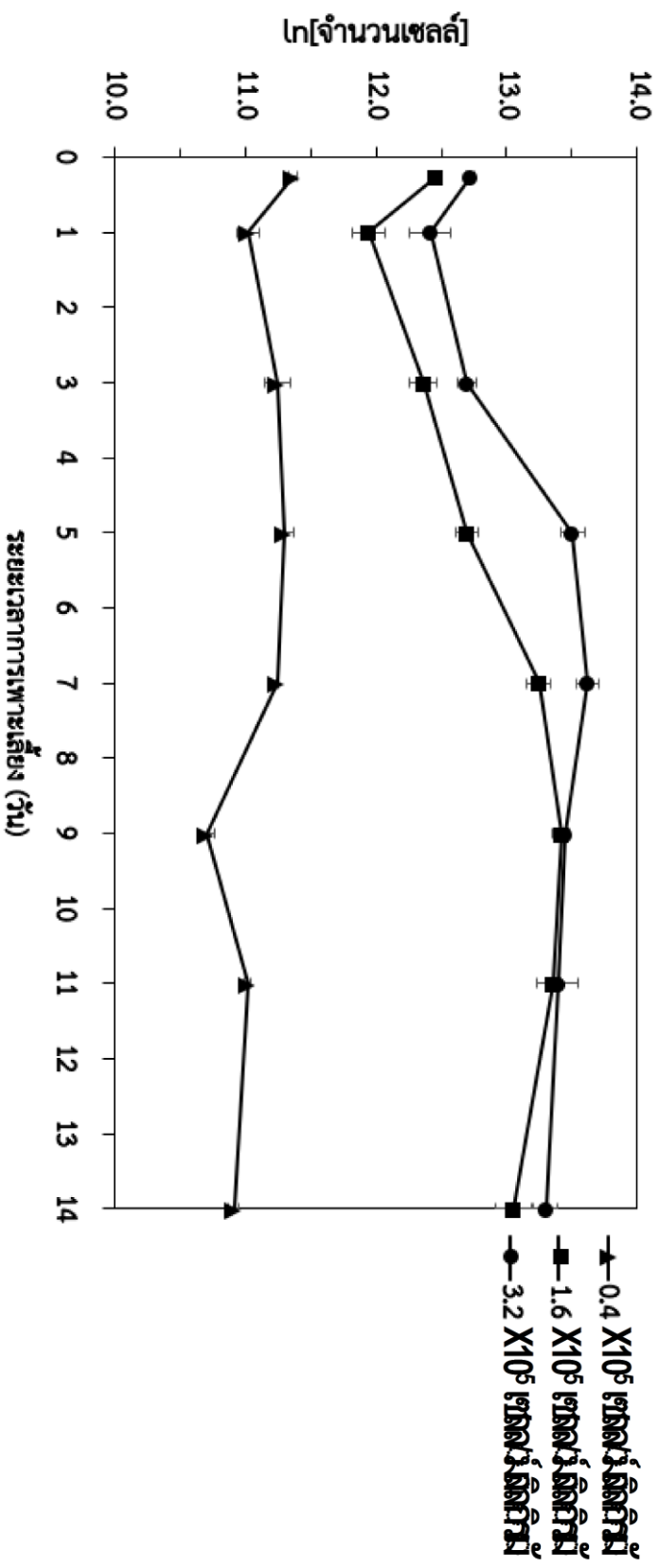
(a, b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการยืดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง

c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่ยืดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง)

ข. ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังบนอนุภาค

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังบนอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาติน (100/0) โดยเปรียบเทียบความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น ได้แก่ 0.4×10^5 , 1.6×10^5 และ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาค 3 มิลลิกรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก ๆ 2 วัน และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.4×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.8×10^5 เซลล์ และไม่พบเซลล์ยึดเกาะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 1, 3 และ 5 วัน เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคขนาดไมครอน จำนวน 3 มิลลิกรัม มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นน้อยเกินไป ส่งผลให้เกิดการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ลดลง (cell-cell interaction) การผลิตสารต่าง ๆ ที่สนับสนุนการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลง ดังนั้นเซลล์ไม่สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ (Ahmad AAKaMR และคณะ (2015))

ทั้งนี้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.6×10^5 และ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม จะพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และเวลาแบ่งตัวที่วี่คุณของเซลล์บนอนุภาคมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม มีจำนวนเซลล์ที่มากเกินไป ทำให้อาหาร อากาศ และพื้นที่ในการยึดเกาะของเซลล์ไม่เพียงพอ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง และเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยต่อไป



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ผิวหนังที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาติน (100/0) ที่มีขนาดต่ออนุภาคในช่วง 75-100 μm จำนวน 3 มิลลิกรัม เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.4×10^5 , 1.6×10^5 และ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาพปลอดเชื้อที่มี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.5 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนูเป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.4×10^5 , 1.6×10^5 และ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม

จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์	ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น ($\times 10^5$ เซลล์/มิลลิกรัม)		
	0.4	1.6	3.2
จำนวนเซลล์ยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง	0.86 ± 0.06^a	2.59 ± 0.07	3.34 ± 0.99
ร้อยละการยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง	71.94 ± 5.09^a	53.86 ± 1.36	34.76 ± 10.36
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($\times 10^{-2}$ ชั่วโมง ⁻¹)	-	1.66	1.69
เวลาแบ่งตัวทวีคูณ (ชั่วโมง)	-	41.78	40.99

หมายเหตุ – หมายถึง ไม่สามารถคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาแบ่งตัวทวีคูณได้ (a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และ เวลาแบ่งตัวทวีคูณ เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นแตกต่างกัน)

4.2.2 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคไมครอน

4.2.2.1 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคที่มีอัตราส่วนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยแตกต่างกัน

การศึกษาผลของอัตราส่วนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนูและมะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมครอนขนาด 75-100 ไมโครเมตร ที่มีอัตราส่วนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย (G/SF) แตกต่างกันคือ 100/0 90/10 และ 80/20 ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ตามลำดับ ในหลอดกันกลม (cryovial) ขนาด 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน และวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลาต่าง ๆ ด้วยเทคนิค MTT assay

จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ L929 และ CaSki บนอนุภาคไมโคร ดังแสดงรูปที่ 11 พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ L929 และ CaSki สามารถยึดเกาะได้ดีบนอนุภาคที่มีอัตราส่วนเจลาตินมาก กล่าวคือ อนุภาคเจลาติน (G100/SF0) มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะสูงที่สุด คือ 68.70 ± 7.56 และ 62.87 ± 4.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากเจลาตินมีองค์ประกอบของลำดับอะมิโนอาร์จีตี (RGD sequence) ซึ่งเป็นลำดับของกรดอะมิโนสามตัวคือ อาร์จินีน ไกลซีน และกรดแอสพาทิก โดยลำดับกรดอะมิโนนี้ สามารถจับกับอินทิกริน (integrin) ซึ่งเป็นโมเลกุลของโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยพันธะโควาเลนต์ นอกจากนี้ลำดับอาร์จีตียังช่วยในการกระตุ้นการแผ่ (spreading) และการย้ายที่ (migration) ของเซลล์ ดังนั้นพื้นผิวของวัสดุที่มีลำดับอาร์จีตีจึงช่วยส่งเสริมการเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดี (Bellis SL (2011))

เซลล์ L929 และ CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย พบว่ามีช่วง lag phase (ระยะพัก) ประมาณ 1-3 วัน ซึ่งมีระยะที่สั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 และ CaSki แบบ 2 มิติ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ซึ่งมีระยะเวลา lag phase 4 และ 5 วัน ตามลำดับ เนื่องมาจาก ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ บนอนุภาคไมโครนั้น ใช้วิธี Agitation seeding ทำให้เซลล์มีโอกาสสัมผัสกับพื้นผิวอนุภาคได้อย่างต่อเนื่อง เพราะมีการให้แรงกวดด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เซลล์สามารถยึดเกาะบนอนุภาคได้มาก ดังนั้นระยะเวลาของช่วง lag phase จึงสั้นกว่า ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์เข้าสู่ระยะ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) ได้เร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ (Paolo Arosio และคณะ (2015)) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 และ CaSki บนอนุภาคเป็นเวลา 14 วัน พบว่า บนอนุภาคที่มีองค์ประกอบของเจลาตินมาก มีจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดีที่สุด กล่าวคือ อนุภาคไมโครของเจลาติน (G100/SF0) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาแบ่งตัวทวีคูณที่สูงที่สุด ดังตารางที่ 4.6 หรืออาจกล่าวได้ว่า เมื่อมีจำนวนของเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคที่สูงที่สุด ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่สูงที่สุดเช่นกัน จากรายงานของ Brackenbury WJ. และคณะ (2013) ได้รายงานค่า ศักย์ไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ fibroblast มีค่าอยู่ในช่วง -20 ถึง -30 และ ค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็ง มีค่าอยู่ในช่วง -10 ถึง -20 ดังนั้นเซลล์ L929 และ CaSki จึงสามารถยึดเกาะได้ดีในพื้นที่ที่มีประจุบวก ซึ่งพื้นผิวที่มีองค์ประกอบของเจลาตินที่มาก จะมีประจุบริเวณพื้นผิว

ที่เป็นบวกมากเช่นกัน นอกจากนั้นแล้ว เซลล์ยังสามารถยึดเกาะได้ดีบนพื้นผิวที่มีความชอบน้ำสูง (hydrophilicity) กล่าวคือ อนุภาคที่มีองค์ประกอบของเจลาตินมาก จะมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้สูงเช่นกัน ดังนั้นอนุภาคที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบมาก จึงมีจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Verma S. และ Kumar N. (2010) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง Osteoblast (MG-63) บนอนุภาคไมโคร PLGA และอนุภาคไมโคร PLGA ที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยสายโซ่โปรตีนเพื่อให้พื้นผิววัสดุมีความชอบน้ำสูงขึ้น ซึ่งพื้นผิวของอนุภาคมีค่ามุมสัมผัสน้ำเท่ากับ 65.93° และ 57.21° และพบว่าที่ระยะการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาค PLGA และอนุภาค PLGA ที่ได้รับการปรับปรุงพื้นผิว มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะ เท่ากับ 3.2×10^4 และ 7.3×10^4 เซลล์ แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของวัสดุที่มีความชอบน้ำมากกว่า จะสนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่า ทั้งนี้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 และ CaSki ที่เวลา 11 ถึง 14 วันนั้น พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่ลดลง หรืออยู่ในช่วง death phase เนื่องจากอนุภาคเกิดการย่อยสลาย จากการทดสอบที่ผ่านมามีการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคไมโครด้วยเอนไซม์โปรตีเอส XIV ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าอนุภาคสามารถย่อยสลายได้สมบูรณ์ในระยะ 10 วัน โดยอนุภาคที่มีองค์ประกอบของเจลาตินสูงที่สุด จะมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพเร็วที่สุด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ในระบบการเลี้ยงเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์ลดลงในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ อาจเป็นสาเหตุมาจาก อนุภาคเกิดการย่อยสลาย โดยสังเกตได้ว่า เซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยง บนอนุภาคเจลาติน (G100/SF0) จะมีอัตราการตายของเซลล์ที่สูงที่สุด คือ 1.13×10^{-2} ชั่วโมง⁻¹ เมื่อเทียบกับอนุภาคที่มีองค์ประกอบของไฟโบรอินไหมไทย 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอัตราการตายของเซลล์ L929 เกิดขึ้นเท่ากับ 0.21×10^{-2} และ 0.86×10^{-2} ชั่วโมง⁻¹ และสำหรับเซลล์มะเร็ง CaSki พบว่าค่าอัตราการตายของเซลล์มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติและมีค่าสูงกว่าอัตราการตายของเซลล์ L929 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกอนุภาคไมครอนของเจลาติน (G100/SF0) มาศึกษาผลของขนาดต่อจลศาสตร์ของเซลล์ในการทดลองต่อไป เนื่องจากจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคเจลาตินมีค่าสูงที่สุด

4.2.2.2 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคที่มีปริมาณเนื้อสารรวมแตกต่างกัน

การศึกษาผลของเนื้อสารรวมของเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู L929 และมะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมครอนขนาด 75-100 ไมครอนเมตร ที่มีความเข้มข้นของสารละลายในขั้นตอนการขึ้นรูปอนุภาคแตกต่างกัน คือ 2.5 5 และ 7.5 %โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ตามลำดับ ในหลอดกันกลม (cryovial) ขนาด 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน และวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลาต่าง ๆ ด้วยเทคนิค MTT assay

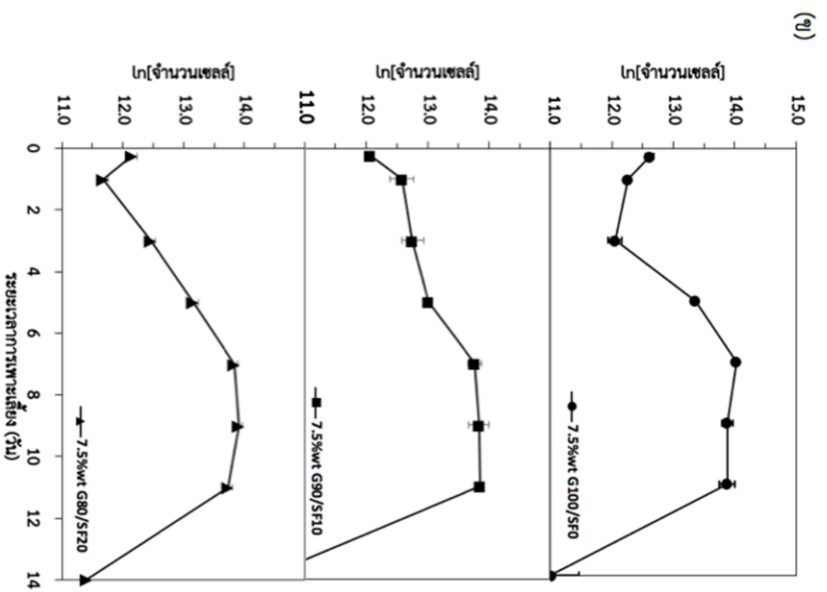
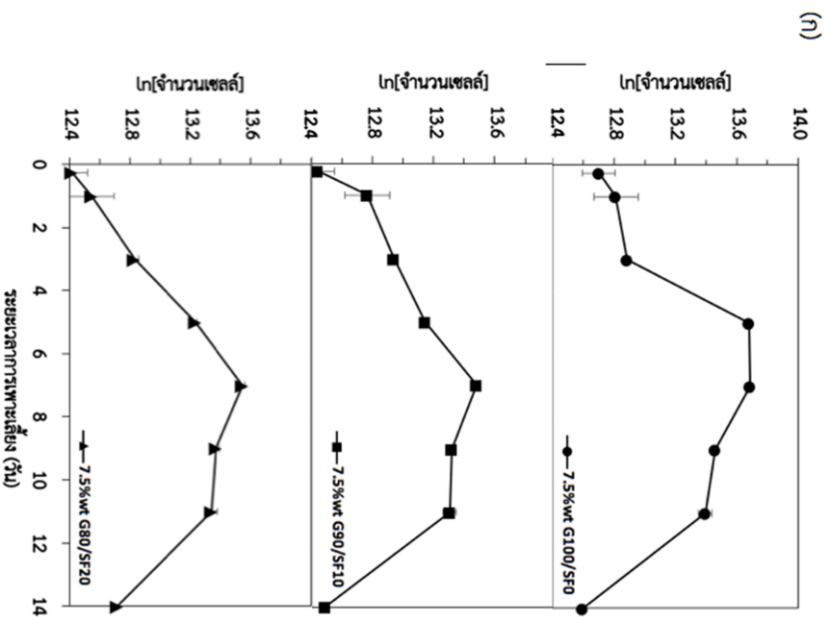
จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ L929 และ CaSki บนอนุภาคไมโคร ดังแสดงรูปที่ 12 พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีความเข้มข้นของสารละลายในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคแตกต่างกัน จำนวนเซลล์ L929 และ CaSki ที่ยึดเกาะบนอนุภาคที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง พบว่า อนุภาคที่มีปริมาณเนื้อสารน้อยที่สุด จะมีจำนวนเซลล์ยึดเกาะที่สูงที่สุด และจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมง มีแนวโน้มลดลงเมื่ออนุภาคมีปริมาณเนื้อสารรวมที่มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคที่มีความเข้มข้นของสารละลายน้อยที่สุด (2.5 %โดยน้ำหนัก) ในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาค มีความหนาแน่นของอนุภาคที่ต่ำ ดังนั้นจำนวนอนุภาคทั้งหมดในน้ำหนัอนุภาค 3 มิลลิกรัม จึงมีจำนวนสูงที่สุด ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวรวมมีมากกว่า อนุภาคที่มีปริมาณเนื้อสารรวมสูง ดังนั้นเมื่อพื้นที่ผิวสูง จึงมีโอกาที่เซลล์สามารถยึดเกาะได้มากกว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง และจากการทดลองนี้พบว่า ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วง lag phase เมื่อเพาะเลี้ยงบนอนุภาค (3 มิติ) มีระยะเวลาของ lag phase ที่สั้นกว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (2 มิติ) เช่นกัน ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 และ CaSki ที่มีปริมาณเนื้อสารรวมแตกต่างกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคที่มีความเข้มข้นของสารละลายในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคเท่ากับ 5 %โดยน้ำหนัก ดีที่สุด คือมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.17×10^{-2} และ 1.88×10^{-2} ตามลำดับ ทั้งนี้อนุภาคที่มีเนื้อสารรวมแตกต่างกันนี้ มีอัตราส่วนของเจลาตินและไฟโบ

รอินไหมไทยที่เท่ากันคือ G80/SF20 ดังนั้นคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี หรือชีวภาพของวัสดุบางประการอาจไม่มีความแตกต่างกันมากนัก เช่น ประจุที่แสดงบนพื้นผิวอนุภาค แต่มีคุณสมบัติหนึ่งที่แตกต่างกันคือ ความแข็งของอนุภาค (stiffness) ทำให้จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์มีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปเซลล์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่ค่อนข้างแข็ง (Amornsudthiwat P และคณะ (2014)) และจากผลการทดลองนี้คือ อนุภาคที่มีความเข้มข้นของสารละลายในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคต่ำที่สุดเท่ากับ 2.5 %โดยน้ำหนัก มีจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ต่ำที่สุด นอกจากนี้ ระยะการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคที่เวลาเท่ากับ 7 วัน พบว่าอนุภาคขนาดไมครอนที่มีความเข้มข้นของสารละลายในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคแตกต่างกัน มีเซลล์ L929 และ CaSki ยึดเกาะบนอนุภาคมากที่สุด โดยมีประมาณ 7×10^5 ถึง 8×10^5 และ 7×10^5 ถึง 11×10^5 ตามลำดับ ทั้งนี้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 และ CaSki ที่เวลา 11 ถึง 14 วันนั้น พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่ลดลง หรืออยู่ในช่วง death phase ซึ่งให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกันกับการทดลองก่อนหน้านี้ เนื่องจากอนุภาคเกิดการย่อยสลาย ทำให้ไม่มีพื้นที่ผิวที่มากพอสำหรับการยึดเกาะของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้น จากตารางที่ 4.7 สังเกตได้ว่าอัตราการตายของเซลล์ L929 และ CaSki บนอนุภาคที่มีความเข้มข้นของสารละลายในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคเท่ากับ 2.5 %น้ำหนัก มีอัตราการตายที่ต่ำที่สุด เท่ากับ 0.04×10^{-2} และ 0.52×10^{-2} ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกอนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีเนื้อสารรวม 5 %น้ำหนัก มาศึกษาผลของขนาดต่อจลศาสตร์ของเซลล์ในการทดลองต่อไป เนื่องจากจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีเนื้อสารรวม 5 %น้ำหนัก มีค่าสูงที่สุด

ตารางที่ 4.6 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังกู L929 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki บนอนุภาคไมครอนเจลลาตอ และไฟเบอร์อินที่อัตราส่วนต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาพปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์

จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์	เซลล์ L929				เซลล์ CaSki			
	G100/SF0	G90/SF10	G80/SF20	G100/SF0	G90/SF10	G80/SF20		
ร้อยละการยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง	68.70±7.56 ^a	52.83±2.78	51.61±3.63	62.87±4.56 ^a	36.19±1.34	39.51±3.19		
μ (x10 ⁻² h ⁻¹)	1.65 ^a	0.49 ^a	0.70 ^a	2.05 ^a	1.58	1.50		
PDT (h)	41.78 ^a	139.06 ^a	99.62 ^a	33.84 ^a	43.86	46.21		
จำนวนเซลล์สูงสุด (x10 ⁵)	8.84	7.17	7.65	12.35	10.47	11.02		
อัตราการตาย (x10 ⁻² h ⁻¹)	1.13	0.21	0.86	3.98	4.98	3.23		

(a) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบ ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เวลาแบ่งตัววิกฤต และอัตราการตาย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอนุภาคที่มีอัตราส่วน G/SF แตกต่างกัน)

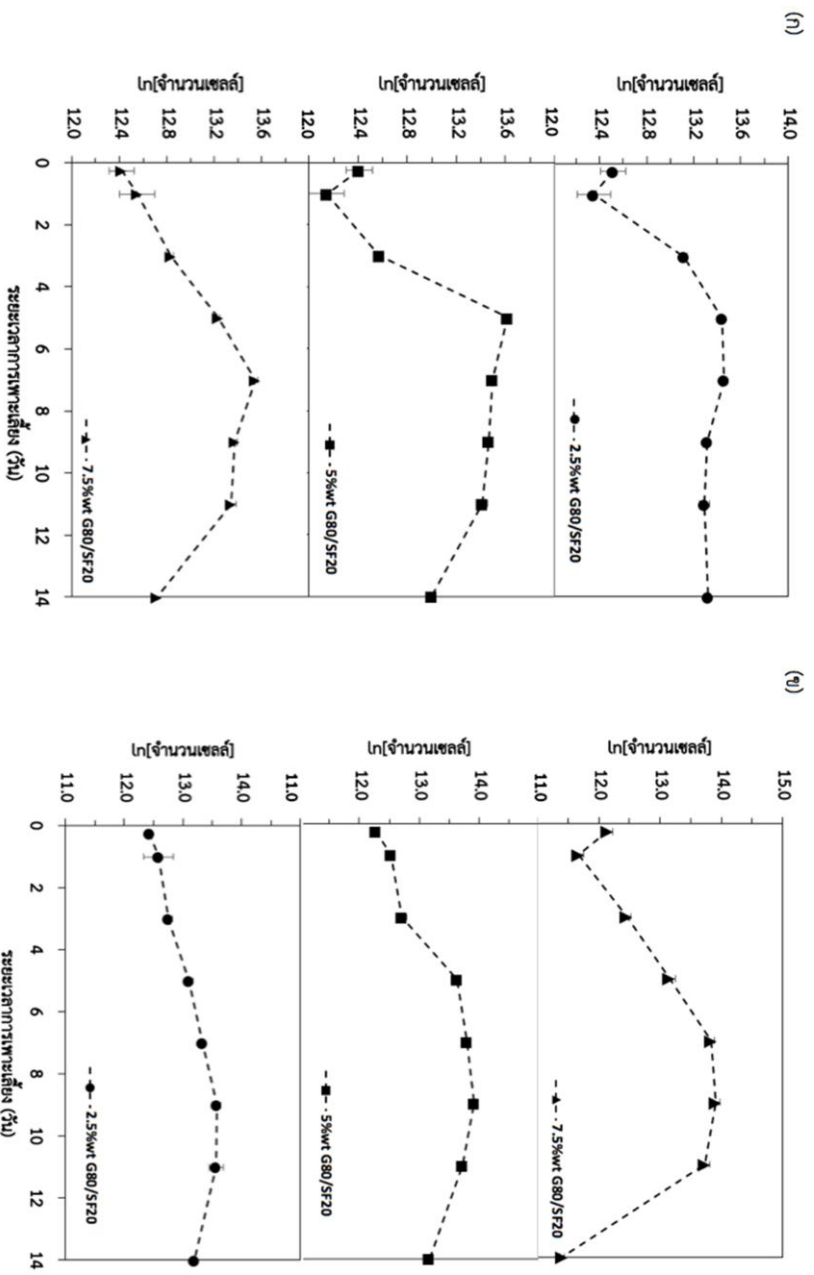


รูปที่ 4.11 (ก.) จำนวนเซลล์ที่ผิวของหนังหมู L929 (ข) จำนวนเซลล์มะเร็ง CasKi ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาค G100 , อนุภาค G90SF10 และอนุภาค G80SF20 (7.5%โดยน้ำหนัก) จำนวน 3 มิลลิกรัม เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาพปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.7 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวทงหนู L929 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก CasKi บนอนุภาค ไมครอนเจลตาอนและไฟเบอร์อินทิมปริมาณเนื้อสารรวมแตกต่างกัน เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ตามลำดับ ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาพปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์

จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์	เซลล์ L929				เซลล์ CasKi		
	2.5 %wt	5 %wt	7.5 %wt	2.5 %wt	5 %wt	7.5 %wt	
ร้อยละการยืดเกาะที่ 6 ชั่วโมง	56.88±5.43	51.41±7.71	51.61±3.63	51.86±2.58 ^a	44.12±1.90	39.51±3.19	
μ ($\times 10^2 h^{-1}$)	1.13 ^a	2.17 ^a	0.70 ^a	0.55 ^a	1.88	1.50	
PDT (h)	61.39 ^a	31.96 ^a	99.62 ^a	126.54 ^a	36.82	46.21	
จำนวนเซลล์สูงสุด ($\times 10^5$)	7.05	8.22	7.65	7.86	10.97	11.02	
อัตราการตาย ($\times 10^2 h^{-1}$)	0.04	0.57	0.86	0.52	0.76	3.23	

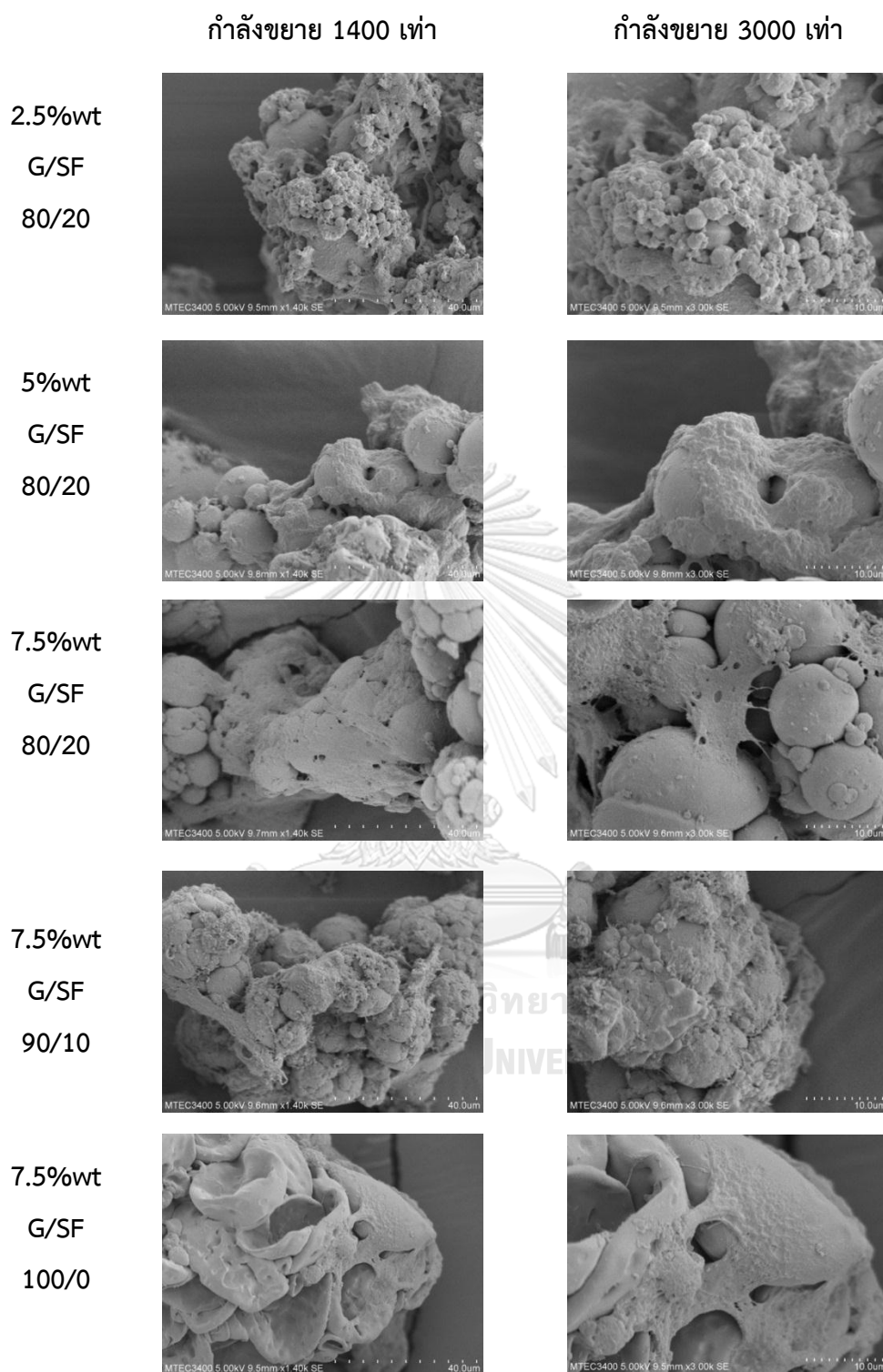
(a) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบ ร้อยละการยืดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เวลาแบ่งตัวทงหนู และอัตราการตาย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอนุภาคที่มีปริมาณเนื้อสารรวมแตกต่างกัน)



รูปที่ 4.12 (ก.) จำนวนเซลล์ผิวหนังหนู L929 (ข) จำนวนเซลล์มะเร็ง CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคที่มีเนื้อสารรวม 2.5 5 และ 7.5%โดยน้ำหนัก จำนวน 3 มิลลิกรัม เมื่อใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และ MEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์

4.2.2.3 ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่มีอัตราส่วนเจลาตินและไฟโบรอินแตกต่างกันและเนื้อสารรวมแตกต่างกัน

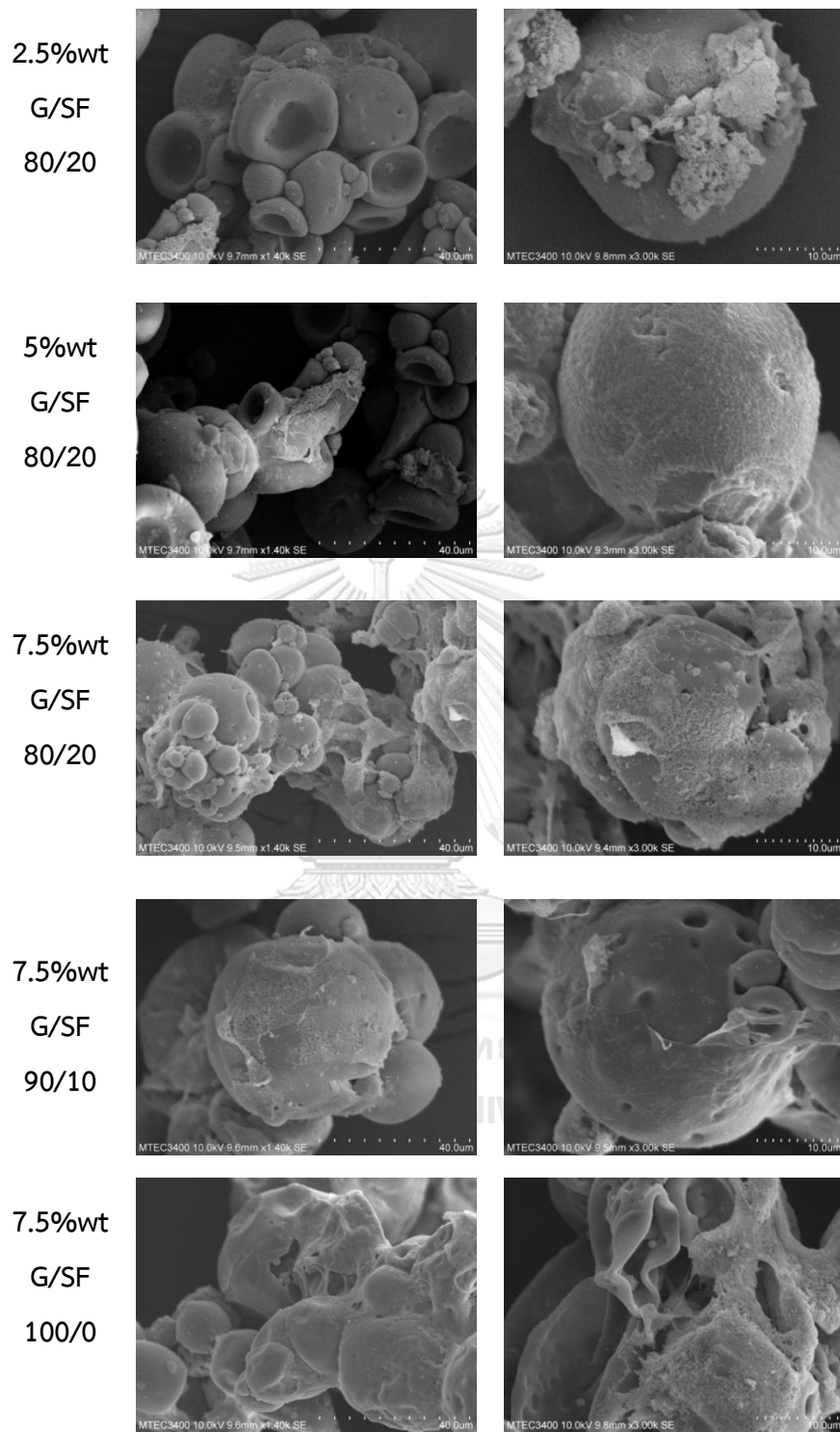
ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ผิวหนังบนอนุภาคขนาดไมครอนขนาดช่วง 75-100 μm ของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน สามารถตรวจสอบได้ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าอนุภาคขนาดไมครอนทุกอัตราส่วนการผสม และทุกความเข้มข้นของแข็งรวมที่ใช้ จะมีลักษณะการยึดเกาะของเซลล์คล้ายคลึงกัน คือ เซลล์จะยึดเกาะระหว่างอนุภาค เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์มีการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์บนอนุภาคจนทำให้แต่ละอนุภาคเกิดการเกาะติดกัน รวมกลุ่มกันเป็นกลุ่มอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Rui Chen และคณะ (2006) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ human chondrosarcoma line OUMS-27 บนอนุภาคไมครอนขนาด 100-200 μm ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด DMEM และวิเคราะห์ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งสามารถสังเกตได้ว่าเซลล์ยึดเกาะบนอนุภาคไมครอนในลักษณะการแผ่ขยายบนอนุภาค ทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาค ซึ่งลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคขนาดไมครอน คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Cheng D และคณะ (2013) ได้ศึกษาลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ Human osteosarcoma (MG-63 cell line) บนอนุภาคไมครอน PLGA ขนาดเฉลี่ย 225 μm ที่เวลา 11 วัน พบว่าส่วนใหญ่เซลล์ยึดเกาะกันระหว่างอนุภาค ทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคไมครอน



รูปที่ 4. 13 แสดงการยึดเกาะของเซลล์ผิวหนังหนูบนอนุภาคไมครอนของเจลลาตินและไฟโบรอิน หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 1400 และ 3000 เท่า

กำลังขยาย 1400 เท่า

กำลังขยาย 3000 เท่า



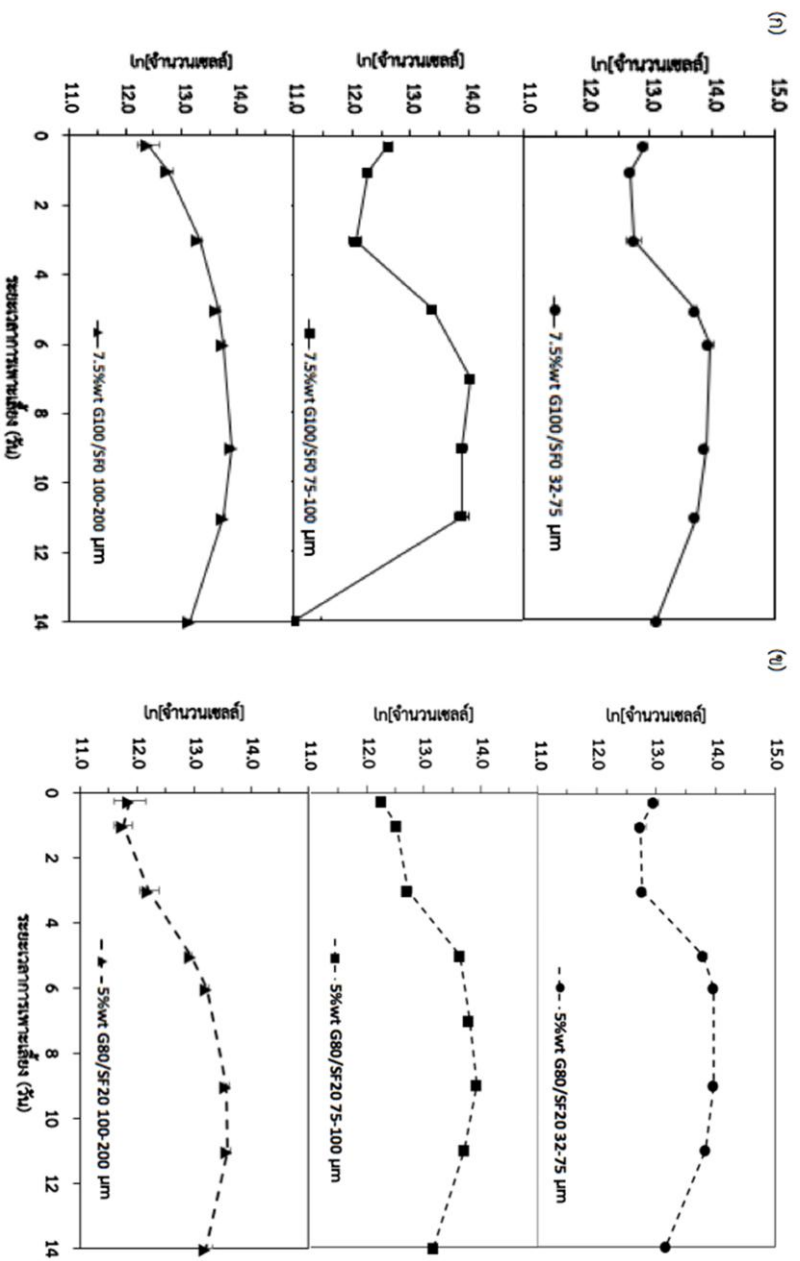
รูปที่ 4.14 แสดงการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนอนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 1400 และ 3000 เท่า

4.2.2.4 จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ CaSki บนอนุภาคที่มีขนาดแตกต่างกัน

การศึกษาผลของขนาดอนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมครอนของเจลาติน (7.5%น้ำหนัก G100) และ อนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน (5%น้ำหนัก G80/SF20) ที่มีขนาด 32-75, 75-100 และ 100-200 ไมโครเมตร ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ในหลอดกันกลม (cryovial) ขนาด 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน และวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลาต่าง ๆ ด้วยเทคนิค MTT assay

จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ CaSki บนอนุภาคไมครอนของเจลาติน ที่มีขนาดแตกต่างกัน ดังแสดงรูปที่ 4.15 พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตบนอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ CaSki สามารถยึดเกาะได้ดีบนอนุภาคเจลาติน (7.5%น้ำหนัก G100) และ อนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน (5%น้ำหนัก G80/SF20) ที่มีขนาดเล็กกล่าวคือ อนุภาคขนาด 32-75 ไมครอน มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะสูงสุด คือ 85.27 ± 4.86 และ 88.05 ± 7.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และร้อยละการยึดเกาะของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้น เนื่องจาก อนุภาคที่ขนาดเล็กกว่าจะมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่มากกว่า ในอนุภาคไมครอนที่มีปริมาตรที่เท่ากัน ส่งผลให้อนุภาคเล็กมีพื้นที่ผิวในการยึดเกาะของเซลล์ที่มากกว่า ดังนั้นจึงเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาค เซลล์ CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโครของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย พบว่ามีช่วง lag phase (ระยะพัก) ประมาณ 1-3 วัน ซึ่งมีระยะที่สั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ CaSki แบบ 2 มิติ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ซึ่งมีระยะเวลา lag phase 5 วัน ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกันกับการทดลองก่อนหน้านี้ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ CaSki บนอนุภาคเป็นเวลา 14 วัน พบว่า บนอนุภาคที่มีขนาด 32-75 และ 75-100 ไมครอน มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของอนุภาคทั้ง 2 สูตร แสดงดังตารางที่ 4.8 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ CaSki มีขนาดประมาณ 50-80 ไมครอน ซึ่งมีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของอนุภาคไมครอน (32-100 ไมครอน) ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของขนาดอนุภาคไมครอนได้ และเซลล์อาจเข้าใจว่าพื้นที่ผิวที่ยึดเกาะ เป็น

ลักษณะพื้นผิวที่มีความขรุขระ ทำให้เซลล์ยึดเกาะกันระหว่างอนุภาค ดังแสดงในรูปที่ 4.16 จึงส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตและเวลาแบ่งตัวทวีคูณที่สูงที่สุดของเซลล์บนอนุภาคขนาด 32-100 ไมครอน มีค่าสูงที่สุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าพื้นผิวยึดวัสดุที่มีลักษณะขรุขระ จะมีจำนวนเซลล์ยึดเกาะ อัตราการเจริญเติบโตและเวลาแบ่งตัวทวีคูณที่สูงกว่า พื้นผิวที่มีลักษณะผิวเรียบ จากงานวิจัยของ Yuchang และคณะ (2010) ได้เปรียบเทียบจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่บนอนุภาคไมครอน PLGA (ขนาด 132-156 ไมครอน) ที่มีลักษณะพื้นผิวเรียบและพื้นผิวขรุขระที่ถูกปรับปรุงด้วยคอลลาเจน พบว่าอนุภาคที่มีพื้นผิวขรุขระมีจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ที่สูงกว่า ($\mu = 5.73 \times 10^{-3}$ ชั่วโมง⁻¹, PDT=120.9 ชั่วโมง) เนื่องจากอนุภาคที่มีพื้นที่ผิวขรุขระสามารถเพิ่มการไหลเวียนของอาหารได้สูงกว่าและเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสบนอนุภาค ส่งผลให้จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่า และจากการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า (32-100 ไมครอน) มีจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า (100-200 ไมครอน) เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กมีพื้นที่ผิวที่มากกว่าส่งผลให้ที่จำนวนเซลล์ยึดเกาะที่สูง ดังนั้นการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์จึงเกิดได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สวรรยา และคณะ (2014) ได้ศึกษาจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม บนอนุภาคไมครอนของเจลาติน (10%น้ำหนัก G100/SF0) และอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย (10%น้ำหนัก G50S/F50) ที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 317, 556 และ 737 ไมโครเมตร พบว่าอนุภาคขนาดเล็กที่สุดมีจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดีที่สุด คือ มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 6.4×10^{-3} และ 6.1×10^{-3} ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Xin Hao Zhu และคณะ (2006) ได้ศึกษาอิทธิพลของขนาดต่อจลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับบนอนุภาคไมครอนของ PHBV ที่มีขนาด 153, 242 และ 362 ไมครอน พบว่าจำนวนเซลล์ที่เกาะบนอนุภาคขนาด 153 ไมครอน ที่เวลา 2, 4, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ยึดเกาะสูงที่สุด หรือกล่าวได้ว่าขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุด มีค่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงที่สุด



รูปที่ 4. 15 จำนวนเซลล์และแรงปฏิกิริยาที่ปรากฏจากกราฟที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาค (ก.) อนุภาคเจลาติน G100 7.5 %น้ำหนัก (ข.) อนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทย G80/SF20 5 %น้ำหนัก ขนาด 32-75, 75-100 และ 75-100 μm ตามลำดับ เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาพปลอดเชื้อที่มี CO_2 5 %

ตารางที่ 4.8 จุลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบรวมกลุ่ม CaSki บนอนุภาคไมโครอนเจลาตินและไฟโบรอินที่มีขนาดแตกต่างกัน เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์

จุลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์	อนุภาคเจลาติน G100 7.5 %น้ำหนัก			อนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทย G80/SF20 5 %น้ำหนัก		
	32-75 μm	75-100 μm	100-200 μm	32-75 μm	75-100 μm	100-200 μm
ร้อยละการยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง	85.27 \pm 4.86 ^a	62.87 \pm 4.56	47.47 \pm 6.94	88.05 \pm 7.68 ^a	44.12 \pm 1.9	30.80 \pm 7.43
μ ($\times 10^{-2} \text{h}^{-1}$)	2.03	2.04	0.89 ^a	2.14	1.88	0.93 ^a
PDT (h)	34.12	33.88	74.93 ^a	32.42	36.82	74.22 ^a
อัตราการตาย ($\times 10^{-2} \text{h}^{-1}$)	0.86	3.98	0.82	0.93	0.76	0.54

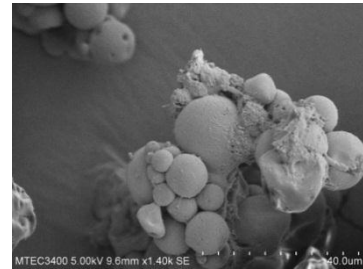
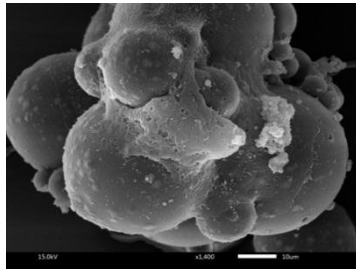
(a) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบ ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคที่เวลา 6 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เวลาแบ่งตัวที่คูณ และอัตราการตาย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอนุภาคที่มีปริมาณเนื้อสารรวมแตกต่างกัน)



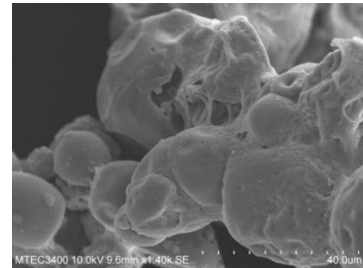
อนุภาค 5% โดยน้ำหนัก G80SF20

อนุภาค 7.5 %โดยน้ำหนัก G100

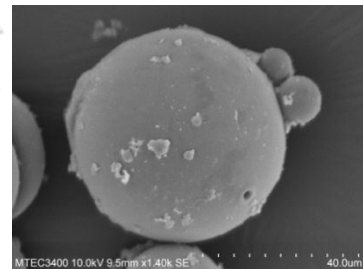
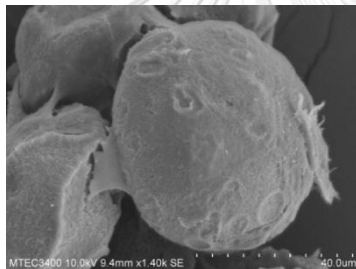
ขนาด
32-75 μm



ขนาด
75-100 μm



ขนาด
100-200 μm



รูปที่ 4.16 แสดงการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนอนุภาคไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอิน ที่มีขนาดต่างกัน หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 1400 เท่า

4.3 ผลการศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในสัตว์ทดลอง

ในการศึกษาผลของการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในสัตว์ทดลอง มีวัตถุประสงค์ที่ต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยเปรียบเทียบวิธีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกสู่สัตว์ทดลองแบบปกติ

จากการศึกษาผลของการเจริญเติบโตของเซลล์บนอนุภาคไมครอน พบว่าเซลล์ปากมดลูกสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคเจลาติน (G100) ที่มีความเข้มข้นของแข็งรวม 7.5 %โดยน้ำหนัก ขนาด 32-75 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่ฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ขนาด 27G (0.41x12.7 มิลลิเมตร) ได้ดี ดังนั้นในการทดลองการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก ผู้วิจัยได้เลือกอนุภาคเจลาติน (G100) ที่มีความเข้มข้นของแข็งรวม 7.5 %โดยน้ำหนัก มาทำการทดลองนี้

การทดลองนี้ใช้หนูชนิดไมซ์สายพันธุ์ BALB/c น้ำหนัก 20-25 กรัม อายุ 8 สัปดาห์ จากบริษัท Nomura Siam International Co., Ltd ถูกเลี้ยงตามแนวปฏิบัติของ Home office guideline on scientific use of animal (scientific procedures) Act 1986 และควบคุมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 60 ± 10 วงจรการให้แสง 12 ชั่วโมง สว่าง 12 ชั่วโมงมืด มีการถ่ายเทอากาศเพียงพอ ดูแลให้อาหารและน้ำที่อาคารพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยได้ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปากมดลูกชนิด CaSki โดยตรง จำนวน 2×10^6 เซลล์ ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (n=2)

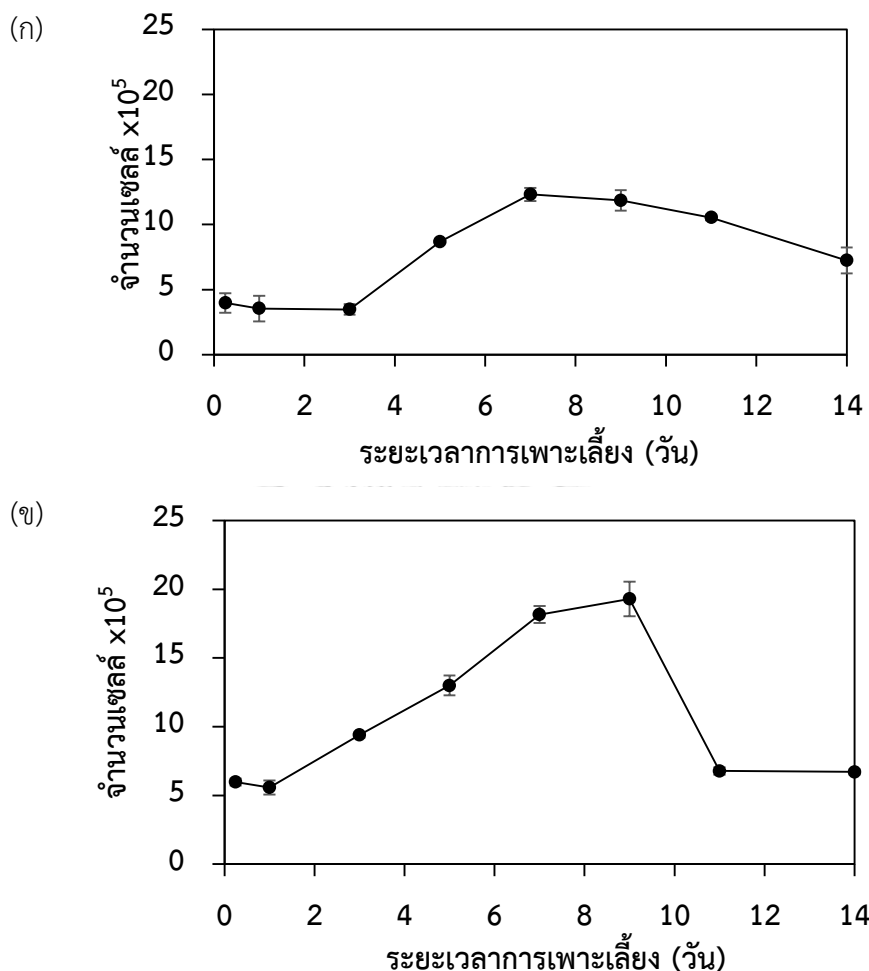
กลุ่มที่ 2 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปากมดลูกชนิด CaSki จำนวน 1×10^6 เซลล์ ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโคร 3 มิลลิกรัม ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (n=2)

กลุ่มที่ 3 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปากมดลูกชนิด CaSki จำนวน 2×10^6 เซลล์ ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคไมโคร 6 มิลลิกรัม ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (n=2)

กลุ่มที่ 4 การปลูกถ่ายอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน 6 มิลลิกรัม ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (n=1 เนื่องจากหนูทดลองอีก 1 ตัว มีบาดแผลบริเวณหลัง จึงไม่เลือกมาศึกษา)

ในการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงในหนูทดลองของกลุ่มการทดลองที่ 2 จะเตรียมอนุภาคที่มีเซลล์ยึดเกาะ 1×10^6 เซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมครอน 3 มิลลิกรัม เป็นเวลา 7 วัน โดยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม และในกลุ่มการทดลองที่ 3 จะเตรียมอนุภาคที่มีเซลล์ยึดเกาะ 2×10^6 เซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมครอน 6 มิลลิกรัม เป็นเวลา 7 วัน โดยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม รูปที่ 4.17 แสดงจำนวนเซลล์ยึดเกาะบนอนุภาค 3 และ 6 มิลลิกรัม จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคที่เวลา 7 วัน มีจำนวน เท่ากับ 1.23×10^6 และ 1.82×10^6 เซลล์ตามลำดับ ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์ที่ใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ที่คาดไว้เริ่มต้นสำหรับการปลูกถ่าย

เซลล์มะเร็งลงในสัตว์ทดลอง และสำหรับกลุ่มการทดลองที่ 4 จะเตรียมอนุภาค 6 มิลลิกรัม แขนงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เพาะเลี้ยงบน อนุภาคเจลาติน (G100) ที่มีความเข้มข้นของแข็งรวม 7.5 %โดยน้ำหนัก ขนาด 32-75 (ก) อนุภาค G100 3 มิลลิกรัม โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 1.6×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม (ข) อนุภาค G100 3 มิลลิกรัม โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 3.2×10^5 เซลล์/มิลลิกรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้สภาวะปลอดเชื้อที่มี CO_2 เปอร์เซ็นต์

หนูทดลองถูกปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บนหลังบริเวณ dorsal skin-fold chamber ดังแสดงในรูปที่ 4.17 และสังเกตสุขภาพหนูทดลอง โดยการชั่งน้ำหนัก ทุก ๆ 4-5 วัน แสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าหนูทดลองมีน้ำหนักประมาณ 20-26 กรัม ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ปกติ

การศึกษาผลของการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงในสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยได้ประเมินปริมาณของก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นโดยการวัดขนาดด้วย เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ทุก ๆ 4-5 วัน และศึกษาความหนาแน่นหลอดเลือดฝอยเกิดใหม่ (Neocapillary density, NCD) ด้วยวิธี Intravital fluorescence microscopy เมื่อปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกครบ 30 วัน

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักหนูทดลองก่อนฉีด (วันที่0) และหลังปลูกมะเร็งปากมดลูก ณ วันต่าง ๆ

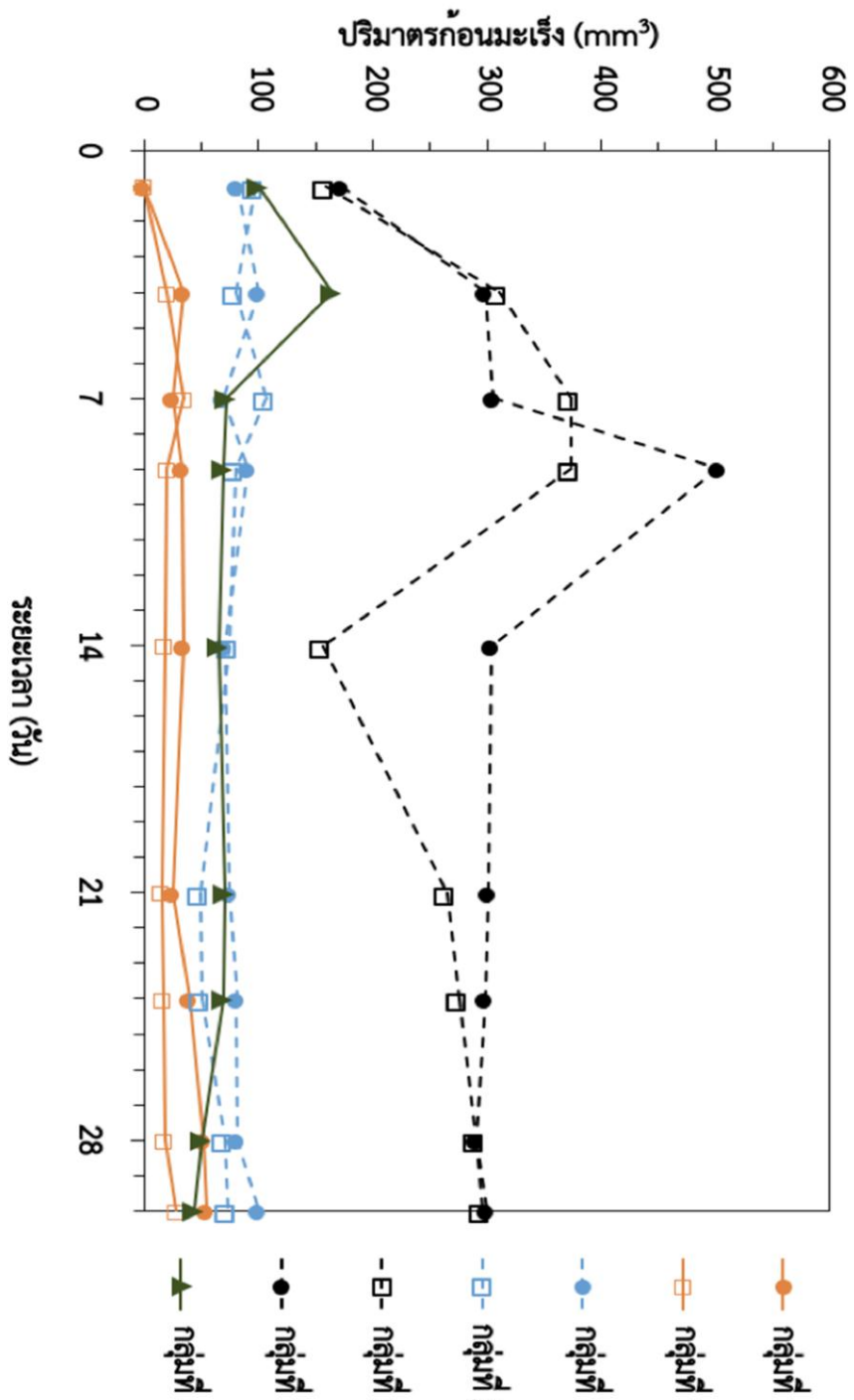
วันที่	น้ำหนัก (กรัม)						
	กลุ่มที่ 1		กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		กลุ่มที่ 4
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1
0	22.96	23.17	22.42	24.10	22.77	24.25	23.16
1	23.02	22.27	22.21	24.83	22.80	23.30	23.40
4	23.47	22.88	22.95	25.70	23.85	24.01	23.46
7	23.61	22.91	22.80	25.23	23.68	23.91	23.79
9	22.44	22.08	22.32	23.93	23.23	24.63	23.40
14	21.81	23.09	23.49	24.46	24.01	24.33	23.60
21	24.59	23.21	22.41	24.62	23.83	24.51	24.06
24	24.50	23.14	22.52	23.10	24.35	23.81	24.06
28	24.15	23.27	21.44	23.02	23.47	24.40	23.96
30	24.62	23.53	22.05	23.30	24.33	24.55	24.64

หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงในสัตว์ทดลอง พบว่าบริเวณผิวหนังที่ฉีดเซลล์มะเร็ง มีลักษณะเป็นตุ่มบวมขึ้นมา ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการอักเสบ ในทุก ๆ กลุ่มการทดลองและในวันที่ 4 หลังการปลูกถ่าย พบว่าสามารถสังเกตเห็นก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้น โดยแสดงปริมาณของกลุ่มก้อนเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในรูปที่ 4.19 ในกลุ่ม การทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งมีปริมาตรเท่ากับ 81-98 และ 159-173 มม³ สำหรับกลุ่มการทดลองที่ 4 สามารถเห็นลักษณะนูนขึ้นมา และคำนวณปริมาตรได้ 100 มม³ และในช่วงวันที่ 7-21 ของการทดลองพบว่า ขนาดก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นมีความแปรปรวนกล่าวคือ ไม่สามารถอธิบายแนวโน้มการเพิ่มหรือลดลงของปริมาตรก้อนมะเร็งได้ แต่ในวันที่ 21 พบว่าหนูทดลอง 1 ตัว ในกลุ่มการทดลองที่ 1 สามารถสังเกตเห็นได้ว่ามีก้อนมะเร็งสองก้อนเกิดขึ้นในบริเวณ

ใกล้เคียงกัน และมีปริมาตรที่ใกล้เคียงกัน คือ 15.52 และ 17.08 มม³ ในวันที่ 21-30 พบว่า ก้อนมะเร็งในกลุ่มการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีปริมาตรที่เพิ่มขึ้น และในกลุ่มการทดลองที่ 4 ลักษณะที่นูนขึ้นมาบริเวณผิวหนัง มีปริมาตรที่ลดลง และในวันที่ 30 ปริมาตรก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นในหนูทดลองกลุ่มที่ 1 เท่ากับ 54.36 และ 25.23-28.47 มม³ (หนูทดลองตัวที่ 2 มีก้อนมะเร็งสองก้อนเกิดบริเวณที่ใกล้เคียงกัน), กลุ่มที่ 2 เท่ากับ 73.82 และ 100.32 มม³ และในกลุ่มการทดลองที่ 3 เท่ากับ 296.52 และ 300.40 มม³ สำหรับกลุ่มการทดลองที่ 4 สามารถสังเกตเห็นว่า ที่บริเวณผิวหนังมีลักษณะนูนขึ้นมา เมื่อวัดขนาดและคำนวณปริมาตรแล้ว มีค่าลดลง ตั้งแต่วันที่ 21 ซึ่งคาดว่าอนุภาคไมครอนสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ และยังมีส่วนหนึ่งที่ยังย่อยสลายไม่หมด ปริมาตรก้อนเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในระยะเวลาต่าง ๆ สามารถแสดงได้ดังแสดงในรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.18 การฉีดปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดบนหลังบริเวณ dorsal skin-fold chamber ซึ่งในขณะที่ฉีดหนูทดลองจะได้รับยาสลบ Isoflurane 5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4. 19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง CasKi ที่เวลาต่างๆ

(1) และ (2) แสดงหมายเลขทดลองในแต่ละกลุ่มการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองในกลุ่มที่ 1 และ 3 ปริมาตรก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นในวันที่ 30 ของกลุ่มการทดลองที่ 3 มีขนาดใหญ่กว่าปริมาตรก้อนมะเร็งของกลุ่มการทดลองที่ 1 ประมาณ 7 เท่า โดยที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นในการปลูกถ่ายมีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่า ที่เวลา 30 วัน ปริมาตรก้อนมะเร็งของกลุ่มการทดลองที่ 2 นั้น มีปริมาณมากกว่ากลุ่มการทดลองที่ 1 ประมาณ 2 เท่า อาจกล่าวได้ว่า การใช้อุณหภูมิที่เย็นลงเป็นพาหะขนส่งเซลล์ จะสามารถกระตุ้นให้เกิดก้อนมะเร็ง ที่มีขนาดใหญ่กว่า เนื่องจาก ในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคเป็นเวลา 7 วัน เซลล์จะยังอยู่ในสภาวะ log phase หรือสภาวะที่เซลล์สามารถแบ่งตัวในอัตราที่คงที่ ดังนั้นเมื่อปลูกถ่ายเซลล์ที่อยู่ในสภาวะนี้ เซลล์จึงสามารถเพิ่มจำนวนและรวมกลุ่มกันได้ดีกว่าเซลล์เดี่ยวๆ ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นจึงมีปริมาณที่มากกว่าเมื่อปลูกถ่ายเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์

Mahasiripanth T. และคณะ (2012) ได้ทำการกระตุ้นให้หนูทดลองเป็นมะเร็งเพื่อศึกษาการยับยั้งการเกิดมะเร็งด้วยสารสกัดจาก *Acanthus ebracteatus* (เหงือกปลาหมอ) ในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้เกิดมะเร็งนั้น ทำโดยปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski จำนวน 10×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM 200 μ l ลงในหนูทดลองชนิดเมมส์ พบว่าที่ระยะเวลา 30 วัน มีปริมาตรก้อนมะเร็งเฉลี่ย 236 mm^3 (สูตรที่ใช้คำนวณคือ ปริมาตร = $0.52 \times$ เส้นผ่านศูนย์กลางด้านยาว \times เส้นผ่านศูนย์กลางด้านสั้น²)

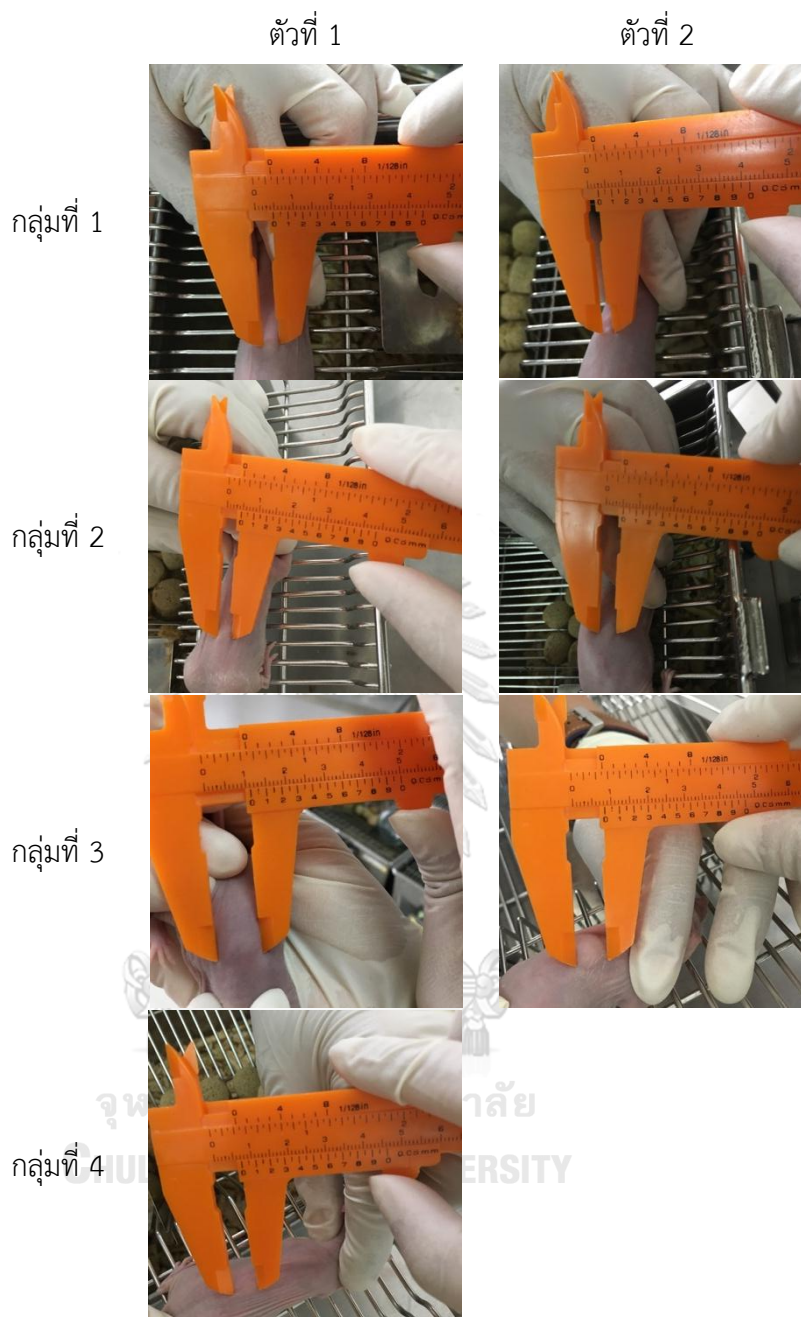
Kongnton P. และคณะ (2016) ได้ทำการกระตุ้นหนูทดลองชนิดเมมส์ให้เป็นมะเร็ง เพื่อศึกษาผลของเคอร์คูมินเพื่อต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง ในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้เป็นมะเร็ง ทำโดยปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski จำนวน 10×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM 200 μ l ลงในสัตว์ทดลอง พบว่าที่ระยะเวลา 30 วัน มีปริมาตรก้อนมะเร็งเกิดขึ้น 61-90 mm^3 (สูตรที่ใช้คำนวณคือ ปริมาตร = $0.52 \times$ เส้นผ่านศูนย์กลางด้านยาว \times เส้นผ่านศูนย์กลางด้านสั้น²) และหนูทดลองที่สามารถเกิดก้อนมะเร็งได้หลังจากการปลูกถ่ายเพียงครั้งเดียวคิดเป็น 15 ตัวจากทั้งหมด 23 ตัว หรือคิดเป็นร้อยละ 65 ซึ่งกล่าวได้ว่า ในการกระตุ้นให้หนูทดลองเป็นมะเร็ง อาจจะต้องปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งมากกว่า 1 ครั้ง

จากงานวิจัยของ Mahasiripanth T. และคณะ (2012) และ Konngton P. และคณะ (2016) พบว่าปริมาณก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้น (จำนวนเซลล์ปลูกถ่าย 10×10^6 เซลล์) มีปริมาณน้อยกว่า ปริมาณก้อนมะเร็งที่ถูกปลูกถ่ายโดยใช้อนุภาคไมครอนเจลาตินเป็นพาหะขนส่งเซลล์ (จำนวนเซลล์ปลูกถ่าย 2×10^6 เซลล์) คิดเป็น 1.26 และ 3.31 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มการทดลองที่ 2 และ 3 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคในการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงสัตว์ทดลอง ปริมาณก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้น จะมีปริมาณก้อนมะเร็งจะมีปริมาณที่สูงขึ้นเช่นกัน ในการทดลองนี้พบว่าปริมาณก้อนมะเร็งของกลุ่มการทดลองที่ 3 มีค่ามากกว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 ประมาณ 3 เท่า เนื่องจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มากกว่า โอกาสที่เซลล์จะเกิดปฏิสัมพันธ์กันสูงกว่า (cell-cell interaction) จะสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าในสถานะที่มีจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่า

ในกลุ่มการทดลองที่ 1 หนูทดลองตัวที่ 2 มีก้อนมะเร็งเกิด 2 ก้อน บริเวณที่ใกล้เคียงกัน อาจกล่าวได้ว่า การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งที่ยึดเกาะบนอนุภาคลงสัตว์ทดลอง จะสามารถควบคุมให้ก้อนมะเร็งเกิดที่บริเวณเดียวกันได้ โดยสังเกตได้จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2.3. คือ ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนอนุภาคไมครอนเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บนอนุภาคไมครอนในหลอดก้นกลม พบว่าเซลล์จะเกาะกันระหว่างอนุภาค ทำให้อนุภาคสามารถเชื่อมติดกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ได้ ดังนั้นเมื่อปลูกถ่ายเซลล์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคเข้าสู่เซลล์ การเกิดก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองนั้นจะเกิดในลักษณะก้อนเดียว ๆ

เมื่อพิจารณา ปริมาณก้อนมะเร็งของกลุ่มการทดลองที่ 3 ในวันที่ 21-30 พบว่า มีปริมาณที่เปลี่ยนแปลงน้อยมาก คือจาก 265 ถึง 300 มม³ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ระบบการขนส่งเซลล์โดยมีอนุภาคเจลาตินเป็นพาหะ จะสามารถช่วยลดระยะเวลาในการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเป็นมะเร็งได้



รูปที่ 4.20 การวัดขนาดก้ามมะรึงที่เกิดขึ้นหลังจากปลูกถ่ายเซลล์มะรึงปากมดลูกลงในหนูทดลองเป็นเวลา 30 วัน โดยจะวัดด้านที่ยาวที่สุดและสั้นที่สุดของก้ามเนื้อเยื่อ เพื่อคำนวณเป็นปริมาตร (ปริมาตร = $0.52 \times$ เส้นผ่านศูนย์กลางด้านยาว \times เส้นผ่านศูนย์กลางด้านสั้น²) (Yoysungnoen-Chintana P. และคณะ (2010))

อย่างไรก็ตาม ปริมาตรก้อนมะเร็งที่เปลี่ยนแปลงไป อาจไม่สามารถอธิบายได้ว่า สัตว์ทดลอง นั้นถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งจริงหรือไม่ โดยทั่วไปหนูทดลองที่เป็นมะเร็งนั้น จะมีกลไกการสร้างหลอดเลือดเกิดใหม่ เพื่อทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตและพัฒนาให้เนื้อเยื่อมีขนาดใหญ่ขึ้น (Yoysungnoen-Chintana P. และคณะ (2010)) ดังนั้นงานวิจัยนี้ ได้มีการทดลองหาปริมาณหลอดเลือดที่เกิดใหม่ (Neocapillary density) บริเวณรอบ ๆ ก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Intravital fluorescence videomicroscopy ของกลุ่มการทดลองทั้ง 4 การทดลอง

ตารางที่ 4.10 แสดงความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยบริเวณรอบ ๆ ก้อนมะเร็ง ในการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยนั้น จะวิเคราะห์จากพื้นที่ของเส้นเลือดฝอยเทียบกับพื้นที่ของภาพทั้งหมด (รูปที่ 4.22) ซึ่งพบว่าค่าความหนาแน่นหลอดเลือดฝอยของกลุ่มการทดลองที่ 1 ประมาณ 11.38-12.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ กลุ่มการทดลองที่ 2 คือ 12.36-13.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในกรณีนี้ ปริมาตรก้อนมะเร็งที่มากกว่า อาจไม่สามารถบอกได้ถึงความหนาแน่นเส้นเลือดฝอยที่มากกว่า เนื่องจาก กลุ่มการทดลองที่ 2 นี้ ปริมาตรที่เกิดขึ้นนั้น อาจรวมส่วนของอนุภาคไมครอนที่ยังย่อยสลายไม่หมดไว้อยู่ด้วย ดังนั้นในกรณีนี้ ผลของปริมาตรก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้น และร้อยละความหนาแน่นเส้นเลือดฝอย อาจยังไม่เพียงพอต่อการอธิบายว่าหนูทดลองถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งได้ ดังนั้นอาจจะต้องใช้วิธีการตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathology) ในการตรวจสอบเพิ่มเติม ว่าก้อนเนื้อนั้นใช่ก้อนมะเร็งจริงหรือไม่ ในการตรวจสอบทางพยาธิวิทยา เป็นการนำเนื้อเยื่อไปย้อมด้วยอิมมูโน (Immunohistochemical) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Mahasiripanth T. และคณะ (2012))

ในกลุ่มการทดลองที่ 4 พบว่ามีค่าความหนาแน่นหลอดเลือดฝอยเท่ากับ 19.7 ซึ่งมีค่ามากกว่า กลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่าการฉีดอนุภาคไมครอนที่ไม่มีเซลล์ยึดเกาะ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดเกิดใหม่เพิ่มขึ้นได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ Konngton P. และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย เพื่อยับยั้งการเกิดมะเร็งในหนูชนิดเมาส์ โดยวิเคราะห์จากปริมาตรก้อนมะเร็งที่ลดลงและความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอย ภายหลังการฉีดอนุภาคที่บรรจุเคอร์คูมินเข้าไปยับยั้งมะเร็งในสัตว์ทดลอง พบว่า ปริมาตรของก้อนมะเร็งมีปริมาตรลดลง และความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยที่ลดลง อาจกล่าวได้ว่า

หากใช้อุณหภูมิไมครอนเจลาตินปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง จะอุณหภูมิไมครอนเจลาตินจะไม่มีผลต่อการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง

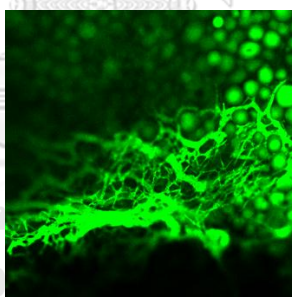
เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยที่เกิดขึ้น ความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยของกลุ่มการทดลองที่ 3 ให้ค่ามากที่สุด คือ 20.98-31.39 เปอร์เซ็นต์ โดยที่กลุ่มการทดลองที่ 3 มีความหนาแน่นเส้นเลือดฝอยที่มากกว่ากลุ่มการทดลองที่ 1, 2 และ 4 ตามลำดับ โดยมีค่ามากกว่าประมาณ 2,2 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ และจากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ของหลอดเลือดฝอยบริเวณที่เป็นก้อนมะเร็งและอนุภาคของกลุ่มการทดลองที่ 3 นั้น สามารถสังเกตเห็นว่ามีเส้นเลือดฝอยแทรกอยู่ระหว่างอนุภาค ดังรูปที่ 4.21 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีเซลล์มะเร็งที่เกาะอยู่บนอนุภาคไมครอน ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า เมื่อใช้อุณหภูมิไมครอนเจลาตินเป็นพาหะขนส่งเซลล์มะเร็ง อนุภาคไมครอนจะสามารถช่วยให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่า เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นระบบการขนส่งเซลล์โดยมีอนุภาคไมครอนของเจลาตินเป็นพาหะนำส่ง จะสามารถช่วยลดระยะเวลาในการกระตุ้นหนูทดลองให้เป็นมะเร็งได้ และลดปริมาณเซลล์เริ่มต้นในการกระตุ้นให้หนูทดลองเป็นมะเร็ง นอกจากนั้นแล้ว ยังสามารถควบคุมบริเวณการเกิดก้อนมะเร็งบนผิวหนังได้ ไม่ให้กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายสัตว์ทดลอง

ทั้งนี้จำนวนสัตว์ทดลองที่นำมาวิเคราะห์ไม่มากเพียงพอกับการวิเคราะห์ทางสถิติ จึงไม่สามารถเทียบค่าปริมาตรก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นและร้อยละความหนาแน่นเส้นเลือดฝอยในเชิงสถิติได้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาการทดลองในสัตว์ทดลองซ้ำต่อไป

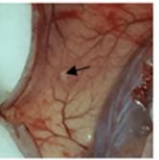
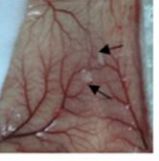
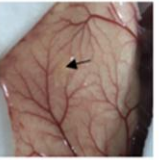
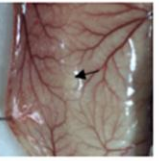
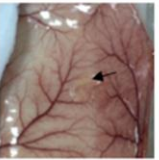
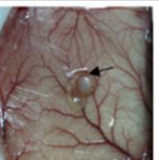

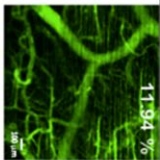
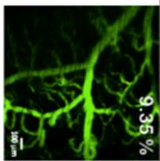
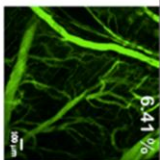
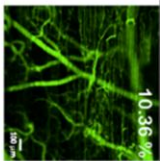
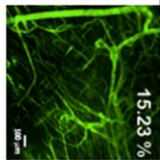
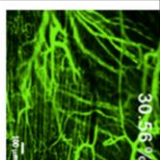
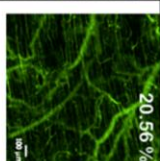
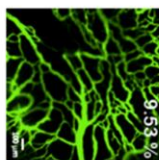
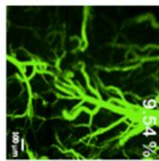
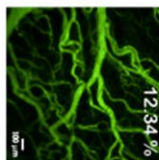
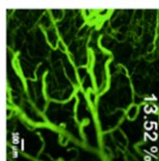
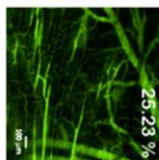
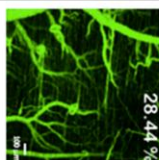
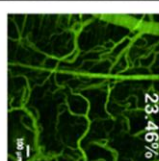
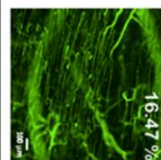
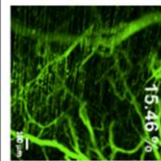
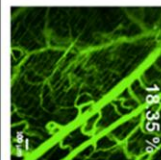
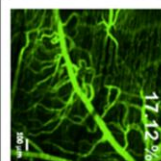
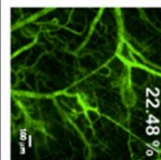
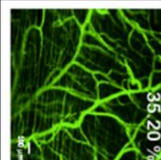
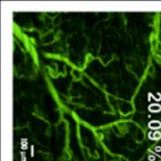
ตารางที่ 4.10 ร้อยละความหนาแน่นเส้นเลือดฝอยเฉลี่ยบริเวณรอบก้อนเนื้อเยื่อ (n=3) ที่เวลา 30-33 วัน หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง เมื่อวิเคราะห์จากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ของกลุ่มการทดลองที่ 1-4

กลุ่มการทดลอง	ตัวที่	ร้อยละความหนาแน่นเส้นเลือดฝอย
1	1	11.38
	2*	12.65
2	1	12.36
	2	13.67
3	1	20.98
	2*	31.39
4	1*	19.70

* หมายถึง กลุ่มการทดลองที่ 1 ตัวที่ 2, กลุ่มการทดลองที่ 3 ตัวที่ 2 และกลุ่มการทดลองที่ 4 วิเคราะห์หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง 33 วัน



รูปที่ 4.21 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่ง ตำแหน่งบริเวณก้อนมะเร็งและอนุภาคไมครอน ของกลุ่มการทดลองที่ 3 หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงหนูทดลองเป็นเวลา 33 วัน

	กลุ่มที่ 1 (2×10^6 cells)		กลุ่มที่ 2 (1×10^6 cells/3mg MS)		กลุ่มที่ 3 (2×10^6 cells/6mg MS)		กลุ่มที่ 4 (MS)	
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2*	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2*	ตัวที่ 1*	
ภาพจากภายใน								
ตำแหน่ง 1	 11.94 %	 9.33 %	 6.41 %	 10.36 %	 15.23 %	 30.56 %	 20.56 %	
ตำแหน่ง 2	 9.53 %	 9.54 %	 12.34 %	 13.52 %	 25.23 %	 28.44 %	 23.46 %	
ตำแหน่ง 3	 16.47 %	 15.46 %	 18.35 %	 17.12 %	 22.48 %	 35.20 %	 20.09 %	

รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายภาพตลอดหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่ง ๆ รอบ ๆ ก้อนมะเร็ง หลังการปลูกถ่ายเป็นเวลา 30 และ 33 วัน (กลุ่มการทดลองที่ 1 ตัวที่ 2, กลุ่มการทดลองที่ 3 ตัวที่ 2 และกลุ่มการทดลองที่ 4 วิเคราะห์หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง 33 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ผลิตอนุภาคขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยให้มีขนาดอนุภาคต่ำกว่า 100 ไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน เนื่องจากต้องการพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนให้เป็นพาหะขนส่งเซลล์ไปยังสัตว์ทดลอง โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Caski) เป็นต้นแบบ โดยพัฒนาอนุภาคขนาดไมครอนที่มียอดประกอบของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทย ได้แก่ 100/0, 90/10 และ 80/20 โดยใช้ความเข้มข้นของแข็งรวมร้อยละ 2.5, 5 และ 7.5 โดยน้ำหนัก ผลการศึกษาค่าประจุบริเวณพื้นผิวจะแสดงเป็นค่าศักย์เซต้าของสารละลายที่ค่าพีเอช 5.8 พบว่า สารละลายเจลาตินชนิดเอ (ค่าไอโซอิเล็กทริก เท่ากับ 9) แสดงประจุบวก และมีค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ $+3.71 \pm 0.68$ มิลลิโวลต์ และสารละลายไฟโบรอิน (ค่าไอโซอิเล็กทริก เท่ากับ 3.8-4.2) แสดงประจุลบ ซึ่งมีค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -21.53 ± 0.47 มิลลิโวลต์ สำหรับสารละลายผสมของเจลาตินและไฟโบรอินที่อัตราส่วนการผสมเท่ากับ 90/10 และ 80/20 จะมีค่าประจุรวมเป็นบวกน้อยลง คือ $+2.89 \pm 0.77$ และ $+2.50 \pm 0.36$ มิลลิโวลต์ ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอิน และเพิ่มความเข้มข้นของแข็งรวม สารละลายผสมมีความหนืดมากขึ้น สารละลายไฟโบรอินมีความหนืดมากกว่าสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นเดียวกัน

อนุภาคขนาดไมครอนถูกขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันโดยใช้เครื่องปั่นผสมความเร็วรอบสูงเมื่อใช้ความเร็วรอบในการปั่นกววน 3000 รอบ/นาที อนุภาคที่ขึ้นรูปได้มีลักษณะค่อนข้างกลม และกระจายตัวดี โดยอัตราส่วนน้ำ:น้ำมัน เท่ากับ 1:30 ทำให้ผลิตอนุภาคขนาดไมครอนในช่วงขนาด 32-75 ไมครอน ได้มากที่สุด (83%)

เมื่ออนุภาคขนาดไมครอนถูกเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ทำให้อนุภาคมีความคงตัวยิ่งขึ้น อนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวได้ดี โดยร้อยละผลได้ของอนุภาคที่ผลิตได้ทั้งหมดมีค่าประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ โดยอนุภาคที่ G100, G90SF10 และ G80SF20 (7.5 %โดยน้ำหนัก) ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน มีปริมาณสูงสุด 50-70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ได้

อนุภาคไมโครเจลลาตินและไฟโบรอินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอส XIV ความเข้มข้น 0.5 หน่วย/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 10 วัน โดยพบว่าอนุภาคที่มีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากขึ้นจะเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพได้ช้ากว่าอนุภาค เจลาติน (100/0) มีร้อยละการดูดซับน้ำ (ในน้ำปราศจากไอออน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.8) มากที่สุด คือ 115 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มปริมาณไฟโบรอินอนุภาคจะมีร้อยละการดูดซับน้ำที่ลดลง

อนุภาคเจลาติน (100/0) สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ผิวหนังหนู (L929) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) มายึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีร้อยละการยึดเกาะช่วงเริ่มต้น (6 ชั่วโมง) ของเซลล์แต่ละชนิด เท่ากับ 68.70 ± 7.56 และ 62.87 ± 4.56 ตามลำดับ ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ CaSki บนอนุภาคเจลาติน (100/0) ขนาดช่วง 32-75 และ 75-100 ไมโครเมตร มีค่าสูงสุด โดยอนุภาคทั้งสองช่วงขนาดนี้มีลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ที่คล้ายคลึงกัน คือเซลล์จะยึดเกาะรวมกลุ่มกันระหว่างอนุภาคและเกิดเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ เซลล์ L929 และ CaSki สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอนุภาคไมครอนเจลาติน (100/0) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.65×10^{-2} และ 2.05×10^{-2} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเร็งปากมดลูกบริเวณใต้ผิวหนังหนูชนิดไมซ์สายพันธุ์ BALB/c โดยใช้อนุภาคเจลาติน (100/0) เป็นต้นแบบ ทุกกลุ่มการทดลองเกิดตุ่มบวมอักเสบบริเวณหลังหนู หลังการปลูกถ่ายเป็นเวลา 7 วัน ปริมาตรก้อนมะเร็งและความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยที่เกิดขึ้นใหม่ (วิเคราะห์วันที่ 30) ของการทดลองในกลุ่มที่ใช้เซลล์ 1×10^6 เซลล์/อนุภาค 3 มิลลิกรัม เกิดปริมาตรก้อนมะเร็งมากกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ฉีดเซลล์มะเร็งโดยตรง 2×10^6 เซลล์) 2 เท่า แต่มีความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ขณะเดียวกัน ปริมาตรก้อนมะเร็งและความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย ของกลุ่มที่ใช้เซลล์ 2×10^6 เซลล์/อนุภาค 6 มิลลิกรัม มีปริมาตรก้อนมะเร็งมากกว่ากลุ่มควบคุม 7 เท่า และมีความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยมากกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า จะเห็นได้ว่า อนุภาคไมครอนเจลาตินสามารถใช้เป็นพาหะขนส่งเซลล์มะเร็งสำหรับงานวิจัยด้านเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.2 ประโยชน์ที่ได้รับ

5.2.1 ทราบวิธีการพัฒนาอนุภาคขนาดไมครอน (32-75 ไมครอน) ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นพาหะของเซลล์ด้วยวิธีการขึ้นรูปในระบบอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยใช้ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที อัตราส่วนน้ำ:น้ำมัน เท่ากับ 1:30

5.2.2 ทราบลักษณะสมบัติของอนุภาคขนาดไมครอนที่ผลิตจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 100/0, 90/10 และ 80/20

5.2.3 สามารถใช้ออนุภาคเจลาตินเป็นพาหะขนส่งเซลล์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดก้อนมะเร็งที่มีปริมาตรมากกว่าการฉีดเซลล์มะเร็งโดยตรง 7 เท่า

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงอนุภาคขนาดไมครอนให้มีพื้นผิวมีรูพรุนมากขึ้น เพื่อส่งเสริมให้เซลล์ยึดเกาะ และเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น โดยวิธีการนำอนุภาคขนาดไมครอนมาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งก่อนการเชื่อมขวางอนุภาคทางเคมี

2. เพื่อให้เห็นแนวโน้มของการทดสอบกับสัตว์ทดลองมากขึ้น ควรเพิ่มปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอนุภาคขนาดไมครอนก่อนการนำมาทดสอบกับสัตว์ทดลองเพื่อให้เห็นผลการทดลองที่ชัดเจนยิ่งขึ้น และเพื่อการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ จึงจำเป็นต้องทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

3. ในการวิเคราะห์ก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองทำได้โดยการวิเคราะห์ปริมาณก้อนมะเร็ง และความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยบริเวณรอบก้อนมะเร็ง ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวอาจยังไม่สามารถบอกได้ว่าหนูทดลองเป็นมะเร็งจริงหรือไม่ ดังนั้น ควรนำก้อนมะเร็งบนหลังหนูทดลองมาตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathology) เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

4. อาจทดสอบอนุภาคเจลาตินที่เป็นต้นแบบพาหะขนส่งเซลล์กับยาต้านมะเร็งที่ใช้จริงในปัจจุบัน

รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

- Abdalbasit Adam Mariod, H.F.A., *REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS*. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment, 2013. 12(2): p. 135-147.
- Ahmad, A.A.K.a.M.R., *A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. 16: p. 18149-18184.
- Banani Kundu, R.R., Subhas C. Kundu, Xungai Wang, *Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. 65: p. 457-470.
- Bellis, S.L., *Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials*. Biomaterials, 2011. 32(18): p. 4205-4210.
- Bhat,R. and A.A. Karim. *Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin*. Food Chemistry. 2009. 113(4): p. 1160-1164.
- Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications*. Carbohydrate Polymers, 2011. 85(2): p. 325-333.
- Biman B. Mandal, S.C.K., *Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds*. Biomaterials, 2009. 30: p. 2956-2965.
- Brackenbury, M.Y.a.W.J., *Membrane potential and cancer progression*. frontiers in physiology, 2013. 4: p. 1-1
- Brian J. Kirby, E.F.H.J., Review : Zeta potential of microfluidic substrates: Theory, experimental techniques, and effects on separations. Electrophoresis, 2004. 25: p. 187-202.
- Bubnis, W. A. and C. M. Ofner Iii. *The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid*. Analytical Biochemistry. 1992. 207(1): p. 129-133.

- Cilurzo, F., C.G. Gennari, F. Selmin, L.A. Marotta, P. Minghetti, et al., *An investigation into silk fibroin conformation in composite materials intended for drug delivery*. *Int J Pharm*, 2011. 414(1-2): p. 218-24.
- Choo, C.K., et al., *Retrovirus-mediated delivery of HPV16 E7 antisense RNA inhibited tumorigenicity of CaSki cells*. *Gynecol Oncol*, 2000. **78**(3 Pt 1): p. 293-301.
- Delin Cheng, X.C., Huichang G and Yingjun Wang, *Superficially porous poly(lactic-co-glycolic acid)/calcium carbonate microsphere developed by spontaneous pore-forming method for bone repair*. *RSC Advances*, 2013. **3**: p. 6871-6878.
- Finch, C.A. and Jobling, A. *The science and technology of gelatin*. A.G. Ward and A. Courts, eds., 1977. p. 258-260.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. *Biomaterials*, 2008. 29(34): p. 4532-9.
- Gómez-Guillén, M.C., B. Giménez, M. E. López-Caballero and M. P. Montero, *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. *Food Hydrocolloids* 2011. 25(8): p. 1813-1827.
- Guanghai MA, Z.S., *Microspheres and Microcapsules in Biotechnology*. *Microsphere for cell culture*, ed. G.M.a.Z.s. Weiqing Zhou. Pan Stanford. 2013. p. 49-83
- Guo, F., et al., *Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2010. **42**(3): p. 224-229.
- Gupta, V., A. Aseh, C.N. Ríos, B.B. Aggarwal and A.B. Mathur, *Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy*. *International Journal of Nanomedicine*, 2009. 4: p. 115-122.
- Harris, P., *food gel. Gelatin*, ed. F.A. JOHNSTON-BANKS., Crown House, Linton Road, Barking Essex IG11 8JU, England: Elsevier applied science. 1990. p. 233-289.

Hacharoen, N., *INCREASING THERMAL STABILITY UPON PROCESSING AND COLD STABILITY DURING STORAGE OF STERILIZED COCONUT MILK.*, SILPAKORN UNIVERSITY. 2011

Hoffman, R.M. *To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question.* Stem cells. 1993. 11: p. 105-111

Horbett, T. A., Schway, M. B., & Ratner, B. *Hydrophilic-hydrophobic copolymers as cell substrates: Effect on 3T3 cell growth rates.* Colloid and Interface Science. 1985. 104: p. 28-39

ICI Americas, i., *The HLB system : a time-saving guide to emulsifier selection.* 1984: Wilmington : ICI Americas, Inc. 19.

Jacobson, R.E. *Photographic gelatin II*, R.J. Cox, ed. Academic Press London. 1967. p. 233- 252

Janus, J., Kenchington, A.W., and Ward, A.G., *Reseach*, London. 1951. 4: p.247

JIA K. LI, N.W., AND XUE S. WU. *A Novel Biodegradable System Based on Gelatin Nanoparticles and Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres for Protein and Peptide Drug Delivery.* Journal of Pharmaceutical Sciences. 1997. 89(8): p. 891-895.

Jones, R.T. *Hard capsules development and technology*, K. Ridgway, ed., Th Pharmaceutical Press London, 1987. p.36-37

Kasaju, N. and U. Bora, *Silk fibroin in tissue engineering.* Adv Healthc Mater, 2012. 1(4): p. 393- 412.

Kataria Sahil, M.A., Sandhu Premjeet, Ajay Bilandi and Bhawana Kapoor, *MICROSPHERE: A REVIEW.* RESEARCH IN PHARMACY AND CHEMISTRY, 2011. 1(4): p. 1184-1198.

- Ken Webb, V.H., and Patrick A. Tresco, *Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization*. Biomedical Material Research, 1998. **41**(3): p. 422-430.
- Kim, U.-J., J. Park, H. Joo, Kim, M. Wada and D. L. Kaplan. *Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin*. Biomaterials. 2005. 26(15): p. 2775-2785.
- Kudug, E., *Use of Fibroin/Hyaluronic Acid Matrices as a Drug Reservoir in Iontophoretic Transdermal Delivery*, in Chemical Engineering. 2004, Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey. p. 67.
- Mahasiripanth, T., et al., *Effects of Acanthus ebracteatus Vahl on tumor angiogenesis and on tumor growth in nude mice implanted with cervical cancer*. Cancer Manag Res, 2012. **4**: p. 269-79.
- Leng-Duei Koha, Y.C., Choon-Peng Tenga, Yin-Win Khina, Xian-Jun Loha, Si-Yin Teea, Michelle Lowa, Enyi Yea, Hai-Dong Yua, Yong-Wei Zhangb, Ming-Yong Han, *Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials*. *progress in polymer science*, 2015. 46: p. 86-110.
- Lenvine, D. W., Thilly, W. G., & Wang, D. I. C. *New microcarriers for the large scale production* Biology, 1978. 100: p. 15-23
- Lerdchai, K., J. Kitsongsermthon, J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. *Thai Silk Fibroin/Gelatin Sponges for the Dual Controlled Release of Curcumin and Docosahexaenoic Acid for Anticancer Treatment*. J Pharm Sci. 2015.
- Light N.D. and Bailey A.J., *Methods in Enzymology*, L.W.C.a.D.W. Frederickson, Editor., Academic Press: New York. 1982. p. 360-372.
- Li, M., M. Ogiso and N. Minoura., *Enzymatic Degradation Behavior of Porous Silk Fibroin Sheets*. Biomaterials, 2003. 24(2): p. 358-65

- Lüpke, M.a.H.B.c., *Gas chromatographic evaluation of amino acid epimerisation in the course of gelatin manufacturing and processing*. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A 1998. 206(5): p. 323-328.
- 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. 2003. 24: p. 4833-4841.
- Manju, S. and K. Sreenivasan, *Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. 82(2): p. 588-93.
- Malay, O., D. Yaln, A. Batgün and O. Bayraktar, *Characterization of Silk Fibroin-Hyaluronic acid film*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2008. 94(3): p. 749-755.
- MATTHIAS DURST, F.X.B., DAGMAR GLITZ, ACHIM SCHNEIDER, and A.H.Z. HAUSENI, *Inverse Relationship between Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Early Gene Expression and Cell Differentiation in Nude Mouse Epithelial Cysts and Tumors Induced by HPV-Positive Human Cell Lines*. journal of VIROLOGY, 1991: p. 796-804.
- Manroudas. N.G. *Adhesion and spreading of cells on charged surfaces*. Journal of Theoretical Biology. 1975. 49. p. 417-427
- Members of Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA). *Gelatin Handbook*. Massachusetts: Atlantic Gelatin/Kraft Foods Global Inc. 2012.
- Mohd S. Zaman, N.C., Murali M. Yallapu, Rishi K. Gara, Diane M. Maher, Sonam Kumari, Mohammed Sikander, Sheema Khan, Nadeem Zafar, Meena Jaggi and Subhash C. Chauhan, *Curcumin Nanoformulation for Cervical Cancer Treatment*. scientific report, 2016.

- Mondal, M., K. Trivedy and S. Nirmal Kumar, The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori*. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 2007. 5(2): p. 63-76.
- Ogawa, T., T. Akazawa, and Y. Tabata, *In Vitro Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cells Cultured with Gelatin Hydrogel Microspheres for TGF- β 1 Release*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2010. 21(5): p. 609-621.
- Okhawilai, M., R. Rangkupan, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. *Preparation of Thai Silk Fibroin/Gelatin Electrospun Fiber Mats for Controlled Release Application*. *Int J Biol Macromol*, 2010. 46(5): p. 544-50
- Pieper J.S., Hafmans T., Veerkamp J.H. and van Kuppevelt T.H. *Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS cross-linking and ultrastructural aspects*. *Biomaterials*. 2000. 21: p. 581-593.
- Piez K.A., *biochemistry of collagen*, G.N.R.a.A.H. Reddi, Editor., Plenum Press: NewYork. 1976. p. 1-44.
- Paolo Arosio, T.P.J.K.a.S.L.a., *On the lag phase in amyloid fibril formation*. *Royal Societu of Chemistry*, 2015. 17(12): p. 7606-7618.
- Ramachandran G.N. and Ramakrish C., *biochemistry of collagen*, R.a.A.H. Reddi, Editor., Plenum Press. 1976. p. 45-85.
- Ratanavaraporn, J., S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, *The development of injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine*. *J Mater Sci Mater Med*, 2014. 25(2): p. 401-10.
- Reynolds, M.M.T.a.C.P., *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1989. 24: p. 148-154.

- Ruby, A.J., G. Kuttan, K.D. Babu, K.N. Rajasekharan and R. Kuttan, *Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids*. *Cancer Lett*, 1995. 94(1): p. 79- 83.
- Rui Chen , S.J.C., Judith M. Curran, John A. Hunt, *The use of poly(L-lactide) and RGD modified microspheres as cell carriers in a flow intermittency bioreactor for tissue engineering cartilage*. *Biomaterials*, 2006. **27**: p. 4453-4460.
- Shalini Verma et al *Effect of biomimetic 3D environment of an injectable polymeric scaffold on MG-63 osteoblastic-cell response*. *Materials Science and Engineering C*. 2010.
- Shudong Wang, Y.Z., Hongwei Wang,Guibo Yin and Zihui Dong, *Fabrication and Properties of the Electrospun Polylactide/Silk Fibroin-Gelatin Composite Tubular Scaffold*. *Biomacromolecules*, 2009. 10: p. 2240-2244.
- Sinthop S., P.S., Kanokpanont S., *Development of Gelatin-Thai Silk Fibroin Microspheres for Three Dimensional Cell Culture*. *Advanced Material Research*, 2014. 931-932: p. 200- 204.
- Stickley, F.L. *Photographic Gelatin*, Proceedings of Fifth RPS Symposium, S.J. Bond, ed., 1987. p. 107-110.
- Sung Eun Kim, J.H.P., Yong Woo Cho, Hesson Chung, Seo Young Jeong, Eunhee Bae Lee, Ick Chan Kwon, *Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-b1: Implications for cartilage tissue engineering*. *Controlled release*, 2003. 91: p. 365-374.
- Tabata, Y.a.Y.I., *Protein release from gelatin matrices*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998. 31(3): p. 287-301.
- Tao Jianga, W.I.A.-F., Cato T. Laurencin, *In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid- glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2006. 27: p. 4894-4903.

- Ueda H., Nakamura T., Yamamoto M. and Nagata N. *Repairing of rabbit skull defect by dehydrothermally crosslinked collagen sponges incorporating transforming growth factor β 1*. Journal of controlled Release. 2005. 88: p. 256-274.
- Walluscheck, K. P., G. Steinhpff, S. Kelm and A.Haverich. *“Improved Endothelial Cell Attachment on Eptfe Vascular Graft*. 1996
- Wei-ying KUO, J.-y.L.a.T.K.T., *HUMAN GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (G6PD) GENE TRANSFORMS NIH 3T3 CELLS AND INDUCES TUMORS IN NUDE MICE*. International Journal of Cancer, 2000. **85**: p. 857-864.
- Wenk, E., H.P. Merkle and L. Meinel, Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. J Control Release, 2011. 150(2): p. 128-41.
- WOONG SHICK AHN, S.W.H., SU-MI BAE, INSU P. LEE, JUN MO LEE, SUNG EUN NAMKOONG, CHONG KOOK KIM, and JEONG-IM SIN, *A Major Constituent of Green Tea, EGCG, Inhibits the Growth of a Human Cervical Cancer Cell Line, CaSki Cells, through Apoptosis, G1 Arrest, and Regulation of Gene Expression*. DNA and cell biology, 2003. **22**: p. 217-224.
- Xin Hao Zhu . et al *Growing Tissue-Like Constructs With Hep3B/HepG2 Liver Cells on PHBV Microspheres of Different Sizes* Interscience 2006.
- Yongzhong Wang, D.D.R., Ashley Walsh, Lauren Abrahamsen, and H.S.K. Hyeon-Joo Kim, Carl Kirker-Head, David L. Kaplan *In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds*. Biomaterials, 2008. 29: p. 3415-3428.
- Yoysungnoen-Chintana, P., P. Bhattarakosol and S. Patumraj. *Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice*. Biomed Res Int. 2014.
- Yu Zhang . et al *Biodegradation-induced surface change of polymer microspheres and its influence on cell growth*. Polymer Degradation and Stability. 2010.

กัณฐรัตน์ เลิศไชย, การพัฒนาไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินสำหรับการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอ, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2556 , จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

นฤนาท ไชยถาวร. ผลของวิธีการเชื่อมโยงพันธะที่มีต่อลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากเจลาติน-ไคโตซาน,วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิตสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

พิมพ์ สีสพิสิทธิ์, เครื่องสำอางสำหรับผิวหน้า.สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, สนพ. 264 หน้า 2008: p. 264

พัชรिता คงทน, ผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาด ไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย, สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2559 , จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา. วิทยาศาสตร์เส้นใย. กรุงเทพมหานคร., โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2542.

เทพฤทธิ์ วงศ์ภาคำ, การสกัดคอลลาเจนจากเอ็นร้อยหวายสุกรเพื่อใช้ในการเตรียมฟิล์มคอลลาเจนผสมไฟโบรอินไหมไทย, สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2558 , จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

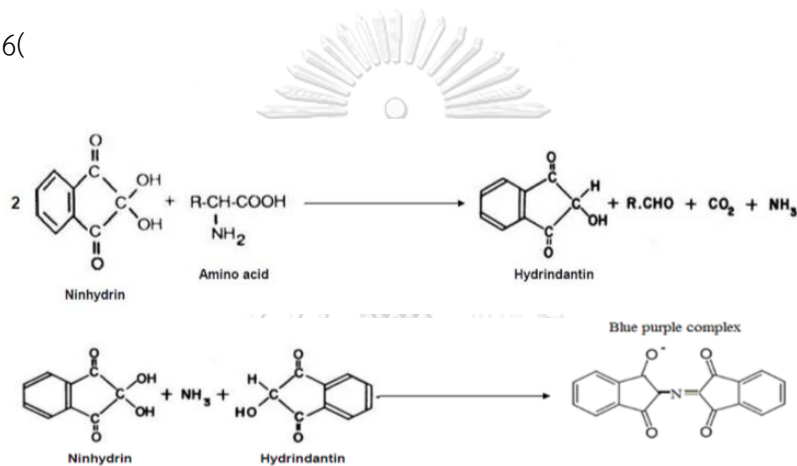
สวรรยา สินธพ, การพัฒนาอนุภาคไมโครเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2557 , จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารเผยแพร่. สมบัติของอนุภาค, ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2016

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยวิธี ninhydrin

การหาร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ด้วยสารประกอบนินไฮดริน โดยหมู่อะมิโนอิสระปฐมภูมิจะทำปฏิกิริยากับนินไฮดริน ได้สารประกอบ กับไฮดรินแดนดิน อัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับไฮดรินแดนดินและนินไฮดริน เกิดเป็นสารประกอบที่ให้สีน้ำเงินม่วง และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (.K.D .Clercq)และคณะ 2016(



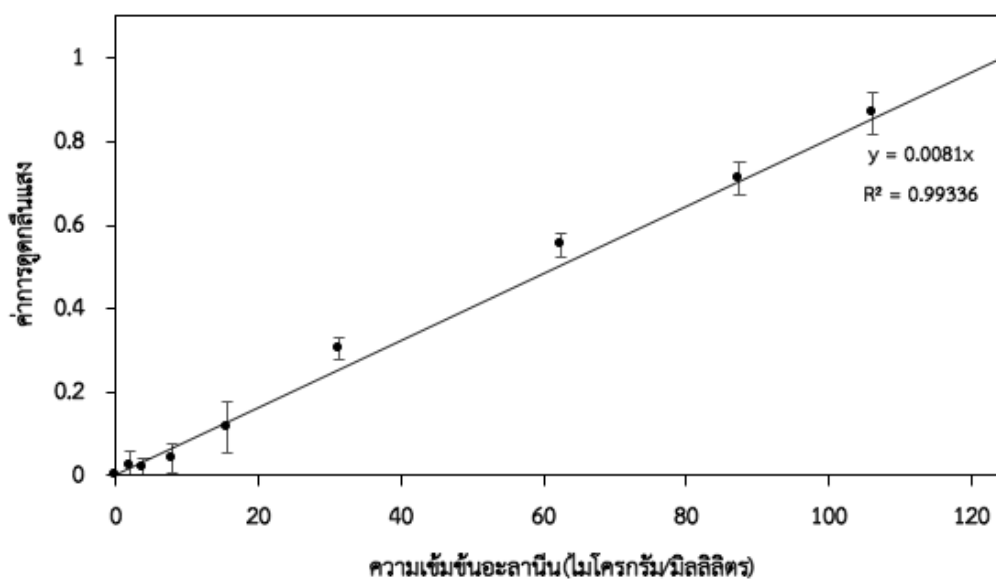
รูปที่ ก.1 การทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบนินไฮดรินกับหมู่อะมิโนอิสระ และนินไฮดรินกับไฮดรินแดนดิน เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน

วิธีการทดลอง (ดัดแปลงจาก .Clercq, K.D)และคณะ (2016(และ Hyman R.) 1957(

1. เตรียมสารละลายผสมของกรดซिटริกความเข้มข้นร้อยละ 4.20 โดยน้ำหนัก โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.60 โดยน้ำหนัก และทีนไดคลอไรด์ไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.16 โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากไอออน
2. เตรียมสารละลายนินไฮดรินความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ในเมทอกซีเอทานอล
3. ผสมสารละลายในข้อ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 1 : 1 และปั่นกวนในที่มืดเป็นเวลา 45 นาที
4. เติมสารละลายผสมในข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน อนุภาค 5 มิลลิกรัม ที่ถูกแช่ในน้ำปราศจากไอออน และบ่มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด
5. เติมไอโซโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
6. นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570นาโนเมตร

วิธีทำกราฟมาตรฐานเบต้า-อะลานีน

1. เตรียมสารละลายเบต้า-อะลานีน โดยการเจือจางเป็นลำดับเท่า (Serial dilution) ความเข้มข้น 0-130 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียม blank โดยใช้ น้ำปราศจากไอออน
2. ทำตามขั้นตอน 1-6 โดยเปลี่ยนจากอนุภาค เป็นสารละลายเบต้า-อะลานีน
3. พล็อตกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ เบต้า-อะลานีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

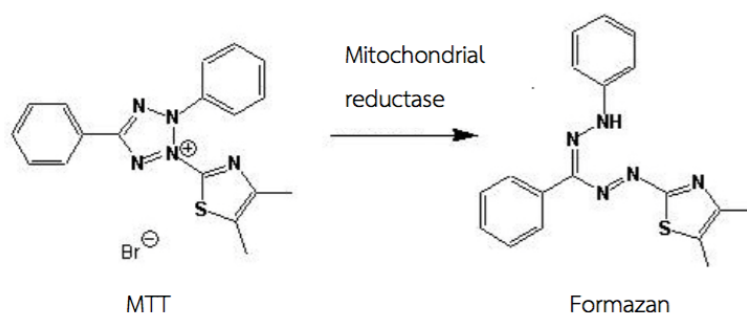


รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานเบต้า-อะลานีน (n=4)

ภาคผนวก ข

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

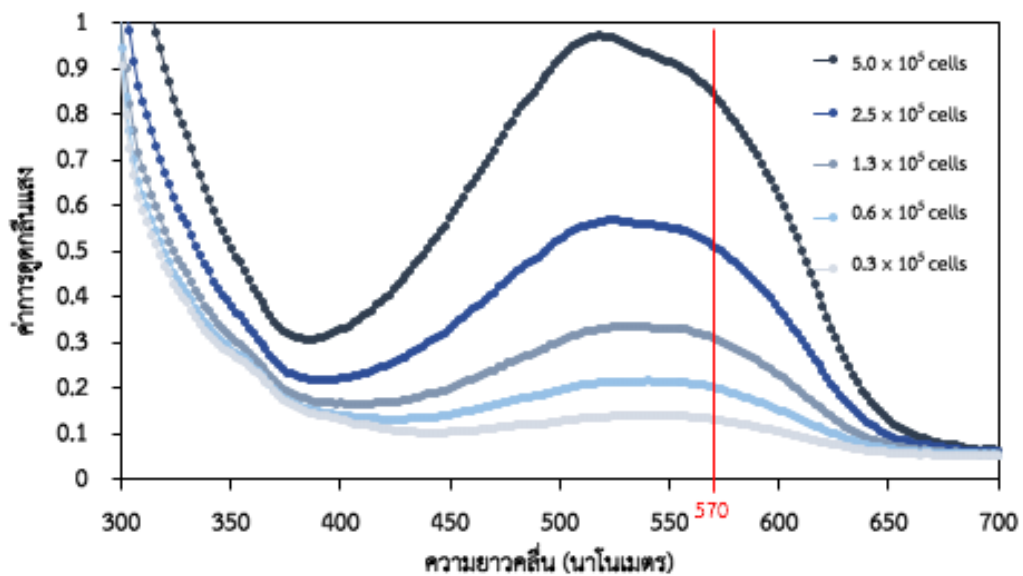
วิธีการนี้เป็นวิธีการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ด้วยสารละลาย MTT ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ Tetrazolium (สารละลายมีสีเหลือง) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ MTT จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ mitochondrial reductase ซึ่งหลั่งมาจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ หลังจากนั้นเกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีม่วงของ Formazan ดังรูปที่ ข.1 หลังจากนั้นจะละลายผลิตภัณฑ์สีม่วง Formazan ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ได้เป็นสารละลายสีม่วง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (Mosman T. (1983))



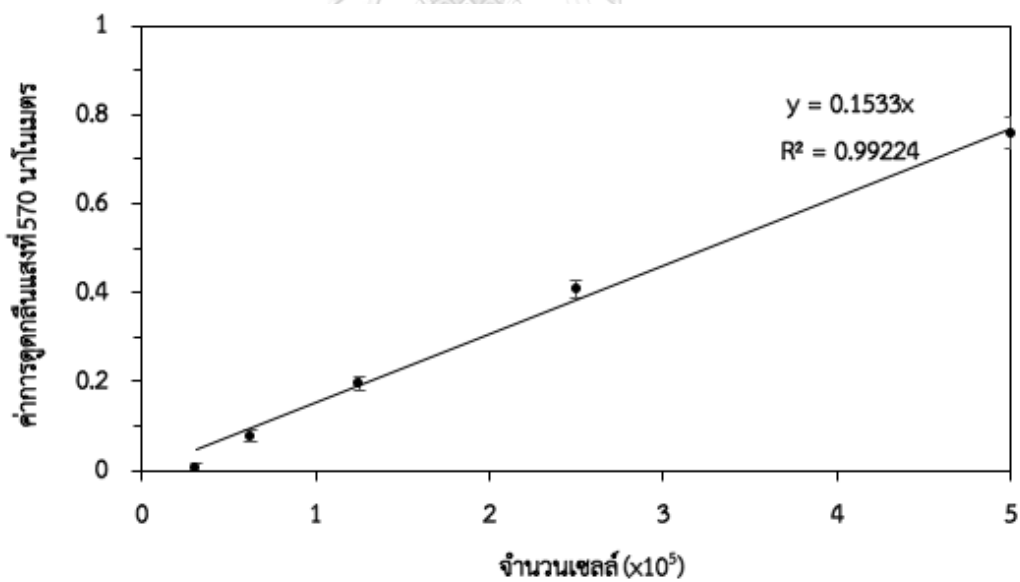
รูปที่ ข.1 ปฏิกิริยาระหว่างสาร MTT กับเอนไซม์ที่หลั่งจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ Formazan

วิธีการทดลอง

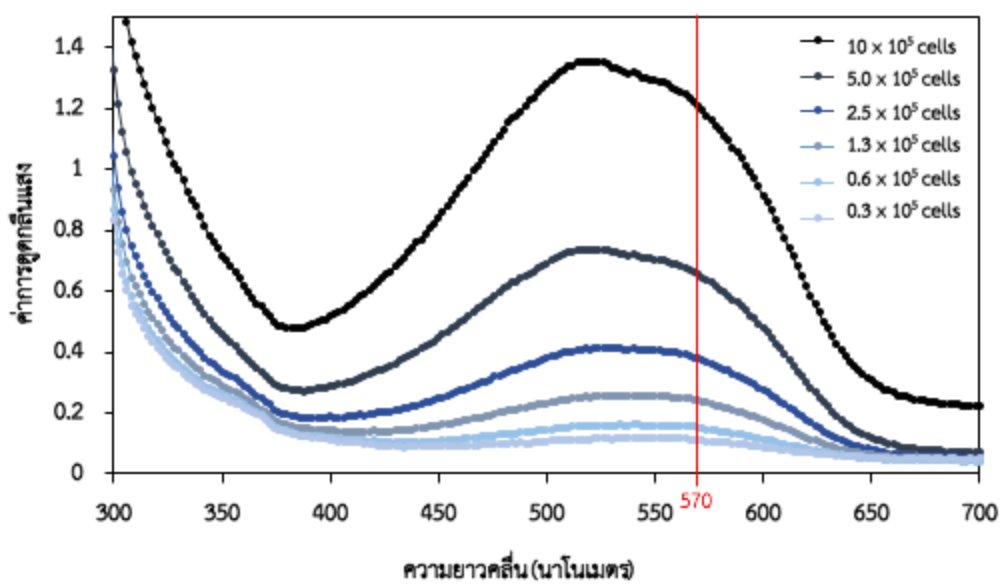
1. เตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ในสารละลาย PBS
2. ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และชะล้างเศษเซลล์ด้วยสารละลาย PBS
3. ปิเปต สารละลาย MTT 500 μ l ลงในตัวอย่างที่ต้องการวัด และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 30 นาที
4. ปิเปตสารละลาย MTT ออก และชะล้างสีของผลิตภัณฑ์ Formazan ด้วย DMSO ปริมาณ 1 ml
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร



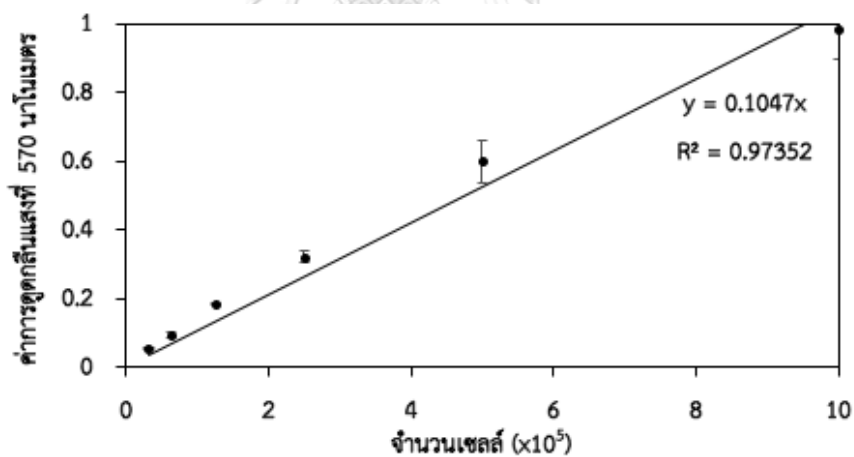
รูปที่ ข.2 กราฟสแกนความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่าง ๆ ของ จำนวนเซลล์ต่าง ๆ ของเซลล์ L929 หลังทำ MTT assay



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 เมื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT



รูปที่ ข.4 กราฟสแกนความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่าง ๆ ของ จำนวนเซลล์ต่าง ๆ ของเซลล์ CaSki หลังทำ MTT assay



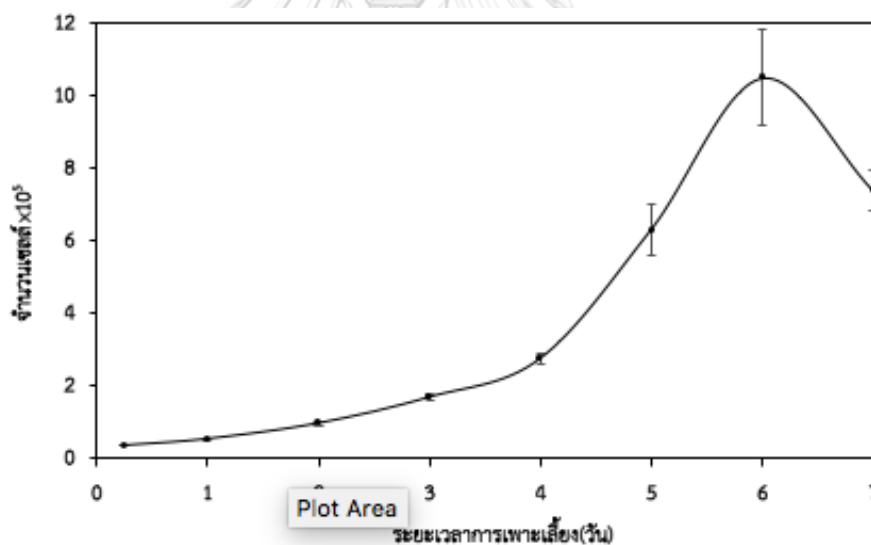
รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานของเซลล์ CaSki เมื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT

ภาคผนวก ค

การหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู L929

วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังในจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 24 หลุม (24 well-plate) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $10,000$ เซลล์/ซม² ($19,000$ เซลล์/หลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM
2. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก ๆ 2 วัน
3. ตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assay



รูปที่ ค.1 แสดงจำนวนเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 24 หลุม

การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ)

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dX$$

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

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)}$$

เมื่อ X_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา $t_1 = 144$ ชม.

X_2 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา $t_2 = 96$ ชม.

$$\mu = 0.0279 \text{ ต่อชั่วโมง}$$

การคำนวณเวลาการแบ่งตัววิคูณ

ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า โดยที่ $PDT = t_2 - t_1$ และ $X_2 = 2X_1$

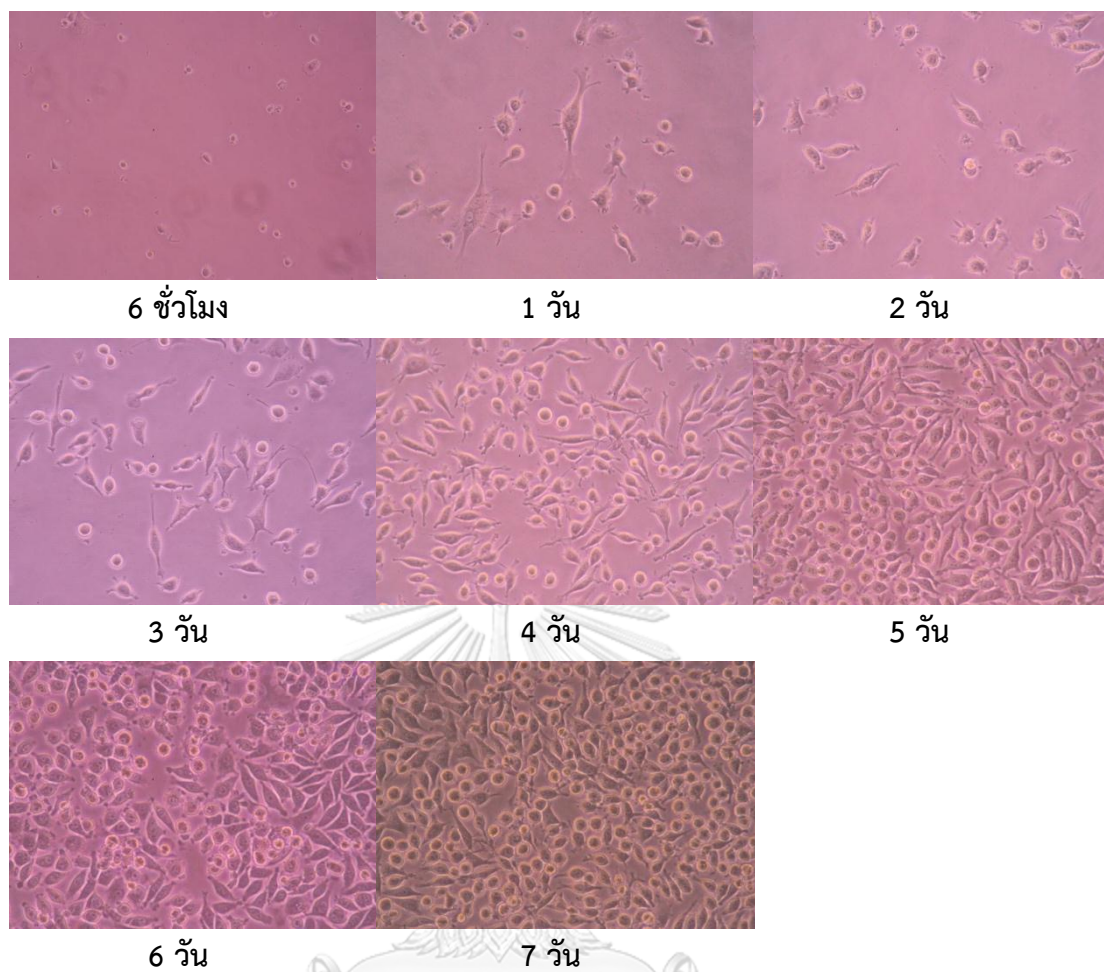
จากสมการ

$$\mu = \frac{\ln(2X_1) - \ln X_1}{PDT}$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)}$$

$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$PDT = 24.76 \text{ ชั่วโมง}$$



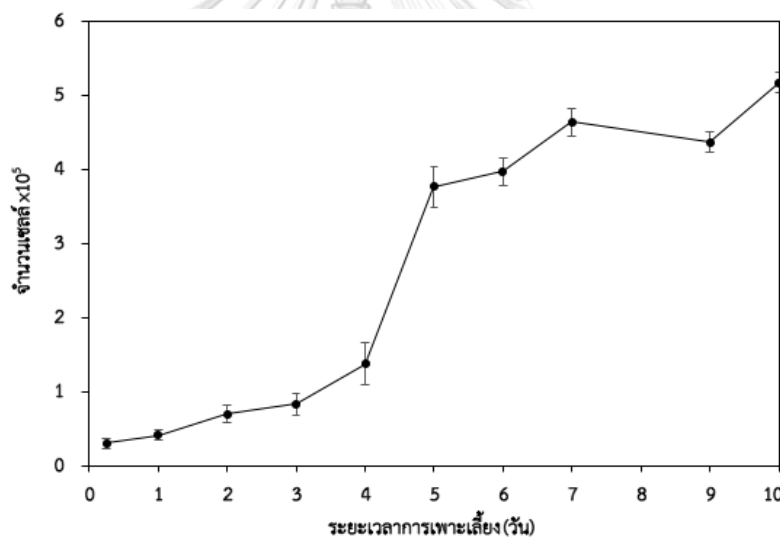
รูปที่ ค.2 รูปเซลล์ผิวหนังหนู (L929) เมื่อเพาะเลี้ยงบน 24 well plate ที่ระยะเวลาต่างๆ (กำลังขยาย 10x)

ภาคผนวก ง

การหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki

วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังในจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 24 หลุม (24 well-plate) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $5,000$ เซลล์/ซม² ($9,500$ เซลล์/หลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM
2. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มี $5\% \text{CO}_2$ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก ๆ 2 วัน
3. ตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

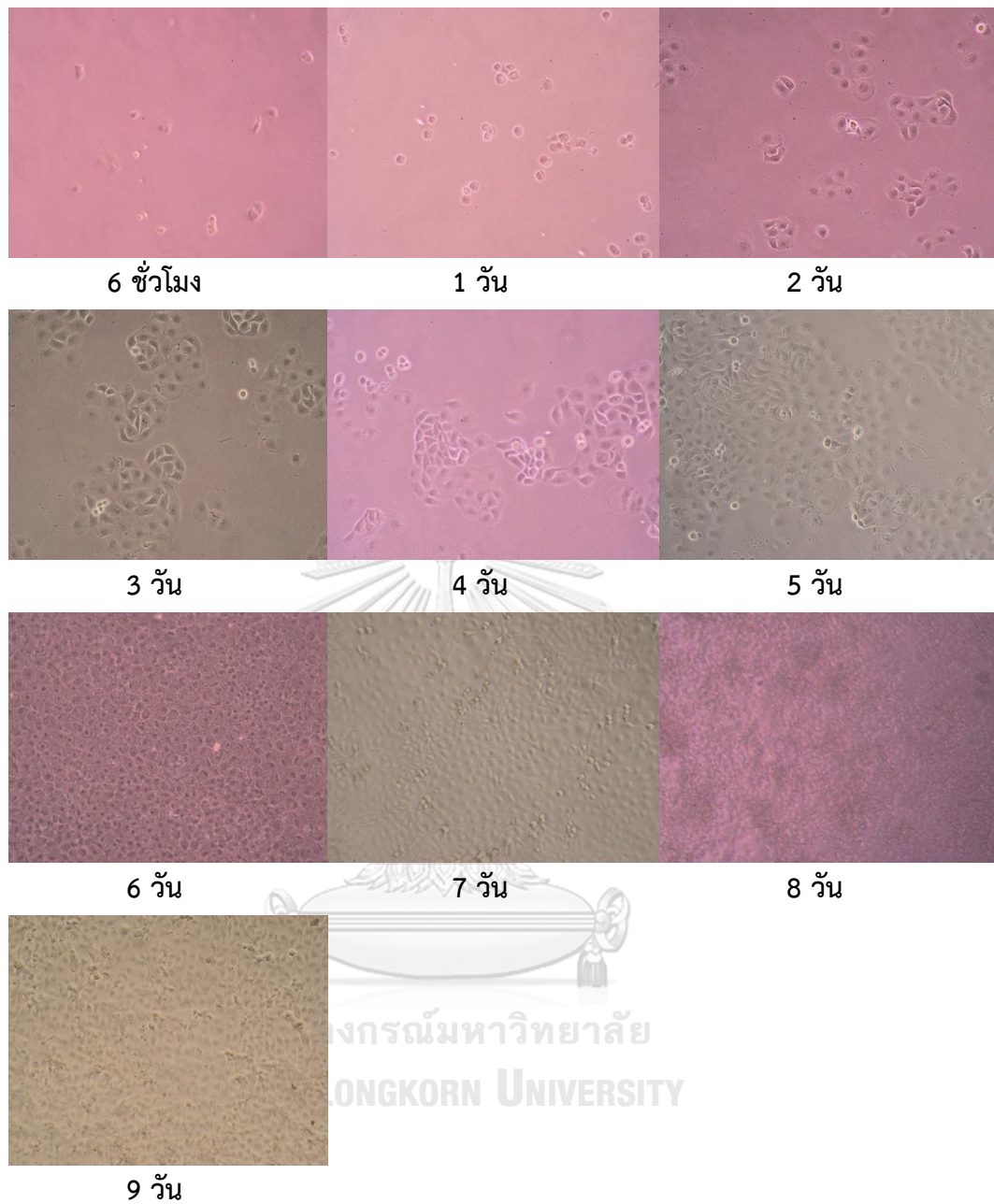


รูปที่ ง.1 แสดงจำนวนเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 24 หลุม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ)

$$\mu = 2.19 \times 10^{-2} \text{ ต่อชั่วโมง} \quad \text{เมื่อที่ } t_1 = 120 \text{ ชั่วโมง และ } t_2 = 6 \text{ ชั่วโมง}$$

เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time, PDT)

$$\text{PDT} = 31.63 \text{ ชั่วโมง}$$



รูปที่ ง.2 รูปเซลล์ผิวหนังหนู (L929) เมื่อเพาะเลี้ยงบน 24 well plate ที่ระยะเวลาต่างๆ (กำลังขยาย 10x)

ภาคผนวก จ

ปริมาณก๊อมนเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง

ตารางที่ จ.1 ปริมาณก๊อมนเนื้อเยื่อ/มะเร็งที่เกิดขึ้นภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งไปยังหนูถีบไม้ซึ่งที่ระยะเวลาต่าง ๆ

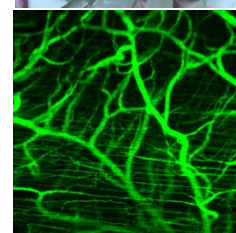
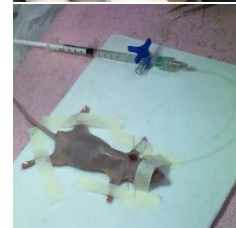
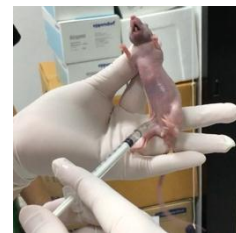
วันที่	กลุ่มที่ 1		กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		กลุ่มที่ 4
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1
1	0.00	0.00	81.39	98.12	159.32	173.02	100.01
4	35.20	20.49	100.48	80.49	310.44	299.25	164.21
7	24.71	35.23	70.00	106.57	374.24	305.56	72.77
9	32.77	20.25	90.46	80.35	374.24	502.25	70.37
14	34.44	18.46	70.23	75.46	156.31	304.43	65.45
17	24.71	15.54	73.77	60.23	208.24	289.35	70.76
21	25.07	15.52	74.48	49.99	265.75	300.78	71.12
24	39.77	16.89	80.99	50.88	275.99	298.99	69.65
28	51.49	18.06	82.05	70.47	290.10	290.99	50.46
30	54.36	28.48	100.33	73.82	296.52	300.40	43.79

ภาคผนวก ฉ

การวัดปริมาณหลอดเลือดฝอยด้วยวิธี Intravital fluorescence microscopy

ขั้นตอนการวัดปริมาณหลอดเลือดฝอยด้วยวิธี Intravital fluorescence microscopy
(Yoysungnoen-Chintana, P. แล คณะ (2014))

- 1 ผสมยาสลบ Pentobarbital sodium (50 mg/ml) ใน normal saline สัดส่วน 1:3 และฉีดยา Pentobarbital sodium ที่ผสมแล้วปริมาตร 120-150 μ l เข้าทางช่องท้อง
- 2 ผ่าเปิดผิวหนังบริเวณข้างลำคอเพื่อหาหลอดเลือด jugular vein สอดสาย catheter เข้าทางหลอดเลือด jugular vein และฉีดสาร FITC-dextran
- 3 ผ่าเปิดผิวหนังและขึงก้อนมะเร็งและดูหลอดเลือดผ่านคอนโฟคอล (microscope confocal)
- 4 นำภาพถ่ายมาคำนวณความปริมาตรหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ ด้วยโปรแกรม NIS elements



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอวิกา ชุ่นมงคง เกิดเมื่อวันที่ 13 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2535 ภูมิลำเนาจังหวัดสงขลา เข้าศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนธิดานุเคราะห์ จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557

ผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Soonmongkol, A., Jamkratoke, J. and Kanokpanont S. Physical Properties of Gelatin and Silk Fibroin Microspheres, Poster Presentation, The Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON 2018), The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 7-9 February 2018

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY