

การสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์เพื่อใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

นางสาวปัทมา กาบคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXTRACTION OF KERATIN FROM HUAMN HAIR AND FABRICATION OF SCAFFOLD  
FOR CELL CULTURE

Miss. Pattama Ghabkham

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

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

# #4770350921 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: KERATIN / GELATIN / L929 MOUSE FIBROBLAST CELL, MESENCHYMAL STEM CELL

PATTAMA GHABKHAM: EXTRACTION OF KERATIN FROM HUMAN HAIR FOR FABRICATION OF SCAFFOLD FOR CELL CULTURE. THESIS ADVISOR : SORADA KANOKPANONT, Ph.D., 122 pp.

Keratin was extracted from human hair using combinations of following substances, urea, thiourea, 2-mercaptoethanol (2-ME), sodium sulfide, sodium metabisulfite and SDS. Types of extractants and their concentrations as well as material preparation methods affected the extracted keratin yields. The maximal yield was 66% (wt/wt) when the mixture of urea and thiourea was used at 50<sup>0</sup>C for 24 h. Results from electrophoresis (SDS-PAGE) showed protein predominated bands at 20-30 kDa and 40-60 kDa ( $\alpha$ -helix). Structures of the extracted keratin by Raman spectroscopy showed peak of disulfide bond (S-S) at wavenumber 550-500 cm<sup>-1</sup>, the characteristic peak of keratin.

Series of scaffolds were fabricated using keratin/gelatin (K/G) solutions at various ratios of K/G (100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 and 50/50 wt/wt) using freeze-drying followed by dehydrothermal cross-linking. Increasing compositions of gelatin increased swelling property and mechanical strength to the blended scaffolds. The scaffolds were tested by culturing with L929 mouse fibroblast or bone marrow derived mesenchymal stem cell (MSC) from Lewis rats. The K/G scaffolds showed superior cell proliferations to those of pure gelatin scaffolds, especially at K/G ratio of 80/20. Keratin/gelatin scaffolds implanted subcutaneously on Wistar rat's back, induced fast neo-collagen production and angiogenesis. These experimental results clearly stated the high potential of using human hair keratin for tissue engineering applications.

Department Chemical Engineering

Student's signature.....

Field of study Chemical Engineering

Advisor's signature.....

Academic year 2006

ปีพามา กาบคำ: การสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์เพื่อใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์.  
(EXTRACTION OF KERATIN FROM HUAMN HAIR FOR FABRICATION OF  
SCAFFOLD FOR CELL CULTURE) อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร. โสธดา กนกพานนท์, 122 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีนเคราตินจากเส้นผมมนุษย์โดยใช้ส่วนผสมของสารต่างๆ ได้แก่ urea, thiourea, 2-mercaptoethanol, sodium sulfide , sodium metabisulfite และ SDS ในปริมาณต่างๆ พบว่า สารเคมีที่ใช้สกัด, ความเข้มข้นของสารที่ใช้, ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดและวิธีการเตรียมวัสดุส่งผลต่อผลได้ (yield) การสกัดโดยใช้ urea และ thiourea เป็นองค์ประกอบหลักให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้สูงสุดที่ 66% น้ำหนักโมเลกุลของเคราตินวิเคราะห์โดยใช้อิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) พบที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุล 20-30 kDa และบางส่วน 40-60 kDa (แสดงโครงสร้าง $\alpha$ -helix) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างเคราตินด้วยเทคนิครามานสเปกโตรสโกปี พบพีกซึ่งแสดงการสั่นของพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) ที่เลขคลื่น 550-500  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นลักษณะสมบัติของเคราติน

เคราตินที่สกัดได้ถูกนำมาผสมกับเจลาติน ชนิด A (ค่า pI ประมาณ 9) ที่อัตราส่วน 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 และ 50/50 โดยน้ำหนัก ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็งและเชื่อมโยงพันธะโดยการอบสูญญากาศ การทดสอบสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์พบว่าเจลาตินช่วยปรับปรุงสมบัติการบวมน้ำและช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่โครงเลี้ยงเซลล์ผสม เมื่อทดสอบสมบัติการเข้ากันกับเซลล์ L929 mouse fibroblast และ MSC ซึ่งสกัดจากไขกระดูกของ Wistar rat พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินทุกอัตราส่วน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะที่อัตราส่วน 80/20 (wt/wt) โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินสามารถกระตุ้นการสร้างเส้นใยคอลลาเจนและเส้นเลือดขึ้นมาใหม่ได้เร็วกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินในสัตว์ทดลอง เคราตินที่สกัดจากเส้นผมมนุษย์จึงนับเป็นชีววัสดุจากธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงสำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ดร. โสรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล และ อ.รัฐ พิษยางกูร เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและการวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัยได้อย่างถูกต้อง

ขอขอบคุณ อ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการในงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศูนย์สัตว์ทดลอง ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์และห้องปฏิบัติการเคมี ภาควิชา วิศวกรรมเคมี, ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์และห้องปฏิบัติการวิจัยตัวเร่งปฏิกิริยา

ขอบคุณมากสำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี, ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ที่ให้ความช่วยเหลือจนงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจตลอดมา จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เคราติน (Keratin) และเส้นผม.....	4
2.2 การสกัดเคราติน.....	9
2.3 การทดสอบสมบัติของเคราติน.....	11
2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน .....	11
2.3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างเคราตินด้วยวิธีรามานสเปกโตรสโกปี.....	12
2.3.3 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีน (SDS-PAGE electrophoresis).....	15
2.4 การขึ้นรูปเคราติน.....	16
2.5 เจลาติน.....	18
2.6 โคร่งเลี้ยงเซลล์.....	23
2.6.1 ขนาดรูพรุนและความพรุน.....	24
2.6.2 วัสดุสำหรับสร้างโคร่งเลี้ยงเซลล์.....	25
2.7 Mesenchymal stem cell (MSC).....	29
3. วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	32

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	32
3.2 วัสดุอุปกรณ์.....	33
3.3 ระเบียบวิธีการทดลอง.....	34
3.3.1 การสกัดเคราติน.....	34
3.3.2 การทดสอบสมบัติของเคราตินที่สกัดได้.....	36
3.3.3 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุน.....	38
3.3.4 การทดสอบสมบัติของ โครงเลี้ยงเซลล์.....	40
3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	44
4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	45
4.1 การสกัดเคราตินและหาสภาวะที่เหมาะสม.....	45
4.2 ลักษณะสมบัติของเคราตินที่สกัดได้.....	47
4.2.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเคราตินด้วย SDS-PAGE electrophoresis.....	47
4.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างเคราตินที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง โดยวิธีรามานสเปกโตรสโกปี.....	52
4.3 ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์.....	60
4.3.1 ลักษณะทั่วไปทางกายภาพ.....	60
4.3.2 การดูดซับน้ำ.....	68
4.4 สมบัติทางกลของ โครงเลี้ยงเซลล์.....	69
4.5 สมบัติทางชีววิทยา.....	72
4.5.1 ความเข้ากันได้กับเซลล์ในสภาวะเลียนแบบร่างกาย.....	72
4.5.2 การเข้ากันได้กับเซลล์ภายในร่างกาย.....	81
4.6 การย่อยสลายทางชีวภาพของ โครงเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกาย.....	101
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	106
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	106
5.2 ข้อเสนอแนะและงานวิจัยต่อไปในอนาคต.....	107
รายการอ้างอิง.....	108
ภาคผนวก.....	112
ภาคผนวก ก.....	113

ภาคผนวก ข.....	115
ภาคผนวก ค.....	117
ภาคผนวก ง.....	118
ภาคผนวก จ.....	119
ภาคผนวก ช.....	121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	122



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 แสดงองค์ประกอบต่างๆ ภายในเส้นผม.....	6
2.2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ภายในเส้นผมของมนุษย์.....	7
2.3 แสดงวิธีการสกัดเคราตินที่สภาวะต่าง ๆ.....	11
2.4 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในเจลาติน.....	20
2.5 เปรียบเทียบสมบัติของเจลาติน Type A และ B.....	21
2.6 แสดงผลการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast.....	27
4.1 ตารางแสดงผลการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์.....	46
4.2 แสดงขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและ S-sulfo เคราติน.....	62
4.3 แสดงขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและ S-sulfo เคราติน.....	67
4.4 แสดงปริมาณเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่มีชีวิตที่เวลา 96 ชั่วโมง และค่า Doubling time ในโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ.....	78
4.5 แสดงปริมาณเซลล์ Mesenchymal stem cell (MSC) ที่มีชีวิตที่เวลา 96 ชั่วโมง และค่า Doubling time ในโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ.....	80
4.6 แสดงค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ก่อนการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ.....	102
4.7 แสดงค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด หลังจากฝังโครงเลี้ยง เซลล์ในสัตว์ทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ.....	105

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้างของเคราติน Type I และ II.....	4
2.2 แสดงโครงสร้างของแอลฟา-เคราติน.....	5
2.3 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโมเลกุลเคราติน โดยตัวอักษรหนาแสดงลำดับกรดอะมิโน.....	7
2.4 โครงสร้างของเส้นผม.....	8
2.5 กลไกการสกัดเคราตินด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้ 2-mercaptoethanol.....	9
2.6 กลไกการสกัดเคราตินด้วยปฏิกิริยาซัลไฟโตไลซิส โดยใช้ sodium sulphite.....	9
2.7 กลไกการสกัดเคราตินด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้ hydrogen peroxide.....	10
2.8 FT-Raman spectrum ของเคราติน.....	13
2.9 FT-Raman spectrum ของเส้นผม.....	15
2.10 วิเคราะห์น้ำหนักเคราตินด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE).....	16
2.11 แสดงโครงสร้างของเจลาติน.....	19
2.12 แสดงกระบวนการผลิตเจลาติน Type A และ B.....	21
2.13 แสดงวิธีการขึ้นรูปโครงแข็งเซลล์เจลาตินด้วยเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ.....	23
2.14 แสดงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปร่างของ MSCs.....	29
3.1 แสดงแผนการดำเนินงานวิจัย.....	32
3.2 แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง.....	42
3.3 แผนภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง.....	43
4.1 SDS-PAGE ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 1-11.....	48
4.2 กราฟแสดงผลการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์เมื่อเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการสกัด.....	50
4.3 แสดงการเตรียมวัสดุในการสกัดเคราติน.....	51
4.4 กราฟแสดงผลการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์เมื่อเปลี่ยนแปลงวิธีการเตรียมวัสดุ.....	51
4.5 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเส้นผมเมื่อบดด้วยเครื่อง Ball mill.....	51
4.6 FT-Raman spectra ของเส้นผมและเคราตินจากขนแกะ.....	54
4.7 FT-Raman spectra ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 1, 7, 8, 9, 10 และ 11 ที่ช่วงเลขคลื่น 3400-400 cm <sup>-1</sup> .....	55
4.8 FT-Raman spectra ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ที่ช่วงเลขคลื่น 3400-400 cm <sup>-1</sup> .....	56

ภาพประกอบ	หน้า
4.9 FT-Raman spectra ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 1, 7, 8, 9, 10 และ 11 ที่ช่วงเลขคลื่น 800-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	57
4.10 FT-Raman spectra ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ที่ช่วงเลขคลื่น 800-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	58
4.11 แผนภาพแสดงโครงรูปของพันธะ $\text{C}_\alpha$ - $\text{C}_\beta$ - $\text{S}_1$ - $\text{S}_2$ - $\text{C}_\beta$ - $\text{C}_\alpha$ ของพันธะไดซัลไฟด์ในเคราติน.....	59
4.12 รูปถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์ S-sulfo เคราติน.....	60
4.13 การหัตถ์ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราติน.....	63
4.14 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน.....	65
4.15 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ S-sulfoเคราติน.....	66
4.16 กราฟแสดงอัตราการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน Type A.....	69
4.17 กราฟเปรียบเทียบค่า Compressive modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน และ S-sulfo เคราติน.....	70
4.18 กราฟเปรียบเทียบค่า Compressive modulus แบบเปียกและแบบแห้งของโครงเลี้ยง เซลล์ s-sulfo เคราตินผสมกับเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่างๆ .....	72
4.19 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณเซลล์ L929 mouse fibroblastที่มีชีวิตสัมผัส เมื่อทดสอบด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน.....	74
4.20 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณเซลล์ L929 mouse fibroblastที่มีชีวิตสัมผัส เมื่อทดสอบด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟ เคราตินผสมเจลาติน.....	74
4.21 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน เมื่อทดสอบเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast.....	76
4.22 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100) และ S-sulfo เคราติน (s-K100) หลังจากทดสอบเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	76
4.23 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณเซลล์ Mesenchymal stem cell ที่มีชีวิตสัมผัส เมื่อทดสอบด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน.....	79
4.24 แสดงการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ใต้แผ่นหลังของ Wistar rat.....	81
4.25 ภาพถ่ายโครงเลี้ยง G100 และโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 และ KG55 หลังจากฝังใต้แผ่นหลัง Wistar rat ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์.....	83

ภาพประกอบ	หน้า
4.26 โครนเงียงเซลล์ G100 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์.....	84
4.27 โครนเงียงเซลล์ G100 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์.....	85
4.28 โครนเงียงเซลล์ KG55 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์.....	86
4.29 โครนเงียงเซลล์ KG55 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์.....	87
4.30 โครนเงียงเซลล์ KG55 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	88
4.31 โครนเงียงเซลล์ KG82 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์.....	89
4.32 โครนเงียงเซลล์ KG82 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์.....	90
4.33 โครนเงียงเซลล์ KG82 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	91
4.34 โครนเงียงเซลล์ G100 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	92
4.35 โครนเงียงเซลล์ G100 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	93
4.36 โครนเงียงเซลล์ G100 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....	94
4.37 โครนเงียงเซลล์ KG55 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	95
4.38 โครนเงียงเซลล์ KG55 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	96
4.39 โครนเงียงเซลล์ KG55 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....	97

ภาพประกอบ	หน้า
4.40 โคร่งเลี้ยงเซลล์ KG82 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	98
4.41 โคร่งเลี้ยงเซลล์ KG82 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	99
4.42 โคร่งเลี้ยงเซลล์ KG82 หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....	100
4.43 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวของ โคร่งเลี้ยงเซลล์ K100, KG82, KG55 และ G100 ก่อนการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ.....	101
4.44 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวของ โคร่งเลี้ยงเซลล์ G100.....	103
4.45 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวของ โคร่งเลี้ยงเซลล์ KG55.....	103
4.46 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวของ โคร่งเลี้ยงเซลล์ KG82.....	104

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันกลุ่มนักวิจัยจำนวนมาก สนใจศึกษาพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน ไคโตซาน และเจลาติน เป็นต้น เจลาตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างของโปรตีนชนิดเส้นใยมีขนาดใหญ่ พบมากในผิวหนัง ขนสัตว์ เล็บ เขาสัตว์ เส้นขนและเส้นผม เป็นต้น องค์ประกอบส่วนใหญ่ของเจลาตินคือกรดอะมิโนซิสเตอีน (7-20% ของกรดอะมิโนทั้งหมด) จึงมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นมากกว่าโปรตีนชนิดอื่น ทำให้มีเส้นใยเหนียวและมีความยืดหยุ่นสูง [Dowling, LM. และคณะ, 1986] รายงานวิจัยได้นำเสนอการนำเจลาตินมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น ในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม เจลาตินมีคุณสมบัติสามารถดูดซับไขมัน สี [Yamauchi, K. และคณะ, 1997] หรือโลหะหนัก เช่น ตะกั่วและปรอท เป็นต้น [Coello, W.F. และคณะ, 1998] เจลาตินจึงมีศักยภาพจะถูกนำมาใช้บำบัดน้ำเสียที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม หรือกรณีน้ำมันรั่วในทะเลจากเรือขนส่งสินค้า ด้านการแพทย์เจลาตินสามารถนำมาผสมกับตัวยาแล้วขึ้นรูปเป็นเม็ด แคปซูลหรือทำเป็นผงขนาดเล็กเพื่อพ่นเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ เป็นต้น ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เจลาตินสามารถใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ที่บาดเจ็บหรือถูกทำลายไป โดยเจลาตินสามารถขึ้นรูปได้หลายรูปแบบ เช่น แผ่นฟิล์ม [Tanabe, T. และคณะ, 2004] เม็ดขนาดต่างๆ [Yamauchi, K. และคณะ, 1997] หรือขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบมีรูพรุน (sponge) [Tachibana, A. และคณะ, 2002] เป็นต้น จากงานวิจัยต่างๆ เซลล์ที่นำมาเลี้ยงกับโครงเลี้ยงเซลล์คือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (L929 mouse fibroblast cell) ซึ่งมีสมบัติคล้ายเซลล์ผิวหนังชั้นใน (dermis) ของมนุษย์ เจลาตินนั้นมีสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติที่สามารถเข้ากับเซลล์ได้ (biocompatibility) เป็นอย่างดี ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่เซลล์ที่นำไปเลี้ยงและมีสมบัติสามารถย่อยสลายได้ในสภาวะเลียนแบบร่างกาย (*in vitro* degradability)

วิธีการสกัดเจลาตินไม่ซับซ้อน โดยใช้ขนสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ขนแกะหรือขนไก่ ซึ่งมีล้วนแต่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบหลัก สำหรับขนสัตว์นั้น มีปริมาณเจลาตินประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ [Nakamura, A. และคณะ, 2002] คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะใช้เส้นผมของมนุษย์ซึ่งมีเจลาตินเป็นส่วนประกอบและมีปริมาณเจลาตินสูงถึง 65-95 เปอร์เซ็นต์ [Akhtar, W. และคณะ, 1997] และสามารถหาได้ไม่ยากในภาคบริการที่มีทั่วไป ถือเป็น การนำวัสดุที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์มาสร้างเป็นวัสดุที่มีคุณประโยชน์ได้ ข้อดีของการนำเส้นผมมาเป็นวัสดุคิบในการสกัดแทนขนสัตว์อีกประการหนึ่ง คือ ลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคจากสัตว์ เนื่องจากปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของโรค

ใช้หัดคนในแถบเอเชียรวมถึงประเทศไทยด้วย ดังนั้นการนำโปรตีนเคราตินจากเส้นผมมาใช้ประโยชน์จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาพอลิเมอร์ธรรมชาติ และนอกจากนี้รายงานการวิจัยที่มีการใช้เคราตินในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นมีการใช้เคราตินที่สกัดได้จากขนแกะหรือขนไก่ทั้งสิ้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเคราตินจากเส้นผม เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ โดยการศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนที่สกัดได้และทดสอบความเข้ากันได้ของเคราตินกับเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทำการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์ แล้วขึ้นรูปเป็นแบบต่างๆ เพื่อสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยมีวัตถุประสงค์จำเพาะดังต่อไปนี้

1. สกัดเคราตินจากเส้นผม โดยหาสภาวะที่เหมาะสมและศึกษาสมบัติของเคราตินที่สกัดได้
2. ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ศึกษาสมบัติและทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทางด้านงานวิจัย พัฒนาความรู้ทางด้านพอลิเมอร์ธรรมชาติ โดยรู้ถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและสมบัติเคราตินซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติจากเส้นผม
2. ทางด้านการแพทย์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ได้โครงเลี้ยงเซลล์จากเคราตินและผลการทดสอบสมบัติทางชีววิทยา
3. ทางด้านเศรษฐกิจ เคราตินที่สกัดจากเส้นผม สามารถนำมาใช้ทดแทนหรือใช้ร่วมกับพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดอื่นที่มีราคาแพง หรือต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ช่วยลดต้นทุนในการวิจัยหรือการผลิตผลิตภัณฑ์ด้านการแพทย์

## 1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. สกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์และหาสภาวะในการสกัดที่เหมาะสม มีการศึกษาผลของเวลาในการสกัด สารเคมีหลักและความเข้มข้นของสารเคมีหลักที่ใช้ในการสกัด และวิธีการเตรียมวัสดุในการสกัด ที่มีต่อผลได้ (yield)
2. ศึกษาสมบัติทางเคมีของโปรตีนที่สกัดได้
3. ขึ้นรูปเคราตินที่สกัดได้ด้วยวิธีที่เหมาะสมเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุน
4. ศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ ลักษณะพื้นผิว โครงสร้างภายใน ลักษณะรูพรุนด้วย Scanning electron microscope การดูดซับน้ำและความทนทานต่อแรงกด (compression test)

5. ทดสอบสมบัติทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ การเข้ากันได้กับเซลล์ในสภาวะเลียนแบบร่างกาย (*in vitro* biocompatibility) และภายในร่างกาย (*in vivo* biocompatibility) และการย่อยสลายทางชีวภาพภายในร่างกาย (*in vivo* biodegradable)

6. ประเมินศักยภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเคราตินที่สกัดจากเส้นผม และเสนอแนะการปรับปรุงกระบวนการสกัด และการใช้งานเคราตินที่สกัดได้



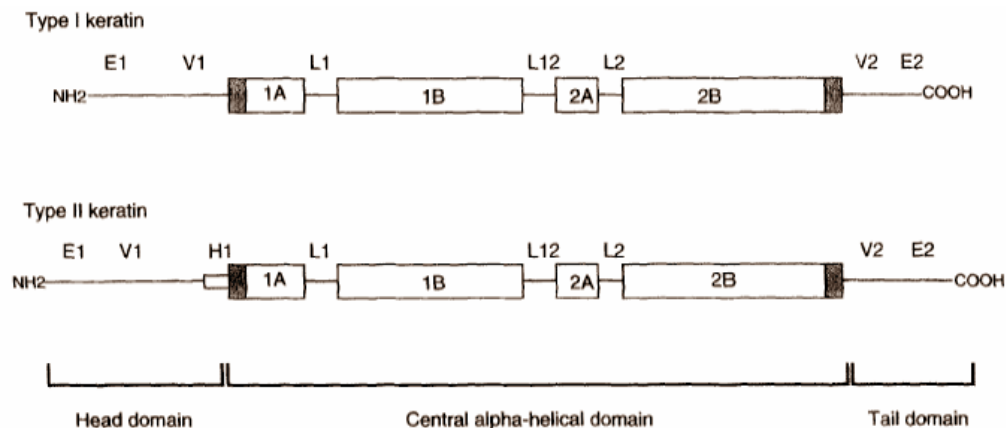
## บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 เคราติน (Keratin) และเส้นผม

เคราตินเป็นโปรตีนแบบเส้นใยที่มีขนาดใหญ่ที่สุด พบมากในผิวหนัง ขนสัตว์ เส้นผม หรือ เขาสัตว์ เป็นต้น เคราตินหนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด และกรดอะมิโนส่วนใหญ่คือกรดอะมิโนซิสเทอีน เนื่องจากกรดอะมิโนซิสเทอีน ( $C_3H_7NO_2S$ ) มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ และสามารถเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลซิสเทอีนได้มากกว่าโปรตีนชนิดอื่น เช่น คอลลาเจน เป็นต้น เคราตินจึงเป็นโปรตีนที่ความแข็งแรง เส้นใยเหนียว ในผิวหนังเคราตินถูกสร้างจากเซลล์เคราติโนไซต์ซึ่งผลิตเคราตินชนิด soft keratin ในขณะที่เส้นผมและเล็บประกอบด้วยเคราตินชนิด hard keratin โดยเคราตินชนิดนี้มีปริมาณซัลเฟอร์ต่ำ (low-sulfur content) [Alber, KM., 1996] เคราตินแบ่งออกเป็นอย่างน้อย 30 ชนิดที่แตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปแบ่งชนิดเคราตินตามขนาดโมเลกุลและประจุ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. **Type I:** มีขนาดเล็กและมีสมบัติเป็นกรด มีขนาดโมเลกุล 40-60 kDa เคราตินชนิดนี้มีค่า Isoelectric point (pI) 4.5-5.1
2. **Type II:** มีขนาดใหญ่กว่าชนิดแรก และมีสมบัติเป็นกลาง-เบส มีขนาดโมเลกุล 55-65 kDa เคราตินชนิดนี้มีค่า Isoelectric point (pI) 6.0-7.2 [Folin, M. และคณะ, 1996]

เส้นใยเคราตินมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 นาโนเมตร โดยเส้นใยเคราตินมีลักษณะเป็นสายพอลิเมอร์ ดังรูปที่ 2.1 ในส่วน central alpha-helical domain ประกอบด้วย subdomains 1A, 1B, 2A และ 2B โดยเชื่อมต่อกันด้วยตัวเชื่อม L1, L12 และ L2 ซึ่งไม่ได้มีโครงสร้างเป็นเกลียว

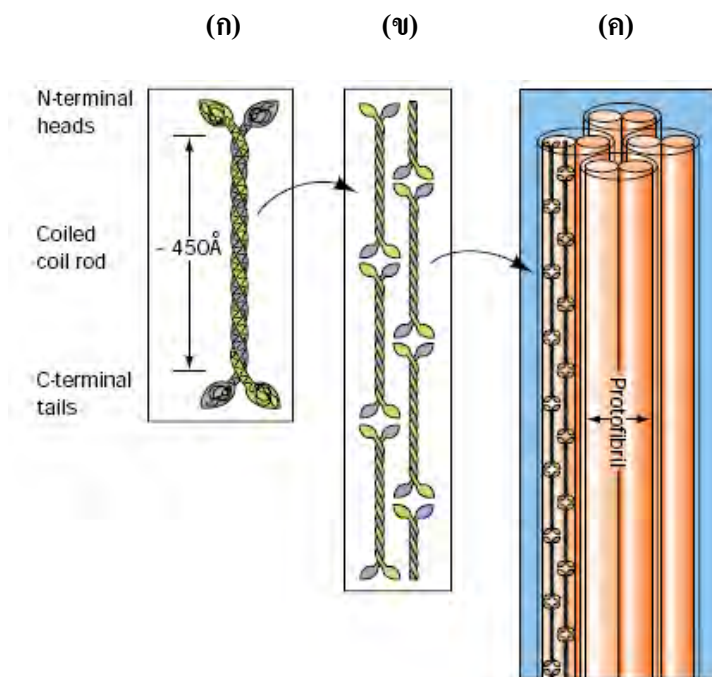


รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของเคราติน Type I และ II

(ที่มา: Alber, KM. Keratin Biochemistry 1996; 14: 309-20.)

นอกจากการแบ่งชนิดเคราตินตามขนาดและประจุแล้ว อาจแบ่งชนิดเคราตินด้วยลักษณะ โครงสร้าง โดยเคราตินมีโครงสร้างที่สำคัญ 2 แบบ คือ

1. แอลฟา-เคราติน ( $\alpha$ -keratin) พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ในเส้นผม หรือเขาสัตว์ สายพอลิเพปไทด์แอลฟา-เคราตินสามารถพันเกลียวเข้าด้วยกัน ดังรูปที่ 2.2 (ก) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า  $\alpha$ -helix ระยะห่างระหว่างเกลียวมีขนาดเท่ากัน โดยมีค่าเท่ากับ  $5.4 \text{ \AA}$  โดยส่วนหัวและส่วนหางของสายโครงสร้างไม่เป็นเกลียว ส่วนหัวมีหมู่อะมิโน (amino) ส่วนหางมีหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนในส่วนปลายทั้งสองด้านสามารถเปลี่ยนแปลงได้ แต่ในส่วนกลางของสายพอลิเพปไทด์ ( $\alpha$ -helix rod domain) มีลำดับกรดอะมิโนที่แน่นอนอน โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน 310 amino acid residue เมื่อสายพอลิเพปไทด์ของแอลฟา-เคราตินพันกัน เกิดเป็นเกลียว ( $\alpha$ -helix) สามารถเชื่อมต่อกันเกิดเป็น โครงสร้างใหม่ที่เรียกว่า protofilament โดย protofilament สองสายเชื่อมต่อกัน เกิดเป็น protofibril [รูปที่ 2.2 (ข)] และ protofibril 4 สาย พันรวมกันเกิดเป็น โครงสร้าง microfibril [รูปที่ 2.2 (ค)]



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของแอลฟา-เคราติน

(ก)  $\alpha$ -helix (dimer) (ข) Protofilament (ค) Microfibril

(ที่มา: Kyte, J., Structure in protein chemistry, Garland Publishing 1995)

2. เบตา-เคราติน ( $\beta$ -keratin) พบในนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีโครงสร้างเป็นแบบแผ่นพับหรือเรียกว่าเบตาชีท (beta sheet) ซึ่งเบตา-เคราตินมีความแข็งแรงกว่าแอลฟา-เคราติน

ในเส้นผมของมนุษย์มีปริมาณเคราตินประมาณ 65-95% ของน้ำหนักผมทั้งหมด และในขนสัตว์ปีก เช่น ขนนกมีปริมาณเคราตินประมาณ 90% ของน้ำหนักทั้งหมด เส้นผมเป็นส่วนที่เจริญออกมาจากผิวหนังในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ช่วยรักษาอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่ เส้นผมประกอบด้วยเซลล์ที่ตายแล้ว ภายในเส้นผมมีไขมัน น้ำ แร่ธาตุ เมลานินและเคราติน องค์ประกอบต่างๆ และปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดภายในเส้นผมมนุษย์แสดงดังตารางที่ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ เคราตินเป็นโพรตีนที่องค์ประกอบหลักคือกรดอะมิโนซิสเตอีน (ตารางที่ 2.2) ซึ่งทำให้โมเลกุลเคราตินสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลของเคราตินได้ จึงทำให้เส้นผมมีความแข็งแรงและเหนียว นอกจากนี้เคราตินมีลำดับกรดอะมิโน RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid) และ LDV (Leucine-Aspartic acid-Valine) (แสดงดังรูปที่ 2.3) ซึ่งเป็นบริเวณที่เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี โดยลำดับกรดอะมิโน RGD และ LDV พบมากใน extracellular matrix protein เช่น fibronectin เป็นต้น [Tachibana, A. และคณะ, 2002]

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบต่างๆ ภายในเส้นผมมนุษย์

องค์ประกอบ	ปริมาณ
ธาตุ	คาร์บอน 45%, ออกซิเจน 28%, ไนโตรเจน 15%, ไฮโดรเจน 7%, ซัลเฟอร์ 5%, เหล็ก 20-220 ppm, ทองแดง 10-20 ppm, สังกะสี 190 ppm และไอโอดีน 0.6 ppm
กรดอะมิโน	ประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน
โพรตีน	1. high-sulphur 80-100% 2. low-sulphur 20% โดยประกอบด้วย $\alpha$ -helix 10%
ไขมัน	5% (คลอเรสเตอรอล, กรดไขมัน polar lipid เป็นต้น)
น้ำ	12% ของน้ำหนักผม

(ที่มา: Akhtar, W. และคณะ, 1997)

321	VESQLAEIRSDLERQNQEYQVLLDVRARLECEINTYRGLL	360
320	VESQLAEIRGDLERQNQEYQVLLDVRARLECEINTYRGLL	359

รูปที่ 2.3 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโมเลกุลเคราติน โดยตัวอักษรหนาแสดงลำดับกรดอะมิโน RGD และ LDV (ที่มา: Tachibana, A. และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ภายในเส้นผมของมนุษย์

Amino acid residue	ปริมาณ (%)	
	เส้นผมมนุษย์	เคราตินจากเส้นผมมนุษย์
Alanine	3.7-4.15	4.55
Arginine	4.92-5.10	5.79
Aspartic acid	4.56-5.00	4.94
Cysteine	0.35-0.41	17.8
Glutamic acid	10.26	11.40
Glycine	10.82	6.38
Histidine	0.57-0.63	0.90
Isoleucine	20.50-24.40	2.59
Leucine	5.15-5.46	5.83
Lysine	1.82-1.96	2.74
Methionine	0.21-0.37	0.58
Phenylalanine	1.29-1.43	1.60
Proline	6.15-6.83	8.44
Serine	9.86-11.01	11.70
Threonine	5.68-5.93	6.81
Tyrosine	1.31-1.70	2.04
Valine	4.21-4.93	5.81

(ที่มา: Wolfram, L.J., J Am Acad Dermatol 2003; 48: 106-114 และ Gillespie, J.M. และ Frenkel, M.J., Comp. Biochem. Physiol. 1974; 47B: 339-346)

โครงสร้างผมประกอบด้วยสามส่วนหลัก คือ

1. **คิวติเคิล (Cuticle)** คือเปลือกนอกของเส้นผม โดยประกอบด้วยเซลล์รูปร่างแบน เรียงตัวซ้อนกัน 6-8 ชั้น ตั้งแต่รากผมจนถึงปลายเส้นผม

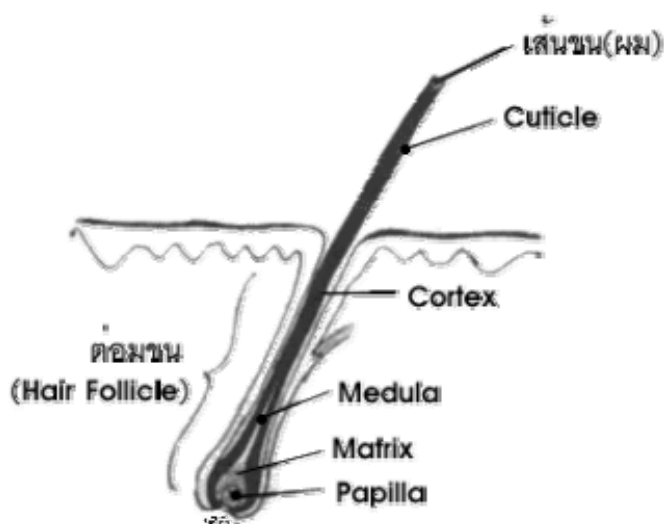
2. **คอร์เท็กซ์ (Cortex)** เป็นชั้นถัดจากชั้นคิวติเคิล โครงสร้างภายในคอร์เท็กซ์ ประกอบด้วยเซลล์รูปกระสวยซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว (spindle-shaped cells) เรียงตัวแน่นตามแนวแกนเส้นผม คอร์เท็กซ์ประกอบด้วยเม็ดสีและโปรตีน ได้แก่ เคราติน โดยเคราตินในเส้นผมมนุษย์อยู่ที่ชั้นนี้ทั้งหมด โปรตีนในชั้นคอร์เท็กซ์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

2.1 High-sulphur protein ขนาดโมเลกุลเล็ก

2.2 Low-sulphur protein ขนาดโมเลกุลใหญ่และโปรตีนมีโครงสร้างเป็นเส้นใย

เม็ดสีที่พบในผมมนุษย์ คือ ยูเมลานิน (eumelanin) ซึ่งแสดงสีน้ำตาลถึงสีดำ และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) ซึ่งแสดงสีบลอนด์หรือสีแดง สำหรับผมขาวนั้นเกิดจากการขัดข้องในการส่งถ่ายเม็ดสีจากเมลานโนไซต์ (melanocyte) ไปยังเคราติโนไซต์ ผมสีเข้มจะมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่าผมสีอ่อน [Akhtar, W. และคณะ, 1997]

3. **เมดูลลา (Medulla)** เป็นชั้นในสุดของเส้นผม ซึ่งไม่พบในสัตว์ชั้นต่ำ ในมนุษย์เมดูลลาอาจมีโครงสร้างที่ต่อเนื่องกันหรือขาดเป็นท่อนๆ ดังรูปที่ 2.4

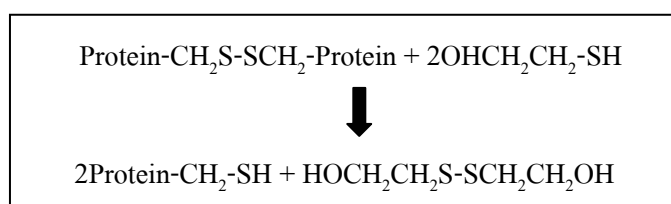


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเส้นผม

## 2.2 การสกัดเคราติน

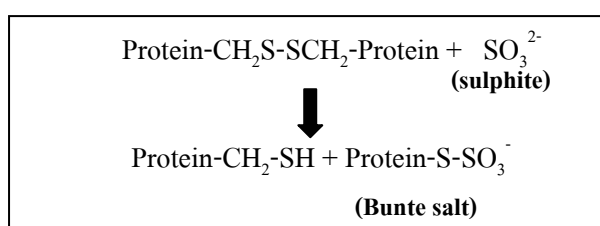
การสกัดเคราตินจากเส้นผม หรือขนสัตว์ ทำโดยการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลของเคราติน โดยสารเคมีหลักที่ใช้คือ urea, thiourea, 2-Mercaptoethanol (2-ME) และ SDS (sodium dodecyl sulfate) ซึ่ง urea และ thiourea ทำหน้าที่ทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในและระหว่างโมเลกุลของโปรตีน และ 2-ME มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลของเคราติน SDS เป็น surfactant ช่วยให้สารละลายเคราตินเสถียร ไม่เกิดการตกตะกอนของโปรตีน การสกัดเคราตินสามารถสกัดได้จาก 2 ปฏิกริยา คือ

1. ปฏิกริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) โดยตัวรีดิวซ์ที่นิยมใช้ได้แก่ สารจำพวกไทออล เช่น Thioglycolic acid, dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol ตัวอย่างกลไกการเกิดปฏิกริยาในการสกัดโดยใช้ 2-mercaptoethanol แสดงดังรูปที่ 2.5



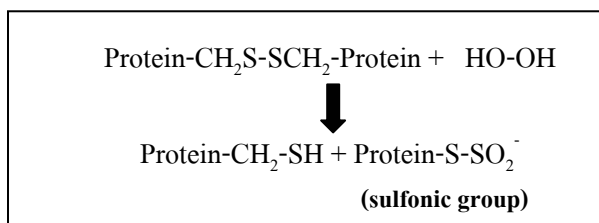
รูปที่ 2.5 กลไกการสกัดเคราตินด้วยปฏิกริยาออกซิเดชัน โดยใช้ 2-mercaptoethanol (ที่มา: Aluigi, A. และคณะ, 2004)

นอกจากนี้สามารถสกัดโดยใช้ sodium sulphite ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) หรือ sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) เกิดปฏิกริยาที่เรียกว่า Sulfitolysis ในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโมเลกุลเคราตินได้เช่นกัน โดยพันธะไดซัลไฟด์ของซิสเทอีนถูกตัดด้วย sulphite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) เกิดเป็นสารประกอบพวกไทออล (-SH) และ สารพวก S-Sulfonate (S-sulfo เคราติน) หรือเรียกว่า Bunte salt กลไกการเกิดปฏิกริยาแสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 กลไกการสกัดเคราตินด้วยปฏิกริยาซัลไฟโตไลซิส โดยใช้ sodium sulphite

2. ปฏิกิริยารีดักชัน (reduction reaction) ตัวออกซิไดซ์ที่ใช้ได้แก่สารประเภท peracids เช่น performic และ peracetic acid เป็นต้น หรืออาจใช้สารประเภท peroxide เช่น hydrogen peroxide เป็นต้น โดยเกิดสารประกอบประเภท sulfonic acid ( $\text{SO}_2^-$ ) กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 กลไกการสกัดเคราตินด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้ hydrogen peroxide

จาก Pharmaceutical patent (US6,544,548) ปี ค.ศ. 2003 เสนอวิธีการสกัดเคราตินจากเส้นผมด้วยปฏิกิริยารีดักชัน โดยใช้ตัวออกซิไดซ์คือ peracetic acid ที่ความเข้มข้น 1- 32% (w/v) และเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลาในการสกัดตั้งแต่ 0-100<sup>0</sup>C และ 0.5-24 ชั่วโมง แต่วิธีที่ดีที่สุดคือ สกัดด้วย peracetic acid 2% (w/v) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100<sup>0</sup>C ได้ผลิตภัณฑ์คือ cysteic acid residue ซึ่งประกอบด้วย sulfonic group ( $\text{SO}_2^-$ ) ซึ่งมีสมบัติเข้ากันได้ดีกับน้ำ (hydrophilic) และสามารถสร้างพันธะไฮออนิกกับสารที่มีประจุบวกได้ [Cherly, R. และคณะ, 2003]

การสกัดเคราตินจากขนสัตว์ได้ yield อยู่ในช่วง 4-6.5 %(wt) การสกัดเคราตินจากเส้นผมได้ yield 24 %(wt) แต่เมื่อเพิ่มสาร thiourea ในการสกัดได้ yield 67 %(wt) และการสกัดเคราตินให้อยู่ในรูป S-sulfo โดยใช้วิธีซัลไฟโตไลซิส (sulfitolysis) ด้วยสาร sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) เพื่อป้องกันเคราตินที่สกัดถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศ เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นอีกครั้ง ซึ่งได้ yield 5 %(wt) [Katoh, K. และคณะ, 2004] ดังตารางที่ 2.3

### ตารางที่ 2.3 แสดงวิธีการสกัดคราตินที่สภาวะต่าง ๆ

วัตถุดิบและสารเคมี	สภาวะ	Yield (%wt/wt)	ที่มา
ขนแกะ (Corridale) 9 g, 8M urea, 1.66M 2-ME, 0.26M SDS	60 <sup>0</sup> C, 5 hr	4 <sup>n</sup>	Tachibana, A. (2002)
ขนแกะ (Corridale) 9 g, 8M urea, 1.66 M 2-ME, 0.26 M SDS	50 <sup>0</sup> C, 16 hr	6.5 <sup>n</sup>	Tanabe, T. (2002)
Conventional method: เส้นผม 20 mg, 25 mM Tris-HCl, 8M urea, 5% 2-ME	50 <sup>0</sup> C, 24 hr	Conventional method: 24 <sup>u</sup>	Nakamura, A. (2002)
Shindai method: เส้นผม 20 mg, 25mM Tris HCl, 5M urea, 2.6M thiourea, 5% 2-ME		Shindai method : 67 <sup>u</sup>	
ขนแกะ (Merino)150 g, 8M urea, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 150 g, SDS 75 g	100 <sup>0</sup> C, 30 min	5 <sup>n</sup>	Katoh, K. (2004)

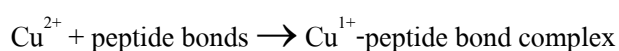
หมายเหตุ: วิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ ก) Lowry method ข) Bradford method

## 2.3 การทดสอบสมบัติของคราติน

### 2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

Lowry's method เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่นิยมกันมาก โดยใช้เทคนิควัดค่าการดูดกลืนแสง (colorimetric assay) โดยค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-750 นาโนเมตร โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสรุปได้ดังนี้

1. ปฏิกิริยา Biuret reaction ซึ่งเกิดปฏิกิริยารีดักชัน  $\text{Cu}^{+2}$  เป็น  $\text{Cu}^{+1}$



$\text{Cu}^{2+}$  ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิกิริยากับพันธะเพปไทด์เกิดสีน้ำเงินแกมม่วง



2. ปฏิกริยาขั้นที่สองคือ  $\text{Cu}^{+1}$  รีดิวซ์ Folin-Ciocalteu reagent (phosphomolybdate และ phosphotungstate) ให้สีน้ำเงินแกมเขียว



สารละลาย Folin-Ciocalteu ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเกลือ ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนไทโรซีนและทริปโตเฟน เกิดสารละลายสีน้ำเงินเข้มแกมเขียวขึ้น [Lowry, O.H. และคณะ, 1951]

สำหรับการทดลองนี้เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น การสร้างกราฟมาตรฐานทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) จากนั้นเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนอ้างอิงที่ทราบความเข้มข้น

#### ข้อดี

1. สามารถทดสอบได้ในช่วงความเข้มข้นกว้าง คือ 2-100 ไมโครกรัม
2. สามารถทำการทดสอบที่อุณหภูมิห้องได้ สะดวก รวดเร็ว
3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ราคาถูก

#### ข้อเสีย

1. อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากมีสารที่สามารถรบกวนการวิเคราะห์ได้
2. ในการเตรียมสารที่ใช้วิเคราะห์ โดยเฉพาะ copper ในสารละลายเบสต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรวิเคราะห์ เนื่องจากเมื่อเก็บไว้นานจะเกิดสารพวกคาร์บอนเนต ซึ่งจะทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงคลาดเคลื่อนไป
3. การวิเคราะห์นั้นไวต่อแสงมาก ดังนั้นควรเก็บสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้พ้นแสง

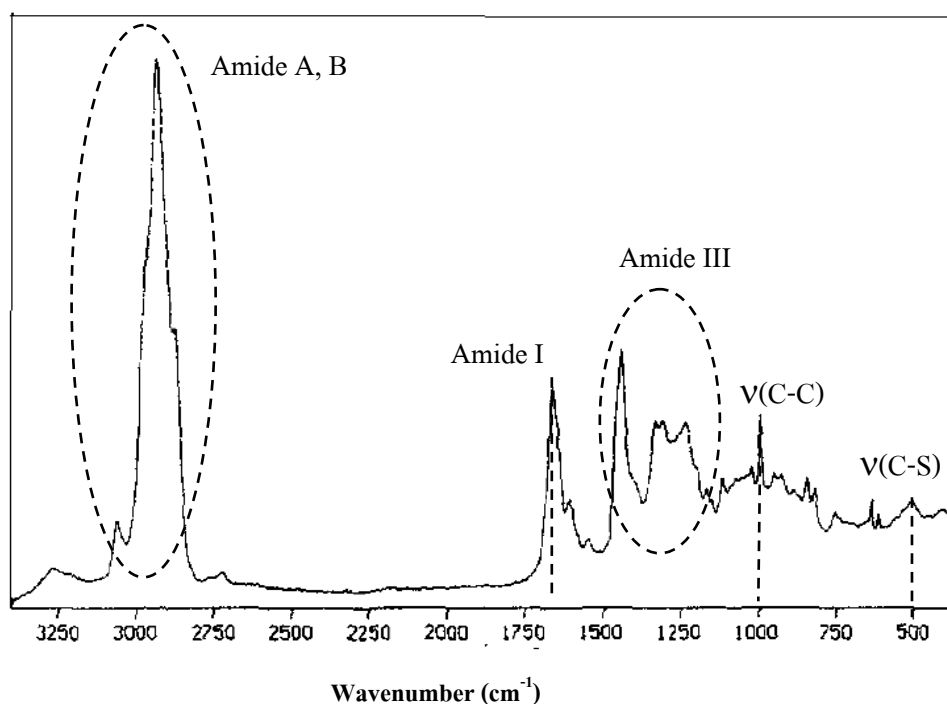
### 2.3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างของเคราตินโดยวิธีรามานสเปกโตรสโกปี (Fourier Transform Raman Spectroscopy)

เทคนิครามานสเปกโตรสโกปีสามารถใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสาร เช่น สารตัวอย่างประกอบด้วยพันธะระหว่างธาตุชนิดใดบ้าง โดยใช้หลักการกระเจิงของแสง โดยส่องลำแสงพลังงานสูงผ่านสารตัวอย่าง จะเกิดการกระเจิงของแสงไปในทุกทิศทาง ในปี 1928 นักฟิสิกส์ชาวอินเดีย C.V.Raman ได้ค้นพบว่า ลำแสงที่ส่องผ่านสารตัวอย่างจะมีความยาวคลื่น

เปลี่ยนไปส่วนหนึ่ง เนื่องจากเกิดการกระเจิงของแสง และนอกจากนี้ยังพบว่าความยาวคลื่นที่เปลี่ยนแปลงไปจะแตกต่างกันไปตามโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลของสารตัวอย่างอีกด้วย

สำหรับเทคนิครามานสเปกโตรสโกปีนั้นคล้ายกับเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีคือวัดการสั่นของโมเลกุลนั่นเอง ต่างกันตรงที่หมู่ที่จะเกิด Raman active และ Infrared active บางครั้งในการใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างอาจใช้เทคนิครามานสเปกโตรสโกปีวิเคราะห์ได้ดีกว่าอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี ในขณะที่สารตัวอย่างบางตัวเหมาะที่จะใช้เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีวิเคราะห์ ข้อดีที่สำคัญของเทคนิครามานสเปกโตรสโกปีคือ น้ำไม่รบกวนการวิเคราะห์เหมือนดังเช่นเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี เราสามารถใช้เทคนิครามานวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นสารละลาย จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญสำหรับทางชีววิทยาและการศึกษาเกี่ยวกับมลพิษทางน้ำ

ในปี 1997 W. Akhtar และคณะได้ใช้เทคนิครามานสเปกโตรสโกปี ในการศึกษาเส้นผมของมนุษย์ในสภาวะต่าง ๆ คือ ผมหงอกและผมดำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ [Akhtar, W. และคณะ, 1997] โดยใช้คราตินเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์เส้นผม ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 FT-Raman spectrum ของคราติน;  $\lambda$  1064 nm, 100 mW, 400 scans ที่  $4 \text{ cm}^{-1}$  resolution

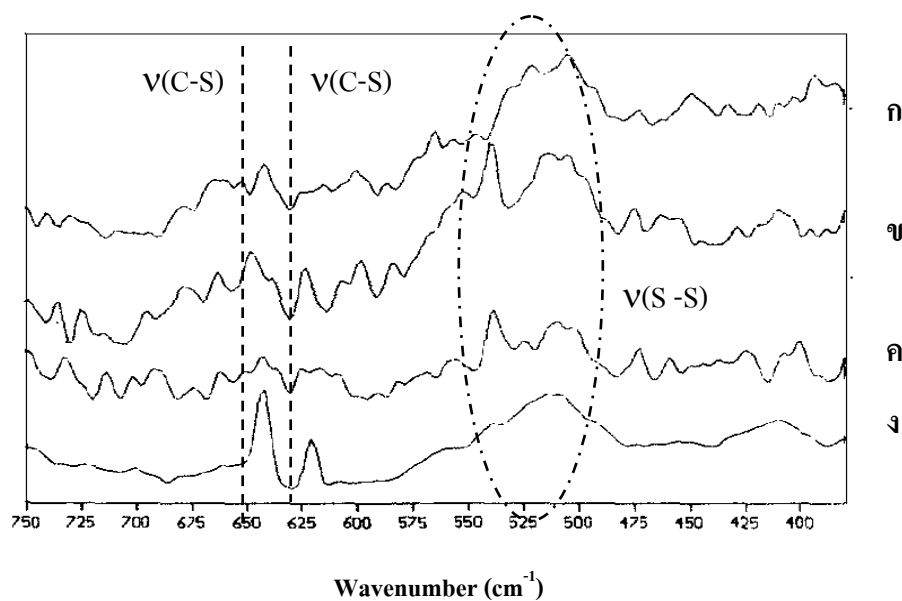
(ที่มา: Akhtar, W. Spectrochem Acta Part A 1997; 53:1021-31.1997)

พิจารณาสเปกตรัมของเคราติน พบพีกที่แสดงการสั่นของแต่ละพันธะดังต่อไปนี้

1. Amide A และ B: แสดงการสั่นของพันธะ N-H ซึ่งพบพีก (doublet) ที่เลขคลื่น 3,300-3,050  $\text{cm}^{-1}$
2. Amide I: แสดงถึงการสั่นของ peptide carbonyl stretching (CONH) และ CN stretching โดยจะพบพีกที่ประมาณ 1,652  $\text{cm}^{-1}$
3. Amide II: แสดงการสั่นของ NH in plane และ CN stretching ที่ 1,545-1,550  $\text{cm}^{-1}$
4. Amide III: แสดงการสั่นของ NH in-plane bending และ CN stretching พบที่ 1,200-1,400  $\text{cm}^{-1}$
5. ที่เลขคลื่นในช่วง 1,000-1,150  $\text{cm}^{-1}$  แสดงการสั่นแบบยืดของพันธะ C-C (skeletal backbone)
6. Amide IV: แสดงการสั่นของ CO in-plane bending และ CC stretching พบที่ 640-645  $\text{cm}^{-1}$
7. Amide V, VI และ VII: โดย amide V แสดงการสั่นของ NH out-of plane bending ในขณะที่ Amide VII เกิดจากการสั่นของ CO out-of-plane bending และ Amide VII เกิดจากการสั่นของ NH out-of-plane bending และ CN
8. พันธะไดซัลไฟด์ ในโปรตีนพันธะไดซัลไฟด์เกิดจากการสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลซิสเทอีน ซึ่งจะพบการสั่นที่บริเวณ 500-550  $\text{cm}^{-1}$



จากข้อมูลสเปกตรัมของเคราตินเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิครามานสเปกโตรสโกปี W. Akhtar และคณะ ศึกษาเส้นผมที่ผ่านกระบวนการกัดสีเปรียบเทียบกับเส้นผมธรรมชาติ โดยผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิครามานสเปกโตรสโกปีแสดงดังรูปที่ 2.9



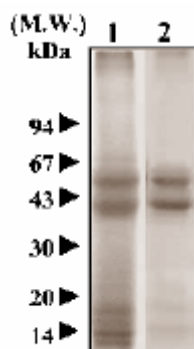
รูปที่ 2.9 FT-Raman spectrum ของเส้นผม โดย ก) ผมธรรมชาติ ข) ผมกัศลี ค) รากผม และ ง) เคราติน ที่เลขคลื่น 400-750  $\text{cm}^{-1}$

สเปกตรัมในช่วงเลขคลื่นต่ำกว่า  $750 \text{ cm}^{-1}$  แม้จะมีความเข้มต่ำแต่สามารถชี้บ่งบอกลักษณะที่สำคัญได้แก่พันธะ C-S และ S-S ซึ่งเทคนิคอื่นไม่สามารถวิเคราะห์ได้ชัดเจน โดยจากการศึกษาของ W. Akhtar และคณะ พบว่า สเปกตรัมเคราติน (รูป 2.8 ก.) เกิดพีกที่มีความเข้มแตกต่างกับสเปกตรัมของเส้นผม (รูป 2.8 ก.) ที่เลขคลื่น 625 และ  $648 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงการสั่นของพันธะ C-S นอกจากนี้ที่เลขคลื่นในช่วง  $500-550 \text{ cm}^{-1}$  บอการสั่นของพันธะเชื่อมระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอิน (CS-SC) ซึ่งพบทั้งสเปกตรัมของเส้นผมและเคราติน โดยสเปกตรัมพบการสั่นของ CS-SC ที่เลขคลื่นเท่ากับ  $506$  และ  $529 \text{ cm}^{-1}$  และเคราตินที่เลขคลื่นเท่ากับ  $515$  และ  $535 \text{ cm}^{-1}$

### 2.3.4 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ SDS หรือ Sodium dodecyl sulfate ซึ่งมีประจุลบทำหน้าที่จับโปรตีนในอัตราส่วน SDS 1 โมเลกุลต่อกรดอะมิโน 2 ตัว ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ เป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนในโปรตีน ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้น เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสสามารถคำนวณหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนเทียบกับอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนตัวอย่างกับอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน อัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์คือสัดส่วนของอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนกับอัตราการเคลื่อนที่ของ Bromphenol blue [Grabski, A. และคณะ, มหาวิทยาลัย Wisconsin-Madison]

เคราตินที่สกัดจากเส้นผมมนุษย์เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า การสกัดเคราตินด้วย urea และ thiourea สามารถสกัดได้เคราตินเส้นใย (microfibril keratin) มีขนาดโมเลกุล 40-60 kDa และขนาดโมเลกุลเล็ก 10-20 kDa และส่วนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ 110-115 และ 125-135 kDa ในขณะที่การสกัดเคราตินด้วย urea พบเคราตินที่มีขนาดโมเลกุล 40-60 kDa เท่านั้น [Nakamura, A. และคณะ, 2002] แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 วิเคราะห์เคราตินด้วย SDS-PAGE

1. สกัดเคราตินด้วยสารละลาย urea และ thiourea 2. สกัดเคราตินด้วยสารละลาย urea

(ที่มา: Nakamura, A. และคณะ, 2002)

## 2.4 การขึ้นรูปเคราติน

จากการศึกษาผลงานวิจัยต่างๆ พบว่า เมื่อสกัดเคราตินจากขนสัตว์ เช่น ขนแกะและขนไก่ ด้วยวิธีใดก็ตาม จากนั้นนักวิจัยทำการขึ้นรูปเคราตินที่สกัดได้เป็นหลายรูปแบบ เช่น แผ่นฟิล์ม เม็ด ขนาดต่างๆ หรือฟองน้ำ เป็นต้น แล้วนำไปใช้งาน โดยการขึ้นรูปในแต่ละแบบนั้น จะมีประโยชน์หรือการนำไปใช้ที่แตกต่างกันไป

การขึ้นรูปมีสามลักษณะ คือ

### 2.4.1. แผ่นฟิล์ม

จากงานวิจัยต่างๆ ที่มีการขึ้นรูปเคราตินเป็นแผ่นฟิล์ม โดยมีการขึ้นรูปด้วยวิธีต่างๆ กัน เช่น การใช้ความดันอัดเคราตินให้เป็นแผ่นฟิล์ม [Katoh, K. และคณะ, 2004] หรือการเทสารละลายลงบนพิมพ์ (cast) และอบให้แห้ง เป็นต้น โดยในปี 2002 Tanabe, T. และคณะ ปรับปรุงแผ่นฟิล์มเคราตินให้มีสมบัติเชิงกลดีขึ้น โดยการผสมเคราตินกับไคโตซาน เนื่องจากแผ่นฟิล์มเคราตินมีสมบัติเชิงกลต่ำ เพราะบาง โดย Tanabe และคณะสกัดเคราตินจากขนแกะ (corriedale) และผสมกับไคโตซานในสารละลายกรดอะซิติก 75% และขึ้นรูปฟิล์มโดยเทสารละลายผสมลงในแม่พิมพ์และอบที่อุณหภูมิ 50°C 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบสมบัติเชิงกลของฟิล์มพบว่า ไคโตซานช่วยให้แผ่นฟิล์ม

เคราตินแข็งมากขึ้นแต่ไม่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่แผ่นฟิล์ม เมื่อเพิ่มไคโตซาน 30%(wt) ฟิล์มมีค่า ultimate strength ประมาณ 27 MPa ค่า ultimate elongation 5% และค่า Young's modulus 310 MPa ในขณะที่แผ่นฟิล์มเคราตินไม่สามารถทดสอบได้

ในปี ค.ศ. 2004 K. Katoh และคณะ หลังจากทำการสกัดเคราตินจากขนแกะ (Merino) ให้อยู่ในรูป S-Sulfo (Butane salt) เพื่อให้เคราตินที่สกัดได้มีความเสถียร ไม่ถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศ และเกิดการสร้างพันธะไคซัลไฟด์อีกครั้ง โดยใช้วิธี Sulfitolysis [Katoh, K. และคณะ, 2004] จากนั้นขึ้นรูปฟิล์มโดยนำสารละลายเคราตินที่สกัดได้ทำให้เป็นผงด้วยวิธี spray drying จากนั้นนำผงเคราตินละลายในสารละลายผสมระหว่างน้ำกับเอทานอล จากนั้นเทสารละลายผสมที่ได้ลงแม่พิมพ์แล้วอัดความดัน 5 MPa 5 นาที และอัดที่ 10 MPa 50 นาที ที่อุณหภูมิ 70-160°C เมื่อนำไปทดสอบสมบัติเชิงกลพบว่า เมื่ออัดความดันที่อุณหภูมิ 120°C ให้แผ่นฟิล์มที่มีสมบัติเชิงกลดีที่สุด โดยมีค่า Young's modulus 1218 MPa และค่า ultimate strength 27.8 MPa

ในปีเดียวกัน T. Tanabe และคณะ ขึ้นรูปสารละลายเคราตินที่สกัดได้จากขนแกะ (Corriedale) เป็นแผ่นฟิล์มเช่นกัน โดยขึ้นรูปแผ่นฟิล์มด้วยการเติมสารเชื่อมโยงพันธะประเภทไดอ็อกซี (diepoxy) ได้แก่ ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) และ glycerol diglycidyl ether (GDE) [Tanabe, T. และคณะ, 2004] เพื่อเพิ่มความเหนียวและแข็งแรงให้กับแผ่นฟิล์ม โดยเติมสารเชื่อมโยงพันธะในสารละลายเคราตินที่สกัดได้ จากนั้นเทสารละลายลงบนแม่พิมพ์และอบที่อุณหภูมิ 50°C ได้แผ่นฟิล์มและนำไปทดสอบสมบัติเชิงกลพบว่า เมื่อเติมสารเชื่อมโยงพันธะ 30 มก. ทำให้แผ่นฟิล์มเหนียวที่สุด โดยมีค่า ultimate elongation เท่ากับ 14% ในขณะที่แผ่นฟิล์มเคราตินไม่สามารถนำมาทดสอบได้ และแผ่นฟิล์มเคราตินผสมไคโตซานซึ่งมีค่า ultimate elongation เท่ากับ 5% [Tanabe, T. และคณะ, 2002]

#### 2.4.2 ฟองน้ำ (Sponge)

ในปี ค.ศ. 2002 A. Tachibana และคณะ สร้างโครงเลี้ยงเซลล์ โดยขึ้นรูปสารละลายเคราตินให้มีรูพรุนลักษณะคล้ายฟองน้ำ โดยใช้เทคนิคการทำให้แห้งโดยการใช้น้ำเย็น (lyophilization) หลังจากนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 3 วัน จะได้โครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำที่มีความเสถียร ไม่เปลี่ยนรูปร่างเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาหลายชั่วโมง และศึกษาโครงสร้างภายใน พบว่ามีความเป็นรูพรุนดี โดยมีขนาดรูพรุนประมาณ 100 ไมโครเมตร [Tachibana, A. และคณะ, 2002]

ในปี ค.ศ. 2004 K. Katoh และคณะ ใช้เทคนิค CM/PL หรือ compression-molding/particulate-leaching ในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ S-sulfo keratin แบบฟองน้ำ โดยสามารถควบคุมขนาดของรูพรุนและความพรุนได้ โดยสกัด S-Sulfo keratin จากขนแกะแล้วทำ spray-dried

ได้ S-Sulfo keratin powder แล้วผสมด้วยยูเรียและ sieve NaCl-paticulate แล้วขึ้นรูปโดยอัดความดันที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของยูเรีย จากนั้นกำจัดเกลือและยูเรียจะได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูเชื่อมต่อกัน ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์คือ น้อยกว่า 100 ไมโครเมตร, 100-300 ไมโครเมตร และ 300-500 ไมโครเมตร มีความเป็นรูพรุนสูงถึง 90% โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นมีความแข็งแรงและไม่ละลายในน้ำ ไม่มีการบวมที่ pH 7.4 และ 9.1 แต่จะเกิดการบวมหรือละลายได้ในสารละลาย 2-mercaptoethanol การที่มีสมบัติไม่ละลายในน้ำทำให้เป็นข้อดีของเคราตินมากกว่าการผลิตจากคอลลาเจนเพราะคอลลาเจนละลายในน้ำถ้าไม่มีการ crosslink ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือเติมสารเคมีที่มักเป็นพิษต่อเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์จากเคราตินข้างต้นสามารถนำไปเลี้ยงเซลล์ได้และย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิตและในการทดลอง จึงเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการรักษาบาดแผล [Katoh, K. และคณะ, 2004]

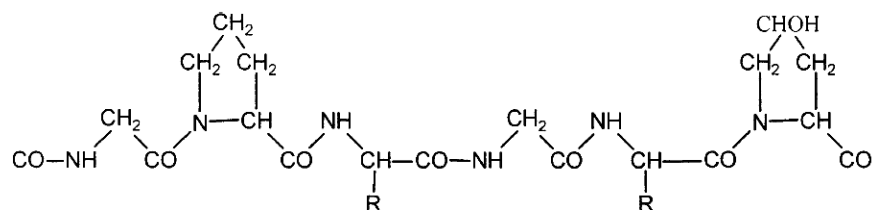
### 2.4.3 ไมโครแคปซูล (Microcapsule)

ในปี ค.ศ.1997 Yamauchi และ Khoda ขึ้นรูปเคราตินให้มีลักษณะเป็นเม็ด โดยการใช้คลื่นเสียง (sonication) นำสารละลายเคราตินที่สกัดได้ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น โทลูอินและไซลีนทำโซนิเคตสารละลาย จะได้เม็ดเคราตินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-10 มิลลิเมตร หนา 0.05-0.1 มิลลิเมตร เมื่อนำน้ำมัน ไขมันและสีต่าง ๆ ละลายในตัวทำละลาย พบว่าเม็ดเคราตินจะกักไขมัน น้ำมันและสีต่าง ๆ ไว้ข้างใน และเม็ดเคราตินเสถียรในน้ำเดือดและตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่ รวมถึง Dimethyl formamide และ Dimethyl sulfoxide โดยเคราตินไม่เสีรูปร่าง แต่เม็ดเคราตินจะเสีรูปร่างเมื่ออยู่ในสารละลายเจือจางของสารจำพวก Mercaptanol เช่น 2-mercaptoethanol และ Dithiotheritol [Yamauchi, K. และคณะ, 1997] นอกจากนี้ก็วิจัยยังสนใจที่จะนำเม็ดเคราตินเป็นตัวส่งถ่ายสารมีฤทธิ์ทางชีววิทยา (biologically active compound)

### 2.5 เจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากการนำคอลลาเจนทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Partial hydrolysis) จากนั้นผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และทำให้แห้งได้เจลาตินที่มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเส้นเอ็น ผิวหนัง กระดูกและเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัว และหมู เป็นต้น เจลาตินประกอบด้วยโปรตีน 90-84%, แร่ธาตุ 1-2% และน้ำ 8-15% ซึ่งองค์ประกอบของเจลาตินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของคอลลาเจนที่ใช้และกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เจลาตินมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 100,000 Da โดยเจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด โดยมีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีน, โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยรายละเอียดปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในเจลาตินสรุปดังตารางที่ 2.4 ลำดับ

กรดอะมิโนของเจลาตินโดยทั่วไปคือ –Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- โครงสร้างของเจลาตินแสดงดังรูปที่ 2.11



R = glycine-X-Y triplet

X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

### รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้างของเจลาติน

(ที่มา: Lee, SB., 2003; 24: 2503-2511.)

เจลาตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้รับความสนใจในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติที่เหมาะสม คือ สามารถเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต (biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) ไม่ก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (nonimmunogenic) และราคาถูก โดยทั่วไปเจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Type A หรือเรียก Basic gelatin เจลาตินชนิดนี้ได้จากการผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟูริก เป็นต้น โดยใช้คอลลาเจนที่ได้จากหนังหมูเป็นส่วนใหญ่ สมบัติของเจลาตินชนิดนี้ คือ มีค่า pI (isoelectric point) ประมาณ 9 เหมาะสำหรับการใช้งานกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

2. Type B หรือเรียก Acidic gelatin ได้มาจากการผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเบส นิยมใช้คอลลาเจนจากหนังวัวและกระดูก ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสด้วยเบสนี้เกิดปฏิกิริยาที่กลุ่มเอไมด์ของคอลลาเจนซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิล แสดงถึงเจลาตินชนิดนี้มีประจุเป็นลบ เจลาติน type B มีค่า pI (isoelectric point) ประมาณ 5 เหมาะสำหรับการใช้งานกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส

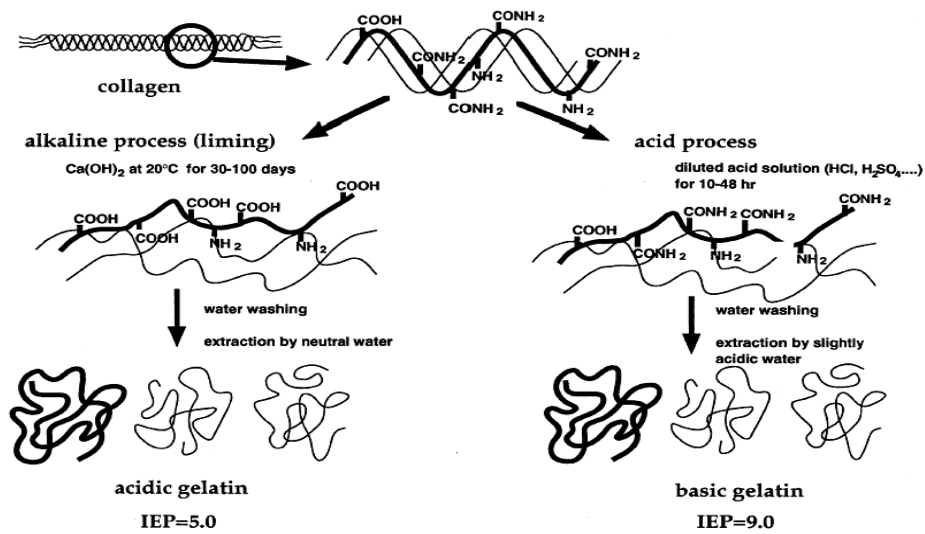
กระบวนการผลิตเจลาตินและสมบัติของเจลาติน Type A และ B แสดงดังรูปที่ 2.12 และตารางที่ 2.5 ตามลำดับ



ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณกรดอะมิโนในเจลาติน

Amino acid residue	ปริมาณในเจลาติน (%)
Glycine	30.50
Alanine	9.20
Isoleucine	1.50
Leucine	3.20
Valine	2.70
Serine	2.90
Threonine	2.20
Proline	16.30
Phenylalanine	2.10
Tyrosine	0.69
Tryptophan	-
Methionine	0.80
Cystine	0.09
Histidine	0.67
Arginine	8.80
Lysine	5.10
Aspartic acid	6.30
Glutamine acid	11.70

(ที่มา: Neuman, RE., 1949; 289-297.)



รูปที่ 2.12 แสดงกระบวนการผลิตเจลาติน Type A และ B

(ที่มา: Tabata, Y., 1998; 31: 287-301.)

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบสมบัติของเจลาติน Type A และ B

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

ปี ค.ศ. 2003 Young Moo Lee และคณะ ผลิตโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคน ( $\beta$ -glucan) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนเชื่อมต่อกัน โดยขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 90-150 ไมโครเมตร เมื่อนำมาทดสอบเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast พบว่า การยึดเกาะของเซลล์บน โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคน ใกล้เคียงกับการยึดเกาะของเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ (polystyrene petri dish) เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วบน โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคน ที่อัตราส่วน 90/10 wt/wt การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วน

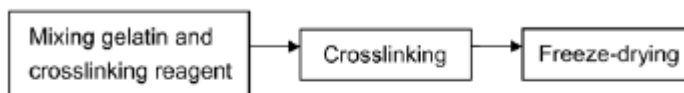
ของเจลาตินต่อเบตา-กลูแคนเพิ่มมากขึ้น ที่เวลา 48 ชั่วโมง โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนอัตราส่วน 90/10 wt/wt มีจำนวนเซลล์ประมาณ 330,000 เซลล์ ในขณะที่โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมเบตา-กลูแคนอัตราส่วน 50/50 wt/wt มีจำนวนเซลล์ประมาณ 200,000 เซลล์ [Lee, Y.M. และคณะ, 2003]

ในปี ค.ศ. 2005 Young Moo Lee และคณะ สร้างโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินโดยใช้วิธี salt-leaching โดยเปรียบเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง วิธี salt-leaching สามารถสร้างโคร่งเลี้ยงเซลล์ให้มีรูพรุนได้ตามที่ต้องการ งานวิจัยนี้โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 350 ไมโครเมตร ความแข็งแรงของโคร่งเลี้ยงเซลล์ และอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อความพรุนของโคร่งเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อนำโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินทดสอบการเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ human fibroblast เมื่อเวลา 1 สัปดาห์ผ่านไป พบว่า โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยเทคนิค salt-leaching เซลล์เกาะที่บริเวณรูพรุนของโคร่งเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่สร้างด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็งเซลล์ส่วนใหญ่รวมตัวกันอยู่ที่บริเวณด้านบนและด้านล่าง โคร่งเลี้ยงเซลล์ ที่เวลา 2 สัปดาห์ เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดีและมีเซลล์แผ่ซึ่งแสดงถึงความเข้ากันได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้โคร่งเลี้ยงเซลล์ยังไม่มีการย่อยสลาย การทดลองภายในร่างกาย (in vivo) พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์และมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ [Lee, Y.M. และคณะ, 2005]

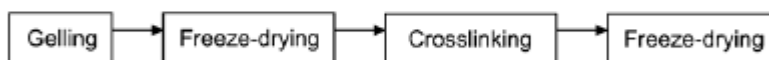
ปี ค.ศ. 2007 Lien, S.M. และคณะ ศึกษาวิธีการเชื่อมโยงพันธะ โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วย glutaraldehyde (GTA) และ genipin (GP) ที่แตกต่างกันได้แก่ วิธีที่ 1 (mixing-crosslinking) ผสมสารเชื่อมโยงพันธะกับสารละลายเจลาตินและทำแห้งเยือกแข็ง วิธีที่ 2 (scaffold-crosslinking) นำสารละลายเจลาตินแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้สารละลายเจลาตินเป็นเจล และทำแห้งเยือกแข็ง จากนั้นทำการเชื่อมโยงพันธะโดยการจุ่มในสารละลายตัวเชื่อมโยงพันธะและทำแห้งเยือกแข็ง และวิธีที่ 3 (gel-crosslinking) คล้ายคลึงกับวิธีที่ 2 หลังจากให้นำสารละลายเจลาตินแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเปลี่ยนสภาพเป็นเจล จากนั้นนำเจลจุ่มในสารละลายตัวเชื่อมโยงพันธะและทำให้แห้งเยือกแข็ง วิธีการเชื่อมโยงพันธะสรุปดังรูปที่ 2.13 Huang, T.G. และคณะ ศึกษาสมบัติของโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ พบว่าโคร่งสร้างของโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยวิธีที่ 1 มีรูพรุนสม่ำเสมอและเชื่อมโยงกันแต่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าวิธีที่ 2 และ 3 เมื่อนำโคร่งเลี้ยงเซลล์ทดสอบเลี้ยงเซลล์ chondrocytes จากข้อต่อของ Wistar rat และวิเคราะห์ด้วยการย้อมสี H&E พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 9 วัน หลังจากการเพาะเซลล์ โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมโยงพันธะด้วย GP มีการสร้างคอลลาเจนและ glycosaminoglycan เมื่อผ่านไป 30 วันหลังจากเพาะเซลล์ พบว่าเซลล์มีการกระจายทั่วเนื้อเยื่อลักษณะเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อกระดูก แสดงให้เห็นว่า

โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่สร้างด้วยวิธีที่ 3 (gel-crosslinking) สามารถประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก [Lien, S.M. และคณะ, 2006]

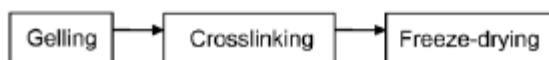
**Method I : mixing-crosslinking**



**Method II : scaffold-crosslinking**



**Method III : gel-crosslinking**



**รูปที่ 2.13** แสดงวิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีต่างๆ  
(ที่มา: Lien, S.M. และคณะ, 2006)

## 2.6 โครงเลี้ยงเซลล์

สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ วัสดุและการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์เป็นสิ่งสำคัญ โครงเลี้ยงเซลล์(Scaffold)หรือ Artificial extracellular matrices (ECM) คือ วัสดุที่สร้างขึ้นชั่วคราวทรงสามมิติเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ได้ โดยอาจทำการฉีดเซลล์เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์และเซลล์จะเจริญเติบโตอยู่ภายในซึ่งต้องมีสารอาหารและการควบคุมโมเลกุลที่ต้องแพร่ผ่านโครงเลี้ยงเซลล์ (โปรตีนและ growth factor เป็นต้น) ลิงกระตุ้นทางกายภาพและเชิงกล อุณหภูมิ ความดันและการขนส่งมวลสารต้องเหมาะสมกับการงอก การแบ่งเซลล์และการเกิดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่ ในขณะที่เดียวกันที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะเกิดขึ้นมาใหม่นั้น วัสดุที่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ต้องสามารถย่อยสลายและไม่ทิ้งสิ่งแปลกปลอมไว้ในร่างกาย [Peter, X. Ma, 2004] โดยทั่วไปเรานำโครงเลี้ยงเซลล์ใช้กับผิวหนัง กระดูก ประสาทและตับ เป็นต้น

หลักที่ต้องคำนึงในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ไป คือ

1. โครงสร้างเป็นสามมิติ เพื่อเป็นโครงสร้างค้ำจุนให้เซลล์สามารถเจริญเติบโต
2. มีความเป็นรูพรุนสูง โดยมีความเป็นรูพรุนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

และรูพรุนต้องมีขนาดที่เหมาะสม โดยทั่วไปขนาดรูพรุนประมาณ 100-200 ไมโครเมตร และรูพรุนควรเชื่อมต่อกัน (Interconnected pore) เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อ

สามารถเจริญเติบโตได้ สารอาหารและของเสียต่างๆ สามารถส่งผ่านภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างสะดวก

3. มีลิแกนด์หรือสมบัติทางเคมีสำหรับให้เซลล์สามารถยึดเกาะ เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้
4. สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย โดยไม่ทิ้งสารที่เป็นพิษไว้ ร่างกายสามารถกำจัดได้ตลอดเวลา และมีอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสมกับอัตราการเกิดขึ้นของเนื้อเยื่อใหม่
5. มีโครงสร้างที่แข็งแรงพอสำหรับค้ำจุนเนื้อเยื่อ
6. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์
7. ควรมีสมบัติเพิ่มการเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโต

รายละเอียดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ต้องพิจารณาคือ

### 2.6.1. ขนาดรูพรุนและความพรุน

ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่จะสร้างขึ้นนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อที่เราต้องการนำไปใช้ เช่น ผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บจากการเผาไหม้ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับผิวหนังแท้ ควร มีรูพรุนประมาณ 150 ไมโครเมตร และเซลล์ osteoblast จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ประมาณ 200-400 ไมโครเมตร สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่โดยทั่วไปควรมีขนาดรูพรุนอย่างน้อย 100 ไมโครเมตร [Chang, B.S และคณะ, 2000] และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน 150-300 ไมโครเมตรและ 500-710 ไมโครเมตร จะช่วยให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ดีขึ้น[Ishaug, S.L. และคณะ, 1998] ขนาดรูพรุนสามารถแบ่งออกเป็นสามประเภทคือ

- Microporous มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนน้อยกว่า 2 นาโนเมตร โมเลกุลขนาดเล็กๆ เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้

- Mesoporous ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนอยู่ในช่วง 2-50 นาโนเมตร โดยโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้

- Macroporous ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนใหญ่กว่า 50 นาโนเมตร โดยโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่และเซลล์สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้

สำหรับเส้นเลือดจะสามารถแทรกเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร และเมื่อขนาดรูพรุนและความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่าง ๆ และเซลล์เพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ปฏิกิริยาการตอบสนองของเนื้อเยื่อข้างเคียงและเซลล์ที่มีต่อโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นอยู่กับรูปร่าง พื้นผิวภายนอกและโครงสร้างภายในของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยจากงานวิจัยของ

Palsson B. เสนอว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูปร่างโค้งช่วยให้ปฏิกิริยาตอบสนองกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ดีที่สุด [Palsson, B., 2003] โครงเลี้ยงเซลล์ที่ดี โครงสร้างของรูพรุนควรเชื่อมโยงกัน เพื่อให้เส้นเลือดสามารถเข้าไปหล่อเลี้ยงเซลล์ที่เข้าไปภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้ดี จากงานวิจัยของ Chang และคณะ เสนอว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนเชื่อมโยงกันสามารถช่วยให้เกิดการสร้างกระดูกได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนแบบไม่เชื่อมโยงกัน [Chang, B.S. และคณะ, 2000]

## 2.6.2 วัสดุสำหรับสร้างโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์สร้างด้วยวัสดุหลัก 3 ชนิดคือ

1. พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน ไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) แป้ง ไคตินและไคโตซาน เป็นต้น พอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้มากกว่าวัสดุชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีสมบัติสามารถเข้ากันได้กับเซลล์ (biocompatibility) ที่ดี

2. พอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น polylactic acid (PLA) polyglycolic acid (PGA) และโพลิเมอร์ PLGA โดยวัสดุจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นเวลากว่า 20 ปี อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์สังเคราะห์ประเภท poly( $\alpha$ -hydroxy acids) จะปลดปล่อยสารที่มีสมบัติเป็นกรดเมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ค่า pH ต่ำลงกว่า pH ในสภาวะร่างกายปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายของพอลิเมอร์นั้นเร็วขึ้น [Buckley, C. และ O'Kelly, K., 2004]

3. เซรามิกส์ เช่น hydroxyapatite (HA) และ  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) เซรามิกส์นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเช่นเดียวกับวัสดุชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีสมบัติที่สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ (biocompatibility) และมีสมบัติที่คล้ายคลึงกับสารประกอบอนินทรีย์ธรรมชาติของกระดูกและฟัน [Chu, T.M.G., 2002] ข้อเสียของเซรามิกส์คือ เปราะ มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเซรามิกส์สามารถทนแรงกดได้ดีกว่าแรงดึง

งานวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์ด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เรซินรูปดังตารางที่ 2.7 โดยในปี ค.ศ. 2002 T. Tanabe และคณะได้ทดสอบการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast ด้วยการเคลือบสารละลายผสมของเรซินและไคโตซานในอัตราส่วน 1:1 บนจานเลี้ยงเซลล์ เปรียบเทียบกับการเคลือบด้วยเรซินและไคโตซานเพียงอย่างเดียว พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากใส่เซลล์ พบว่าเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยเรซินเพียงอย่างเดียวและเคลือบด้วยเรซินผสมไคโตซาน (1:1) พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นกระสวย ในขณะที่บนจานเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยไคโตซานเพียงอย่างเดียวเซลล์มีรูปร่างกลมเซลล์มีรูปร่างกลม ที่เวลา 96 ชั่วโมง เซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยเรซินและไคโตซานมีการเจริญเติบโตอย่างหนาแน่น แสดงให้เห็นว่ามีเรซินผสมไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ดี [Tanabe, T. และคณะ, 2002]

และในปีเดียวกัน Tachibana A. และคณะ สร้างโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนจากสารละลายเคราตินที่สกัดจากขนแกะ โดยใช้เทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 100 ไมโครเมตร เมื่อนำไปทดสอบการเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (1929 mouse fibroblast cells) พบว่า ภายในหนึ่งชั่วโมง เซลล์สามารถยึดเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อหนึ่งวันผ่านไป พบเซลล์แผ่ขยายไปพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้เมื่อทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 23-43 วัน จำนวนเซลล์ยังคงที่ ประมาณ 4.2-7.4 ล้านเซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร โดยจำนวนเซลล์สูงสุดประมาณ 7.4 ล้านเซลล์ ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วยจานปกติ พิจารณาเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 23-43 พบว่ารูปร่างของเซลล์ยังคงปกติ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนจากเคราติน สามารถใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในช่วงระยะเวลาที่ยาวได้ [Tachibana, A. และคณะ, 2002]

ในปี ค.ศ. 2004 K. Katoh และคณะ ได้ทดสอบเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 ของหนู ด้วยแผ่นฟิล์มที่ทำจากเคราตินที่เติมสาร crosslink ประเภทไดอีพ็อกซี (EGDE) โดย Katoh เปรียบเทียบผลการเลี้ยงเซลล์ของแผ่นฟิล์มเคราตินที่เติม EGDE กับแผ่นฟิล์มเคราตินและแผ่นฟิล์มเคราตินผสมไคโตซาน พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการใส่เซลล์ เซลล์ที่ผิวของแผ่นฟิล์มเคราติน EGDE มีรูปร่างกลม ในขณะที่แผ่นฟิล์มที่ทำจากเคราติน เคราตินผสมไคโตซานและไคโตซาน จะพบเซลล์ที่ยึด ขยายตัว แสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่ทำจากเคราตินที่เติมสาร crosslink นั้นเซลล์เกาะตัวไม่ดีเท่าฟิล์มชนิดอื่น และเมื่อ 48 ชั่วโมงผ่านไป เซลล์ที่เลี้ยงบนแผ่นฟิล์มที่เติมสาร crosslink นั้นเซลล์ยังคงมีรูปร่างกลมเช่นเดิม ที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโต แต่น้อยเมื่อเทียบกับแผ่นฟิล์มชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่าแผ่นฟิล์มนี้มีคุณสมบัติในการให้เซลล์ยึดเกาะได้ไม่ดึ้นก แต่เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ และในปีเดียวกัน Katoh K. และคณะ นำแผ่นฟิล์ม S-Sulfo keratin ทดสอบการเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 พบว่า เมื่อเทียบกับจานเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เคลือบสารใดๆ นั้น การยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์ม S-Sulfo keratin นั้นน้อยกว่าในสองชั่วโมงแรก เมื่อเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นแบบเข็มและมีการงอกเจริญเติบโตได้อย่างดีคล้ายกับจานเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เคลือบสารใดๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง เซลล์แผ่ขยายเต็มจาน แสดงให้เห็นว่าฟิล์ม S-Sulfo keratin นั้นสามารถทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีได้ [Katoh, K.และคณะ, 2004]

สรุปผลการนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเคราตินเป็นส่วนประกอบไปทดสอบการเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 ของหนู ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงผลการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast

ส่วนประกอบของ โครงเลี้ยงเซลล์	ลักษณะ ชิ้นงาน	วิธีการสกัดเคราติน	วิธีการขึ้นรูป	ทดสอบการเลี้ยงเซลล์ (L929 mouse fibroblast cell)	แหล่งอ้างอิง
เคราติน+ไลโคซาน	ฟิล์ม	ขนแกะ(Corridale) 9 g, 0.26 M SDS, 8M urea, 1.66 M 2-ME 50 <sup>0</sup> C, 16 h	ผสมเคราตินและไลโคซาน (1:1) ใน กรดอะซิติก 75% และเทลงบนจานเลี้ยง เซลล์และอบที่ 50 <sup>0</sup> C 24 ชั่วโมง	สังเกตการยึดเกาะและการเจริญเติบโตด้วย กล้องจุลทรรศน์ พบว่าที่ 48 ชม. เซลล์มี รูปร่างแบบกระสวย ที่ 96 ชั่วโมง เซลล์ เจริญเติบโตเต็มแผ่นฟิล์มและมีรูปร่าง แบบกระสวย (เซลล์เริ่มต้น 50,000 เซลล์/ โครงเลี้ยงเซลล์)	Tanabe, T. และคณะ (2002)
เคราติน	ฟองน้ำ	ขนแกะ (Corridale), 8M urea, 1.66M 2- ME, 0.26M SDS 60 <sup>0</sup> C, 6 h	นำสารละลายเคราตินแช่แข็งที่ -20 <sup>0</sup> C 3 วันและทำการระเหยแห้ง นำโครงเลี้ยง เซลล์ทำปฏิกิริยากับกรดไอโอโดอะซิติก ใน tris-HCl buffer (pH 8.5) และล้าง ด้วย PBS ที่ 60 <sup>0</sup> C 1h และล้างด้วย 70% EtOH 1h และล้างด้วย medium MEM-E ที่มี 10% FBS	เซลล์ยึดเกาะอย่างรวดเร็ว (ที่เวลา 1 ชม.) เมื่อเวลาผ่านไป 23-43 วัน จำนวนเซลล์ ประมาณ 4.2-7.4 ล้านเซลล์ (เซลล์เริ่มต้น 5000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)	Tachibana, A. และคณะ (2002)

หมายเหตุ: SDS คือ sodium dodecyl sulfate และ 2-ME คือ 2-mercaptoethanol

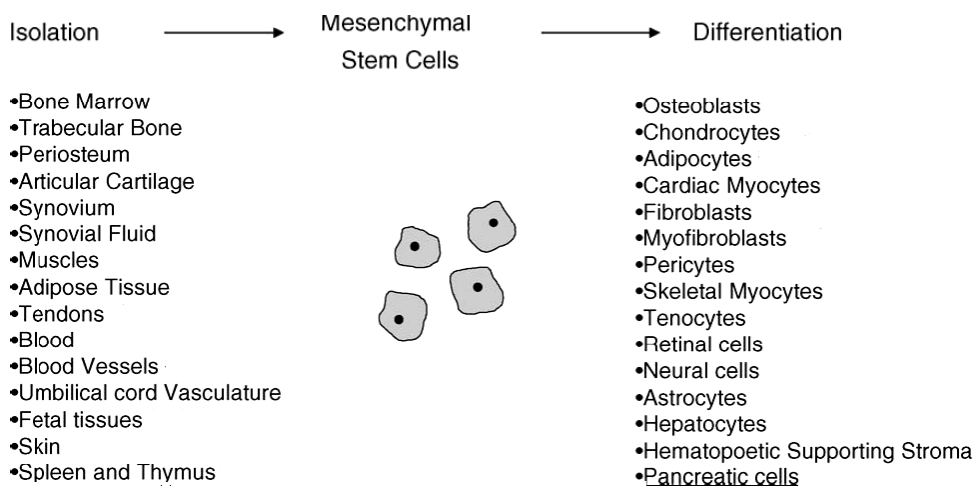


ส่วนประกอบของ โครงเลี้ยงเซลล์	ลักษณะ ชิ้นงาน	วิธีการสกัดเคราติน	วิธีการขึ้นรูป	ทดสอบการเลี้ยงเซลล์ (L929 mouse fibroblast cell)	แหล่งอ้างอิง
เคราติน+ GDE	ฟิล์ม	ขนแกะ(Corridale) 9 g, 0.26 M SDS, 8M urea, 1.66 M 2-ME 50 <sup>0</sup> C, 16 h	เติม GDE ลงในสารละลายเครา ตินผสมให้เข้ากัน และเทลงบน พิมพ์โพลีโพรพิลีน อบที่ 50 <sup>0</sup> C 24 ชม.	สังเกตการยึดเกาะและการเจริญเติบโตด้วยกล้อง จุลทรรศน์ ที่เวลา 24 ชม. เซลล์สามารถยึดเกาะ ได้และมีรูปร่างกลม ที่ 48 ชม. เซลล์ยังคงมี รูปร่างกลมและที่เวลา 96 ชั่วโมงเซลล์มีรูปร่าง แบบกระสวยและเจริญเติบโตเต็มแผ่นฟิล์ม (เซลล์เริ่มต้น 50,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์)	Katoh, K. และคณะ (2004)
S-sulfo keratin	ฟิล์ม	ขนแกะ (Merino)150 g, SDS 75 g, urea 8 M, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 150 g ที่ 100 <sup>0</sup> C, 30 min	ละลายผงเคราตินในสารละลาย ผสมของน้ำและเอทานอล 1:1 (wt/wt) เทลงแม่พิมพ์สแตนเลส และอัดความดัน 5 MPa 5 นาที จากนั้นอัดความดัน 10MPa 5 นาที และอบที่อุณหภูมิ 120 <sup>0</sup> C	สังเกตการยึดเกาะและการเจริญเติบโตด้วยกล้อง จุลทรรศน์พบว่าที่เวลา 2 ชม. เซลล์สามารถยึด เกาะและมีรูปร่างกลม ที่เวลา 24 และ 48 ชม. เซลล์เริ่มมีรูปร่างแบบกระสวย และที่ 96 ชม. เซลล์เจริญเติบโตหนาแน่น ประมาณ 400,000 เซลล์ (เซลล์เริ่มต้น 60,000 เซลล์/โครงเลี้ยง เซลล์)	Katoh, K. และคณะ (2004)

หมายเหตุ: SDS คือ sodium dodecyl sulfate, GDE คือ Glyceral diglycidyl ether และ 2-ME คือ 2-mercaptoethanol

## 2.7 Mesenchymal stem cells (MSCs)

Mesenchymal stem cells เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ เช่น กระดูก, กระดูกอ่อน, เนื้อเยื่อไขมัน, เส้นเอ็นและกล้ามเนื้อ แสดงดังรูปที่ 2.14 MSC สามารถแยกออกมาจากไขกระดูก (ภาคผนวก จ), เนื้อเยื่อไขมันและเลือดสายสะดือ (cord blood) เป็นต้น ในปี 1995 Lennon และคณะ แยก MSC จากไขกระดูกจาก Fisher F-344 rat อายุ 2-4 เดือน [Lennon และคณะ, 1995] เซลล์ MSC เมื่อนำมาเลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์ เซลล์ยึดเกาะบนงานเลี้ยงเซลล์และเริ่มเจริญเติบโตรวมกันเป็นกลุ่มหรือเรียกว่า fibroblastic-like cell cluster (fibroblast colony forming units: CFU-F) [Krampera, M. และคณะ, 2006] การควบคุมให้ MSC เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ สามารถทำได้โดยการใส่ growth factor และ cytokines เป็นต้น นอกจากนี้การกำหนดให้เซลล์ MSC เปลี่ยนรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดใดนั้น ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ โดยหลังจากการแยก MSC จากไขกระดูกและต้องการเลี้ยงเซลล์ MSC ให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กระดูกควรอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ dexamethasone, ascorbic acid และ  $\beta$ -glycerolphosphate (osteogenic supplements) [Donzella, E. และคณะ, 2007] การเกิดกระดูกต้องการโครงเลี้ยงเซลล์ลักษณะสามมิติเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้



รูปที่ 2.14 แสดงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ MSCs

(ที่มา: Pountos A. และคณะ, 2005)

ในปี ค.ศ. 2005 Tabata Y. และคณะ สร้างโครงสร้างเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินและเติมเบตา-ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ( $\beta$ -tricalcium phosphate:  $\beta$ TCP) ในปริมาณต่าง ๆ และนำไปทดสอบเลี้ยงเซลล์ mesenchymal stem cells (MSCs) ที่แยกจาก bone marrow ของหนู (Fisher 344 rat เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์) เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูก เมื่อนำโครงสร้างเจลาตินผสม  $\beta$ TCP ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งมีขนาดรูพรุน 180-200 ไมโครเมตร ความพรุน 96% ทดสอบเลี้ยงเซลล์ MSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 15% FCS พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากการใส่เซลล์ พบว่าเซลล์สามารถเกาะโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่มี  $\beta$ TCP อัตราส่วนต่าง ๆ ได้ดีเท่ากัน แต่รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงตามปริมาณของ  $\beta$ TCP เมื่อปริมาณ  $\beta$ TCP มากเซลล์มีรูปร่างแบน และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาการเกิดสร้างเนื้อเยื่อกระดูกพบว่าโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย  $\beta$ TCP 50 wt% เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อกระดูกมากที่สุด [Tabata Y. และคณะ, 2005] และในปี ค.ศ. 2007 Donzelli, E. และคณะ ใช้โครงสร้างเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน type I จากบริษัท Gingistat เพื่อเลี้ยงเซลล์ MSC ที่แยกออกจากไขกระดูกของ Sprague-Dawley rat เพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ โดยใส่เซลล์ 1,000,000 เซลล์/โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ เปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (CTRL) และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ osteogenic supplement (OS medium) ได้แก่ dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate และ 2-phosphate-ascorbic acid ผลการวิจัยพบว่า การเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium ในวันที่ 7 หลังจากการเพาะเซลล์ เซลล์มีการเจริญเติบโตทั่วทั้งโครงสร้างเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนและเซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่ม (colony) ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดา (CTRL) เซลล์เกิดการรวมกันเป็นกลุ่มในวันที่ 21 หลังจากการเพาะเซลล์ และขนาดของกลุ่มเซลล์มีขนาดเล็กกว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium และผลการวิเคราะห์ ALP activity assay พบว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium มีค่า ALP สูงกว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดา (CTRL) เมื่อทดสอบย้อมสีด้วย alizarin red พบว่ามีการสะสมของแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นในการเลี้ยงเซลล์ด้วย OS medium แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเซลล์ใน OS medium ช่วยกระตุ้นให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ [Donzella, E. และคณะ, 2007]

นอกจากการเติมสารต่างๆ เช่น growth factor หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ของ MSC เป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เพื่อควบคุมการเปลี่ยนรูปร่างของ MSC สามารถทำควบคุมการเปลี่ยนรูปร่างได้โดยการตัดแปลงหรือปรับปรุงโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ให้มีสมบัติเหมาะสมกับ MSC เช่น สมบัติทางเคมีของพื้นผิวโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถควบคุมพฤติกรรมของเซลล์ การยึดเกาะ, รูปร่างและการเปลี่ยนแปลงหน้าที่เป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ โดยพื้นผิวของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ควรประกอบด้วยหมู่ methyl ( $-\text{CH}_3$ ), hydroxyl ( $-\text{OH}$ ), carboxyl ( $-\text{COOH}$ ), amino ( $-\text{NH}_2$ ) และ silane ( $-\text{SH}$ ) ซึ่งหมู่เหล่านี้พบใน biological system โดยในปี ค.ศ. 2006 Curran,

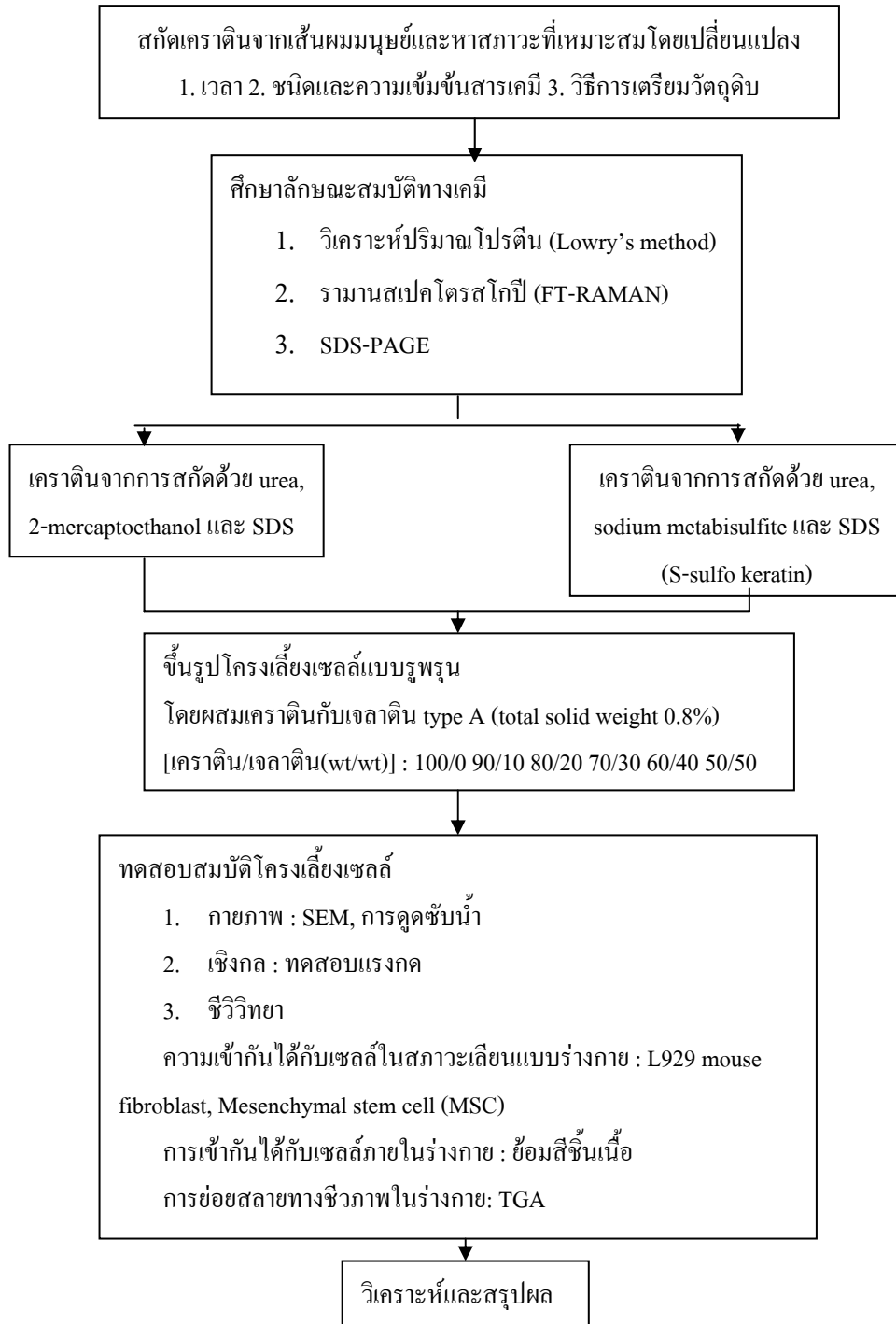
J.M. และคณะ ศึกษาการปรับปรุงพื้นผิว (silane-modified surface) เพื่อควบคุมการยึดเกาะของ MSC และการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่นในสภาวะเลียนแบบร่างกาย (*in vitro*) โดยทดสอบเลี้ยงเซลล์ human MSC ด้วยงานแก้วเพาะเชื้อที่ดัดแปลงหมู่ที่พื้นผิวได้แก่หมู่ methyl (-CH<sub>3</sub>), hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>) และ silane (-SH) พบว่าหมู่ -NH<sub>2</sub> และ -SH ช่วยสามารถกระตุ้นให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (osteoblasts) นอกจากนี้หมู่ -OH และ -COOH ช่วยให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็น chondrocytes [Curran, J.M. และคณะ, 2006]

จาก United States Patent 6,214,369 ปี ค.ศ. 2001 Grande และคณะ ใช้โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติเลี้ยงเซลล์ MSC เพื่อซ่อมแซมกระดูกอ่อน (cartilage) หรือกระดูก (bone) โดยการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี MSC ลงในกระดูกหรือกระดูกอ่อนที่เสียหาย พบว่า MSC สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกอ่อนและกระดูกได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมควรมีลักษณะเป็นตาข่าย (mesh), ฟองน้ำ (sponge) งานวิจัยนี้ใช้โครงเลี้ยงเซลล์จาก polyglycolic acid ลักษณะเป็นตาข่าย โดยแยก MSC จากกล้ามเนื้อของกระต่าย จากนั้นเลี้ยง MSC ในโครงเลี้ยงเซลล์ polyglycolic acid และฝังโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี MSC ที่กระดูกบริเวณหัวเข่าใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี MSC เป็นกลุ่มควบคุม ที่เวลา 6 สัปดาห์หลังการปลูกถ่ายกลุ่มควบคุมเกิด fibrocartilage ในขณะที่กลุ่มทดลองมีเซลล์ซึ่งยังไม่มีเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ที่เวลา 12 สัปดาห์กลุ่มควบคุมไม่มีการเกิด fibrocartilage เพิ่มขึ้น มีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เพิ่มขึ้นแต่ไม่พบการสร้างกระดูก ในขณะที่กลุ่มทดลองเกิดขึ้นของกระดูกอ่อนความหนาเท่ากับข้อต่อกระดูกอ่อนพบการสร้างกระดูกขึ้นใหม่ แสดงให้เห็นว่าการปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ MSC สามารถช่วยซ่อมแซมกระดูกและกระดูกอ่อนที่เสียหายได้ [Grande และคณะ, 2001]

บทที่ 3  
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

สรุปแผนการดำเนินงานวิจัย ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงแผนการดำเนินงานวิจัย

### 3.2 วัสดุและอุปกรณ์

1. เส้นผม
2. Urea (A817, Univar, Australia)
3. Thiourea (A1235, Unilab, Australia)
4. 2-mercaptoethanol (A027163001, New Jersey, USA)
5. Sodium dodecyl sulfate (A1241, Ajax Finechem, Australia)
6. Sodium sulphide X-hydrate QP (211682.1610, Panreac Quimica SA, Barcelona)
7. Sodium metabisulfite (A487, Univar, Ajax Finechem, Australia)
8. Sodium potassium tetrates (A416, Ajax Finechem, Australia)
9. Folin ciocalteous (64271, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
10. Sodium hydroxide (บริษัทไทยสงวนวัตถุดิบเคมีภัณฑ์ จำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)
11. Gelatin type A (300 g bloom, pH 4.5, pI 9, Niita gelatin, Japan)
12. Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Merck, Darmstadt, Germany)
13. Sodium hydrogen carbonate (Fluka, Buchs, Germany)
14. Sodium phosphate dibasic heptahydrate (Sigma Co., St. Louis, USA)
15. Ethanol (VWR International Ltd., Poole Dorset, United Kingdom)
16. Mouse skin fibroblasts (L929 or murine fibroblasts)
17. Dulbecco's modified eagle medium, DMEM (10%medium + L-glutamine + AB, Hyclone, Utah, USA)
18. Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with EDTA·Na, Gibco BRL, Canada)
19. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (USB corporation, Cleveland, OH, USA)
20. Dimethylsulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, Germany)
21. Diethylether (K36335621 631, AnalaR, VWR International Ltd., England)
22. Absolute ethanol (Normapur, Fontenay Sous Bols)
23. Seamless Cellulose tubing (UC 30-32-100, size 30/32, Lot 621592, Viskase Companies Inc., Japan)
24. -40°C freezer (Heto, PowerDry LL3000, USA)
25. Lyophilizer (Heto, PowerDry LL3000, USA)
26. Vacuum drying oven and pump (VD23, Binder, Germany)

27. UV-Vis spectrophotometer (UV-2540, Shimadzu, Japan)
28. Fine coat (JFC-1100E, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
29. Scanning Electron Microscopy (JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
30. Universal Testing Machine (No. 5567, Instron, USA)
31. Laminar Flow (HWS Series 254473, Australia)
32. CO<sub>2</sub> incubator (Series II 3110 Water Jacketed Incubator, Thermo Forma, USA)
33. Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)
34. Polystyrene tissue culture discs (NUNC, Denmark)
35. 24-well polystyrene tissue culture plates (NUNC, Denmark)
36. Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
37. FT-Raman (Perkin Elmer Spectrum GX NIR FT-Raman)
38. เครื่อง Thermalgravimetric Analysis (SDT Q600)
39. Vibration mill (Hitachi)
40. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope ,SEM) ของบริษัท Joel รุ่น JSM 5400, Japan
41. เครื่อง centrifuge, KUBOTA

### 3.3 ระเบียบวิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การสกัดเคราติน

วิธีการสกัดเคราตินจากเส้นผม คัดแปลงวิธีการสกัดเคราตินของ T. Tanabe [Tanabe T. 2004] ก่อนทำการสกัดเคราตินจากเส้นผม นั้น มีขั้นตอนในการทำความสะอาดเส้นผมเพื่อล้างสิ่งสกปรกต่าง ๆ และไขมันออกตามวิธีของ Folin [Folin, M. และคณะ, 1996] จากนั้นทำการสกัดเคราตินโดยมีขั้นตอนสรุปดังนี้

##### 3.3.1.1 ทำความสะอาดผม

เตรียมผมเป็นวัสดุ ตัดให้ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ทำความสะอาดโดยแช่ในไดเอทิลอีเทอร์เพื่อล้างไขมัน และล้างด้วย Triton X-100 เพื่อขจัดสิ่งสกปรก จากนั้นล้างด้วยเอทานอลและน้ำกลั่น ตากให้แห้งและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ รายละเอียดดังต่อไปนี้

##### การทำความสะอาดผม

1. ตัดผมให้ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร
2. นำผมแช่ในไดเอทิลอีเทอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดไขมันจากเส้นผม

3. เทไดเอทิลอีเทอร์ทิ้งและระเหยไดเอทิลอีเทอร์ที่ตกค้างที่อุณหภูมิห้อง
4. ล้างผงด้วยสารละลาย Triton-X 100 ความเข้มข้น 1%v/v โดยการปั่นกวนเป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกต่าง ๆ
5. ล้าง Triton-X 100 ออก ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
6. ล้างผงด้วย absolute ethanol เป็นเวลา 20 นาที
7. ล้างผงด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
8. ตากผงให้แห้งและตัดเป็นชิ้นเล็ก

#### วิธีการสกัดเคราติน

1. นำเส้นผมแช่ในสารละลายผสมของสารเคมีชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 1 ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. นำสารละลายเคราตินที่สกัดได้ หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 20 นาที
3. นำส่วนสารละลายใส่ทำไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่น 5 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง ทุกวัน
4. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธีลอร์รี่ (Lowry's method)

#### 3.3.1.2 สกัดเคราติน ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงปัจจัยดังต่อไปนี้

ก) เวลา โดยศึกษาผลของการเพิ่มระยะเวลาในการสกัดต่อปริมาณเคราตินที่สกัด ศึกษาที่เวลา 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ข) ชนิดสารเคมีและความเข้มข้นของสารเคมีหลักที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ urea, 2-mercaptoethanol, sodium sulfide, sodium metabisulfite และ SDS โดยศึกษาอิทธิพลของสารเคมีชนิดต่างๆ ต่อปริมาณเคราตินที่สกัดได้ และศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเคมีหลักที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณเคราตินที่สกัดได้ (ตารางที่ 3.1)

ค) การเตรียมวัสดุ แบ่งเป็น 3 วิธี คือ การตัดแบบละเอียดด้วยกรรไกร, การตัดแบบหยาบด้วยกรรไกร และการบดเส้นผมด้วยเครื่อง Ball mill เป็นเวลา 6 ชั่วโมง



ตารางที่ 3.1 สรุปชนิดสารเคมีและความเข้มข้นของสารเคมีหลักที่ใช้ในการสกัด

วิธี	ความเข้มข้น (โมลต่อลิตร)					
	urea	2-ME	Thiourea	Sodium sulfide (Na <sub>2</sub> S)	Sodium metabisulfite (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	SDS
1	8	1.66	-	-	-	0.26
2	5	1.66	3	-	-	0.26
3	5	1.66	-	3	-	0.26
4	5	1.66	-	-	3	0.26
5	5	-	-	-	3	0.26
6	5	-	-	3	-	0.26
7	5	-	3	-	-	0.26
8	5	-	3	0.5	-	0.26
9	5	-	3	-	0.5	0.26
10	5	1.66	3	-	0.5	0.26
11	5	1.66	3	0.5	-	0.26

หมายเหตุ: สกัดเคราตินที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.3.2 ทดสอบสมบัติของเคราตินที่สกัดได้

#### ทดสอบสมบัติทางเคมี

การทดสอบสมบัติทางเคมีของเคราติน ได้แก่ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลอร์รี่ (Lowry's method) และการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเคราติน โดยใช้เทคนิครามานสเปกโตรสโกปี (FT-Raman spectroscopy) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### ก) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิธีลอร์รี่เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกนิยมใช้กันทั่วไป สามารถวิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง วิธีลอร์รี่เป็นการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน โดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ค่าความยาวคลื่นหนึ่ง ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีน สารละลายมีสีเข้ม ค่าการดูดกลืนแสงมาก ความเข้มข้นของโปรตีนมีค่ามาก โดยสีของสารละลายเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง Cu<sup>2+</sup> ในสารละลายเบสกับพันธะเพปไทด์เกิดสารละลายสีน้ำเงินแกมม่วง เมื่อเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเกลือ จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนไทโรซีนและทริป

โตนเฟน เกิดสารละลายสีน้ำเงินเข้มแกมเขียวขึ้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจะทราบความเข้มข้นของโปรตีน [Lowry, O.H. และคณะ, 1951] รายละเอียดในหัวข้อ 2.3.1

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง ต้องสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนอ้างอิงที่เราทราบความเข้มข้นแน่นอน เพื่อที่หาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง โดยเตรียมสารละลายของโปรตีนอ้างอิงความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ BSA หรือ Bovine Serum Albumin เป็นโปรตีนอ้างอิง สารละลายตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนซ้ำ 4 ตัวอย่าง เพื่อลดความผิดพลาด (ดูภาคผนวก ก)

#### ข) การวิเคราะห์โครงสร้างเคราตินด้วยเทคนิครามานสเปกโตรสโกปี

วิเคราะห์โครงสร้างเคราตินโดยใช้เครื่อง FT-Raman (Perkin Elmer, Spectrum GX NIR FT-Raman) สภาวะที่ใช้คือ พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 1064 นาโนเมตร, จำนวนการกราดตรวจ 400 scan และการแยกชัด  $4 \text{ cm}^{-1}$  ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้แก่ เส้นผมมนุษย์ซึ่งตัดให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร, ผงเคราตินจากขนแกะ (Wako pure chemical, Japan) และเคราตินที่สกัดได้จากวิธีที่ 1-11 ขึ้นรูปเป็นฟองน้ำ (sponge) โดยนำสารละลายเคราตินที่สกัดได้แต่ละวิธีไปใส่ 24-well plate ปริมาตรแต่ละหลุมเท่ากับ 0.75 มิลลิลิตร จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-50^{\circ}$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำแห้งเยือกแข็ง (lyophilized) ที่อุณหภูมิ  $-50^{\circ}$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เคราตินแบบฟองน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 14 มิลลิเมตร ความหนาประมาณ 3.5 มิลลิเมตร

การวิเคราะห์โครงสร้างเคราตินซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) เป็นลักษณะสมบัติที่สำคัญของเคราติน เกิดฟลักที่แสดงการสั่นของพันธะ S-S ที่เลขคลื่น  $500-550 \text{ cm}^{-1}$  และการสั่นของพันธะ C-S ที่เลขคลื่นประมาณ  $700-750 \text{ cm}^{-1}$  รายละเอียดและตัวอย่างการวิเคราะห์อธิบายไว้ในหัวข้อ 2.3.2

#### ค) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเคราตินด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเคราตินด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยเตรียม polyacrylamide gel 15% ซึ่งสามารถแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 14,000-100,000 kDa โดยใช้ Phosphorylase B (97,000 Da), bovine serum albumin (66,000 Da), ovalbumin (45,000 Da), carbonic anhydrase (31,000 Da), soybean trypsin inhibitor (21,000) และ lysozyme (14,400 Da) เป็นตัวบ่งชี้น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight marker) การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แสดงดังภาคผนวก ข

### 3.3.3 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุน

เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนโดยดัดแปลงวิธีของ Tachibana [Tachibana A. และคณะ 2002] ใช้เทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying)

#### 3.3.3.1 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและ S-sulfo เคราติน

1. นำสารละลายเคราตินที่สกัดด้วยวิธีที่ 1 ปิเปตใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ทำจาก polystyrene แบบ 24 หลุม (24-well plate) หลุมละ 0.75 มิลลิลิตร
  2. แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งเยือกแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
  3. นำโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ได้ทำการเชื่อมโยงพันธะ ด้วยวิธี dehydrothermal treatment ที่อุณหภูมิ  $140^{\circ}\text{C}$  ภายใต้ความดันสุญญากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- สำหรับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ S-sulfo เคราติน มีขั้นตอนเช่นเดียวกัน แต่สารละลายเคราตินที่นำมาใช้มาจากการสกัดด้วยวิธีที่ 5

#### 3.3.3.2 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและ S-sulfo เคราตินผสมเจลาติน type A

1. นำสารละลายเคราตินที่สกัดด้วยวิธีที่ 1 ผสมกับเจลาติน Type A โดยละลายเจลาตินในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วนต่างๆ กัน แสดงดังตารางที่ 3.2
  2. นำสารละลายผสมของเคราตินและเจลาตินอัตราส่วนต่าง ๆ ปิเปตใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ทำจาก polystyrene แบบ 24 หลุม (24-well plate) หลุมละ 0.75 ml และนำไปแช่แข็งที่  $-50^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-50^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
  3. นำโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ได้ทำการเชื่อมโยงพันธะ ด้วยวิธี dehydrothermal treatment ที่อุณหภูมิ  $140^{\circ}\text{C}$  ภายใต้ความดันสุญญากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- สำหรับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ S-sulfo เคราตินผสมเจลาตินมีขั้นตอนเช่นเดียวกัน แต่สารละลายเคราตินที่นำมาใช้มาจากการสกัดด้วยวิธีที่ 5 รหัสของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อผสมเจลาตินที่อัตราส่วนต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 แสดงรหัสโครงเลี้ยงเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่าง ๆ

รหัสโครงเลี้ยงเซลล์	เคราติน (%wt)	เจลาติน Type A (%wt)
K100	100	0
KG91	90	10
KG82	80	20
KG73	70	30
KG64	60	40
KG55	50	50
G100	0	100

ตารางที่ 3.3 แสดงรหัสโครงเลี้ยงเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์ S-sulfo เคราตินผสมเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่าง ๆ

รหัสโครงเลี้ยงเซลล์	S-sulfo เคราติน (%wt)	เจลาติน Type A (%wt)
s-K100	100	0
s-KG91	90	10
s-KG82	80	20
s-KG73	70	30
s-KG64	60	40
s-KG55	50	50

### 3.3.4 การทดสอบสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

#### 3.3.4.1 สมบัติทางกายภาพ

ก) พิจารณาลักษณะพื้นผิว ขนาด และรูปร่างของรูพรุนด้วย SEM (Scanning electron microscope)

ข) การดูดซับน้ำ (Swelling) โดยชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำ} = \frac{W_w - W_d}{W_w} \times 100$$

$W_w$  และ  $W_d$  คือ น้ำหนักเปียกและแห้งของตัวอย่าง ตามลำดับ  
ทำการวัดซ้ำ 5 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

#### 3.3.4.2 สมบัติเชิงกล

Compression test โดยใช้เครื่อง Universal testing machine ที่ constant tensile deformation rate (0.5 มิลลิเมตร/นาที) ในสภาพที่แห้งที่ 25 องศาเซลเซียส พิจารณา ค่า compressive modulus โดยคำนวณจาก

$$\text{Compressive modulus (kPa)} = \frac{\text{Stress (kPa)}}{\text{Strain (\%)}}$$

โดยเลือกพิจารณาค่า strain (%) ที่ช่วง 5%-30% เพื่อให้อยู่ในช่วงการวัดค่าคงที่ โดยทำการวัดซ้ำ 5 ครั้ง วิเคราะห์ความทนทานต่อแรงกดทั้งสภาวะแห้งและสภาวะเปียก ในสภาวะเปียกสามารถทำได้โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษไม่มีขุยและนำไปทดสอบความทนทานต่อแรงกด

#### 3.3.4.3 สมบัติทางชีววิทยา

ก) ความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์ในสภาวะเลียนแบบร่างกาย (*In vitro* biocompatibility)

นำโครงเลี้ยงเซลล์ทดสอบการเลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ เซลล์ L929 mouse fibroblast และเซลล์ mesenchymal stem cell (MSC) ซึ่งแยกออกจากไขกระดูกของ Wistar rat เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ (ภาคผนวก ค) โดยพิจารณาความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์และการเจริญเติบโต นำโครงเลี้ยงเซลล์มาเชื้อด้วย 70% เอทานอล 5 นาทีและล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที จากนั้นเพาะเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์และเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นพิจารณาการยึดเกาะ, การเจริญเติบโตของเซลล์และประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยพิจารณาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย

เทคนิค MTT method ใช้ spectrophotometer วัดสีที่เกิดขึ้นจาก MTT หรือ (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เปลี่ยนเป็นสีม่วงของ formazan ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดขึ้นเมื่อเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย ทำงาน แสดงถึงการมีชีวิตของเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสง โดยค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตาม จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต [Freimoser, F. และคณะ, 1999] (ภาคผนวก ง)

ข) การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกาย (*In vivo* biodegradability)

วิเคราะห์ค่าอุณหภูมิการย่อยสลาย ( $T_d$ ) ของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากการฝังในสัตว์ทดลองที่ ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง โดยใช้เครื่อง Thermalgravimetric analysis (TGA) วิเคราะห์ในช่วงอุณหภูมิ 35-600 องศาเซลเซียส ที่อัตราการให้ความร้อน 20 องศาเซลเซียสต่อนาที ตัวอย่างการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข

ค) ความสามารถในการเข้ากันได้ของเซลล์ภายในร่างกาย (*In vivo* biocompatibility)

- นำโครงเลี้ยงเซลล์ปลูกถ่ายที่บริเวณด้านหลังของหนูสายพันธุ์ Wistar rat เพศเมีย อายุ 5 สัปดาห์

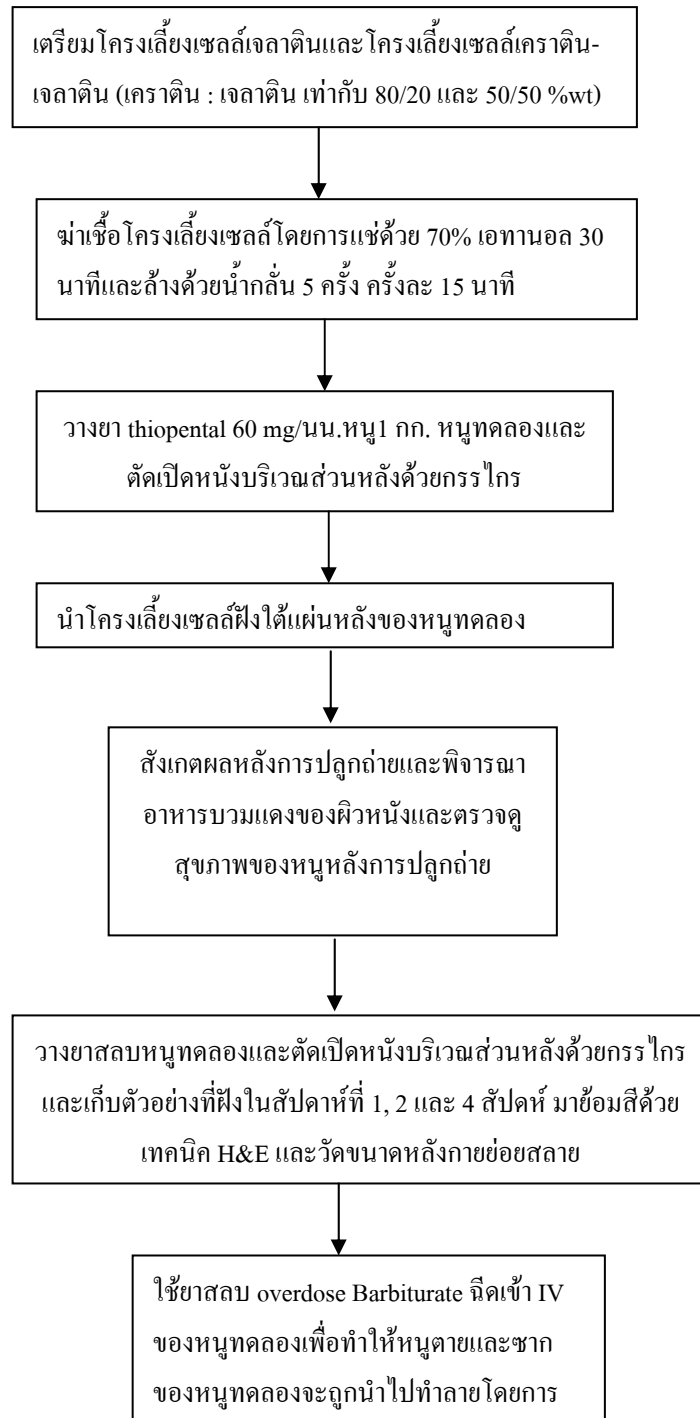
- ผ่าตัดเอาโครงเลี้ยงเซลล์มาทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อ (Histological) ที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ด้วยการย้อมสีแบบ H&E (ภาคผนวก จ)

### การใช้สัตว์ทดลอง

1. การทดลองแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ โดยทำการศึกษาในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 4 แต่ละช่วงเวลาใช้หนูในการปลูกถ่ายจำนวน 2 ตัว ( $n = 2$ ) และปลูกถ่ายโครงเลี้ยงเคลราตินที่ได้รับการปรับปรุงด้วยเจลาตินและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 มิลลิเมตร ความหนา 3.5 มิลลิเมตร

2. หนู Rat สายพันธุ์ Wistar (outbred) เพศเมีย น้ำหนักประมาณ 30-40 กรัม อายุ 3-5 สัปดาห์ สั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ซึ่งพิจารณาการใช้สัตว์ทดลองโดยเน้นในเรื่อง ความต่อต้านทางภูมิคุ้มกัน (Immunological response) และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้ามาที่ผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์ (Cell infiltration) และความสามารถในการย่อยสลาย (Biodegradability) ของโครงเลี้ยงเซลล์ วิธีการทดลอง สรุปได้ดังแผนผังในรูปที่ 3.2

### แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

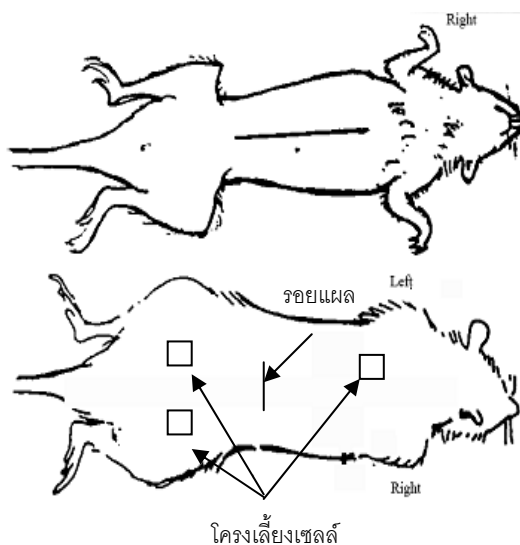


รูปที่ 3.2 แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองมีรายละเอียดดังนี้

1. ทำการวางยาสลบหนูทดลองโดยวิธีฉีด Barbiturate (Pentobarbital) เข้าที่ช่องท้อง ด้วยปริมาณ 60 มิลลิกรัม/น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม เนื่องจาก Barbiturate มีฤทธิ์กดการหายใจ ดังนั้นการเดินเข้าช่องท้องอย่างรวดเร็วจะทำให้สัตว์หยุดหายใจ ฉะนั้นควรเดินยาอย่างช้าๆ และตรวจดูการตอบสนองของสัตว์โดยดูจากการกระพริบตาเมื่อใช้นิ้วเคาะที่หัวถ้าสัตว์กระพริบตาแสดงว่ายังไม่สลบ แต่ถ้าหยุดกระพริบตาแสดงว่าสลบให้หยุดเดินยา

2. หลังจากที่หนูสลบแล้ว โคนขนบริเวณส่วนหลังที่มีลักษณะโค้งเป็นสัน (dorsa) ของหนู ด้วยปัตตาเลี่ยน ทำการผ่าเนื้อด้วยเบตาดีน และตัดเปิดหนังบริเวณนั้นด้วยกรรไกรให้มีความยาวของแผลประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้เข็มทิ่มทำโพรง (pocket) ได้ผิวหนังบริเวณหลังของหนู นำโครงเลี้ยงเซลล์ฝังใต้ผิวหนังของหนู โดยจะต้องฝังให้ห่างจากกลางหลังที่ผ่าเพื่อป้องกันผลจากการอักเสบต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าสู่ชิ้นตัวอย่าง หลังจากนั้นเย็บปิดแผลด้วยด้ายเย็บแผล และทำความสะอาดแผลโดยไม่ต้องปิดแผล ดังแสดงในแผนภาพในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง

3. ทำการสังเกตผลหลังจากปลูกถ่าย ด้วยการถ่ายรูปของบริเวณที่ทำการปลูกถ่าย, สังเกตการบวมแดงของผิวหนัง และ ตรวจดูสุขภาพของหนูหลังจากการปลูกถ่าย ทำการเก็บตัวอย่างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ฝังลงในใต้ผิวหนังของหนูในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 4 โดยก่อนที่จะทำการเก็บตัวอย่างจะทำการวางยาสลบหนูทดลองโดยใช้วิธีการดังที่กล่าวไว้ในข้อที่ 1 และทำการถ่ายภาพชิ้นตัวอย่างหลังการปลูกถ่าย ณ เวลาต่างๆ



4. นำตัวอย่างที่ได้มาย้อมด้วยเทคนิค hematoxylin and eosin (H&E) เพื่อดูผล cell infiltration การเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อ และวัดขนาดของแต่ละตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ เพื่อวัดขนาดของตัวอย่างหลังการย่อยสลาย

5. เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง หนูที่ทำการทดลอง จะถูกทำให้ตายโดยให้มีความทรมาณน้อยที่สุด โดยการใช้ยาสลบ overdose Barbiturate (Pentobarbital) ฉีดเข้า IV ของหนูทดลองเพื่อทำให้หนูตาย และซากของหนูทดลอง จะถูกนำไปทำลายโดยการเผาในเตาเผาซากสัตว์ต่อไป

### 3.4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบที (t-test) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Windows version 14, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนการสกัดคราตินจากเส้นผมมนุษย์โดยหาสภาวะที่เหมาะสมและศึกษาสมบัติของคราตินที่สกัดได้ ส่วนที่สองคือการนำคราตินไปใช้ขึ้นรูปโครงสร้างเชิงเซลล์และทดสอบสมบัติต่างๆ

#### 4.1 การสกัดคราตินและหาสภาวะที่เหมาะสม

การสกัดคราตินจากเส้นผมมนุษย์สามารถสกัดได้โดยการทำลายพันธะไคซัลไฟด์ภายในโมเลกุลของคราตินด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ได้แก่ 2-mercaptoethanol, Sodium sulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) และ Sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) โดยใช้ร่วมกับสารเคมีที่สามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนได้แก่ urea และ thiourea ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.2 งานวิจัยนี้ศึกษาผลของตัวรีดิวซ์ชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อปริมาณคราตินที่สกัดได้ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.1

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 (วิธีที่ 1-4) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงชนิดตัวรีดิวซ์ได้แก่ thiourea, sodium sulfide และ sodium metabisulfite กลุ่มที่สอง (วิธีที่ 5-7) ศึกษาผลการสกัดเมื่อไม่ใช้ 2-mercaptoethanol กลุ่มที่ 3 (วิธีที่ 8-9) ศึกษาผลการสกัดโดยใช้ urea ผสม thiourea แทน 2-mercaptoethanol และกลุ่มที่ 4 (วิธีที่ 10-11) ศึกษาผลการสกัดเมื่อใช้ urea, thiourea และ 2-mercaptoethanol เมื่อเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวรีดิวซ์ได้แก่ sodium sulfide และ sodium metabisulfite (ตารางที่ 4.1) การสกัดคราตินจากเส้นผมมนุษย์ด้วย 8M urea, 1.66M 2-ME และ 0.26M SDS ที่อุณหภูมิ  $50^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วิธีที่ 1) เปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 36% เมื่อเพิ่มสาร thiourea (วิธีที่ 2) เปอร์เซ็นต์ผลได้เพิ่มขึ้นเป็น 60% เนื่องจาก thiourea มีคุณสมบัติในการทำลายพันธะไฮโดรเจนได้เช่นเดียวกับ urea ทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายพันธะไฮโดรเจนมากขึ้นส่งผลให้สามารถสกัดคราตินได้มากขึ้น เมื่อเปลี่ยนแปลงชนิดตัวรีดิวซ์เป็น Sodium sulfide (วิธีที่ 3) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กำจัดขน เปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 39% ซึ่งมากกว่าวิธีแรก แต่เมื่อเพิ่ม Sodium metabisulfite (วิธีที่ 4) เปอร์เซ็นต์ผลได้ลดลงอย่างชัดเจน โดยมีค่าเท่ากับ 4% เมื่อทำการศึกษาผลของ 2-mercaptoethanol ซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ที่นิยมใช้กันทั่วไป เมื่อสกัดคราตินโดยไม่ใช้ 2-mercaptoethanol เปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าต่ำกว่ากรณีที่มี 2-mercaptoethanol แต่เมื่อสกัดด้วยสารละลายผสมของ urea และ thiourea (วิธีที่ 8 และ 9) เปอร์เซ็นต์ผลได้เพิ่มมากขึ้นกว่ากรณีที่ใช้ 2-mercaptoethanol นอกจากนี้การสกัดโดยใช้ urea, thiourea, 2-mercaptoethanol และเติม sodium sulfide หรือ sodium metabisulfite พบว่ากรณีที่เติม sodium metabisulfite สามารถสกัดคราตินได้มากที่สุด เปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 66% แต่ในปัจจุบันงานวิจัยต่างๆ นิยมสกัดคราตินจากขนแกะ

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลการสกัดคราตินจากเส้นผมมนุษย์ เมื่อเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นสารเคมีที่ใช้ในการสกัด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธี	ความเข้มข้น (โมลต่อลิตร)					เปอร์เซ็นต์ผลได้ (SD) ที่มา		
	Urea	2-ME	Thiourea	Sodium sulfide (Na <sub>2</sub> S)		Sodium metabisulfite (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	SDS	
1	8	1.66	-	-	-	0.26	36 (3.46)	Tachibana, A. (2002)
2	5	1.66	3	-	-	0.26	60 (2.12)	Nakamura, A. (2002)
3	5	1.66	-	3	-	0.26	39 (1.41)	-
4	5	1.66	-	-	3	0.26	4 (0.71)	-
5	5	-	-	-	3	0.26	31 (1.41)	Katoh, K. (2004)
6	5	-	-	3	-	0.26	22 (2.83)	-
7	5	-	3	-	-	0.26	13 (1.41)	-
8	5	-	3	0.5	-	0.26	49 (2.83)	-
9	5	-	3	-	0.5	0.26	52 (2.12)	-
10	5	1.66	3	-	0.5	0.26	57 (2.83)	-
11	5	1.66	3	0.5	-	0.26	66 (3.54)	-

หมายเหตุ: เปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield) = 
$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของเส้นผมที่ใช้สกัด (กรัม)}} \times 100\%$$

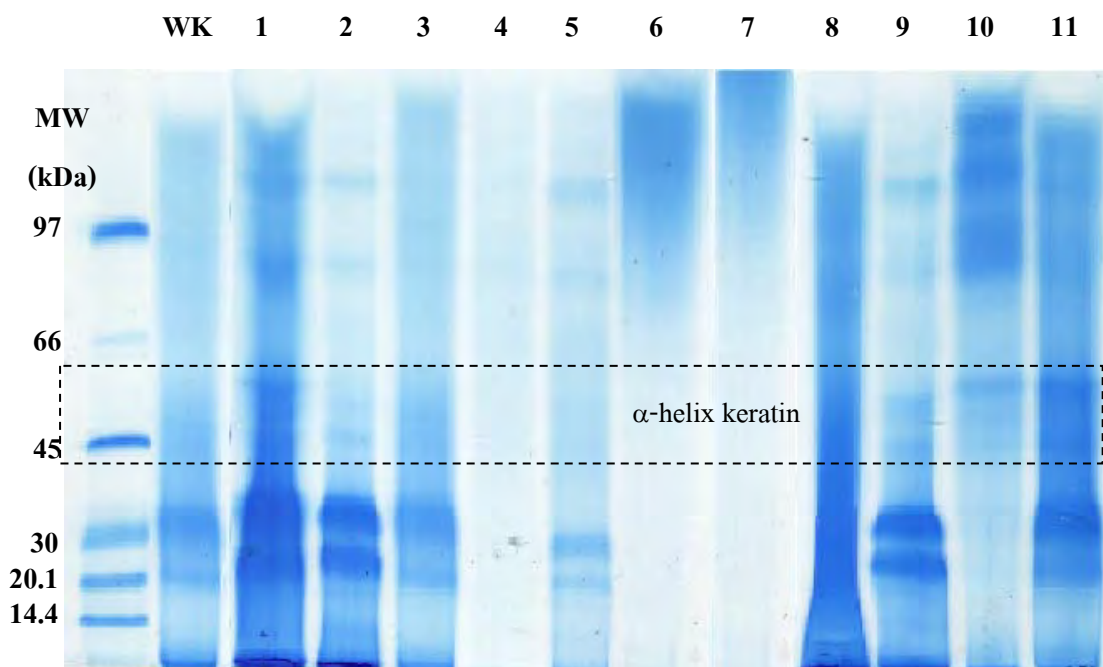
ด้วยวิธีที่ 1 [Tanabe, T. และคณะ, 2002, Tachibana, A. และคณะ, 2002] แม้สามารถสกัดเคราตินได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำก็ตาม

#### 4.2 ลักษณะสมบัติของเคราตินที่สกัดได้

##### 4.2.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเคราตินด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE)

จากการสกัดเคราตินด้วยวิธีต่างๆ ดังข้างต้น นำมาพิจารณาลักษณะสมบัติด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 15% polyacrylamide gel แสดงผลดังรูปที่ 4.1 การวิเคราะห์เคราตินจากขนแกะ (WK: wool keratin) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 M พบแถบโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลประมาณ 20-30 kDa การสกัดเคราตินจากเส้นผมวิธีที่ 1 โดยใช้ urea ในสารละลายผสมของ 2-mercaptoethanol (2-ME) และ SDS เกิดแถบโปรตีน 3 ช่วง ได้แก่ในช่วงขนาดโมเลกุลต่างๆ คือ 20-30 kDa และขนาดโมเลกุล 40-60 kDa ซึ่งอาจเป็นเคราตินที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวแบบแอลฟา พบเคราตินขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 70 และ 100 kDa สำหรับวิธีที่ 2 (เพิ่ม thiourea) พบแถบโปรตีนคล้ายกับการสกัดด้วย urea ในวิธีที่ 1 และยังมีพบแถบโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลประมาณ 40 kDa แสดงให้เห็นว่าการเพิ่ม thiourea ในการสกัดไม่ส่งผลต่อโครงสร้างเคราตินในเส้นผม เมื่อสกัดโดยเปลี่ยนชนิดตัวรีดิวซ์เป็น sodium sulfide (วิธีที่ 3) พบแถบโปรตีนคล้ายคลึงกับการสกัดวิธีที่ 1 และ 2 และพบแถบโปรตีนในช่วง 40-60 kDa เช่นกัน ส่วนวิธีที่ 4 (สกัดด้วย urea, 2-mercaptoethanol และ sodium metabisulfite) ไม่พบแถบโปรตีนใดๆ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ผลได้ในการสกัดมีค่าน้อยมาก (4%) การสกัดวิธีที่ 4 สาร 2-mercaptoethanol และ sodium metabisulfite ทำปฏิกิริยากันเอง การสกัดด้วยวิธีที่ 5 หรือ วิธีซัลไฟโตไลซิส (sulfitolysis) โดยใช้ urea และ sodium metabisulfite ซึ่งเคราตินที่สกัดได้ เรียกว่าซัลโฟเคราติน (S-sulfo keratin) [Katoh, K., 2004] เกิดแถบโปรตีนคล้ายกับการสกัดวิธีที่ 1 แต่วิธีนี้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำกว่าวิธีที่ 1 โดยพบแถบโปรตีนส่วนใหญ่ที่ 20-30 kDa นอกจากนี้การสกัดโดยไม่ใช้ 2-ME ดังวิธีที่ 6 และ 7 ซึ่งสกัดโดยใช้เพียง urea และเปลี่ยนชนิดตัวรีดิวซ์เป็น sodium sulfide และ sodium metabisulfite พบว่า โปรตีนที่สกัดได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่เท่านั้น คือช่วง 70-100 kDa แสดงให้เห็นว่า 2-ME ส่งผลต่อขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้ โดยเมื่อสกัดในสถานะที่มี 2-ME โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลงอยู่ในช่วง 20-60 kDa นอกจากนี้ถ้าสกัดโดยไม่ใช้ 2-ME แต่ใช้ thiourea ในการสกัดแทน 2-ME (วิธีที่ 8 และ 9) พบว่า สามารถสกัดโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กได้ (20-60 kDa) เช่นเดียวกับการสกัดโดยใช้ 2-ME จากผลการสกัดด้วย urea, 2-ME, thiourea และ sodium sulfide (วิธีที่ 11) ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 66% พบโปรตีนขนาดโมเลกุล 20, 30, 40, 45 kDa และที่ขนาดโมเลกุลใหญ่ตั้งแต่ขนาดประมาณ 70-100 kDa การสกัดด้วยวิธีนี้ โดยการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเคราติน

ที่สกัดได้มีเติมสาร 2-meraptoethanol ในสารละลายบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ง) โดยสาร 2-mercaptoethanol มีหน้าที่ตัดพันธะไดซัลไฟด์ น้ำหนักโมเลกุลอาจเล็กลง ซึ่งอาจส่งผลให้การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลคลาดเคลื่อน ดังนั้นจึงนำสารละลายเคราตินจากการสกัดวิธีที่ 11 มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยตัดแปลงวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยไม่เติม 2-mercaptoethanol ในสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของเคราตินที่สกัดได้ใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยการเติมสาร 2-mercaptoethanol ในสารละลายบัฟเฟอร์ ดังภาคผนวก ง เพราะฉะนั้นการใช้ 2-mercaptoethanol ในสารละลายบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อลักษณะสมบัติของโปรตีน การตัดสายโซ่ของโมเลกุลให้เล็กลงตั้งแต่กระบวนการสกัด

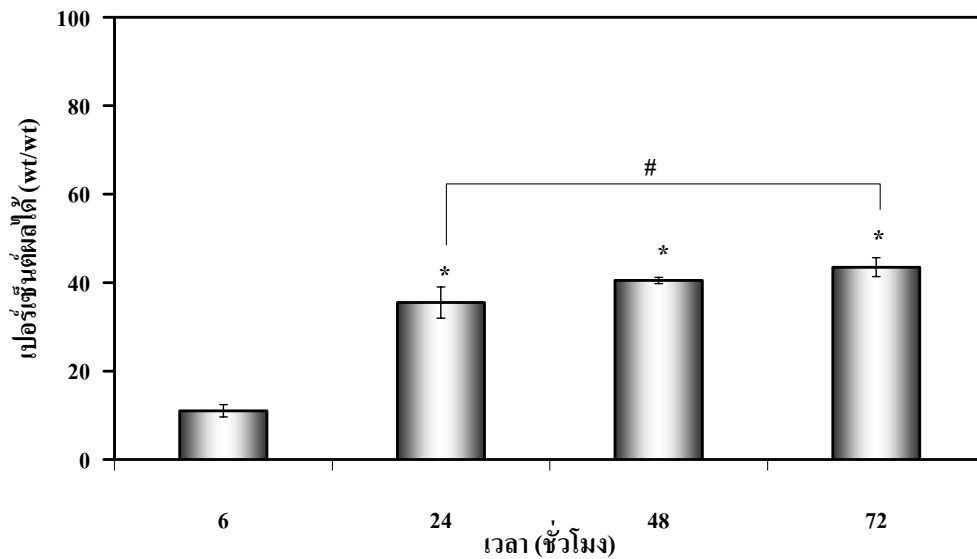


รูปที่ 4.1 SDS-PAGE ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 1-11 ดังตารางที่ 4.1 โดยภายในกรอบเส้นประแสดงช่วงของขนาดโมเลกุลเคราตินที่มีโครงสร้างแบบเกลียวแอลฟา (WK: wool keratin, เลข 1-11 คือวิธีสกัดที่ 1-11)

สามารถสกัดโปรตีนได้ขนาดโมเลกุลหลายขนาด ในขณะที่เปลี่ยนตัวรีดิวซ์จาก sodium sulfide เป็น sodium metabisulfite (วิธีที่ 10) ขนาดโมเลกุลโปรตีนที่สกัดได้มีเพียงขนาดโมเลกุลใหญ่เท่านั้นโดยขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 70-100 kDa แม้การสกัดด้วย sodium metabisulfite ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงและใกล้เคียงกับการสกัดโดยใช้ sodium sulfide ก็ตาม แต่ขนาดโมเลกุลที่ได้แตกต่างกัน

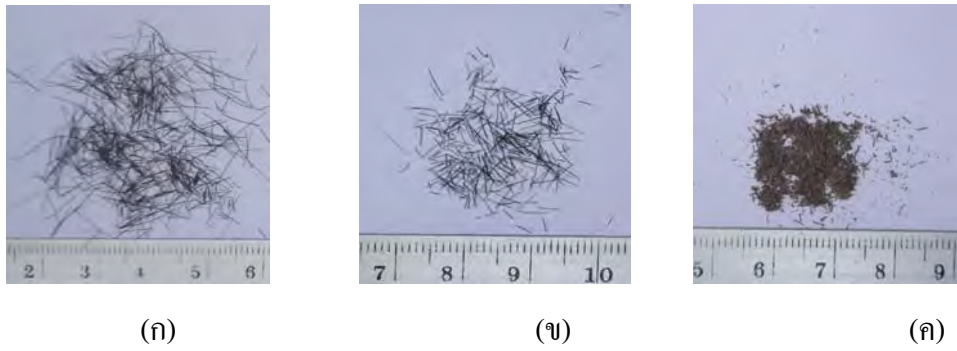
งานวิจัยนี้เลือกการสกัดคราดินวิธีที่ 1 ในการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดและวิธีการเตรียมวัสดุที่มีต่อปริมาณคราดินที่สกัดได้ โดยระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่เลือกศึกษา คือ 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้ระยะเวลาในการสกัด 6 ชั่วโมงเป็นตัวควบคุม [Tachibana, A และคณะ, 2002] ผลการสกัดแสดงดังรูปที่ 4.2

เมื่อใช้เวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้น ปริมาณคราดินที่สกัดได้มากขึ้น โดยเมื่อใช้เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง พบว่า สามารถสกัดคราดินได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ 11% เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดเป็น 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ผลได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยมีค่าเท่ากับ 36% และเมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดที่ใช้เวลา 6 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด 24 และ 48 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ผลได้ที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การสกัดที่ใช้เวลา 72 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ผลได้แตกต่างกับการสกัดที่ใช้เวลา 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าเลือกใช้เวลาในการสกัด 72 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาค่อนข้างมากและอาจส่งผลกระทบต่อขนาด โมเลกุลของคราดินที่สกัดได้ อาจมีขนาดโมเลกุลเล็กเกินไป

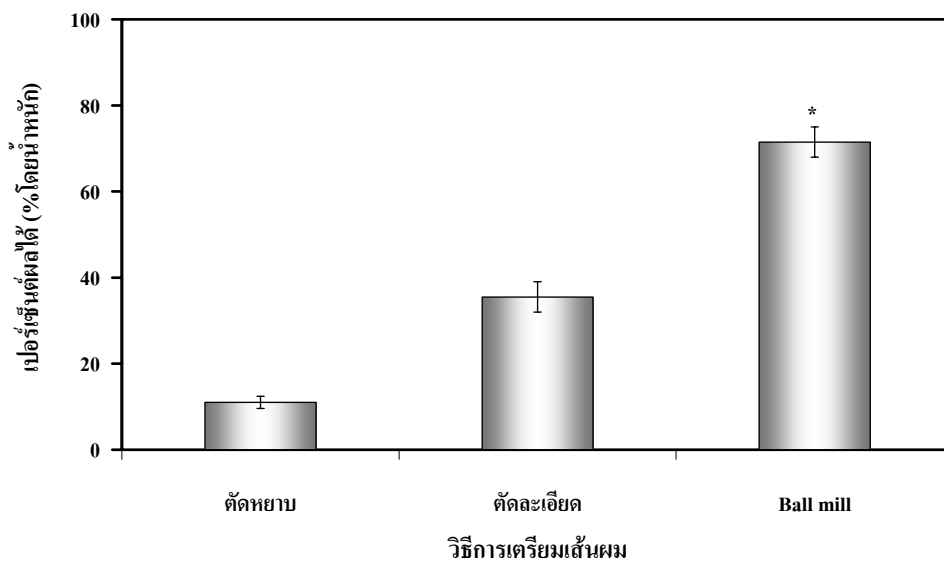


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงผลการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์เมื่อเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยสกัดด้วย 8M Urea+ 1.66M 2-ME+ 0.26M SDS (วิธีที่ 1 ในตารางที่ 4.1) ที่อุณหภูมิ 50°C (สัญลักษณ์ \*, # แสดงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบกับการสกัดที่ใช้เวลา 6 ชั่วโมงและเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ตามลำดับ ที่ n = 3)

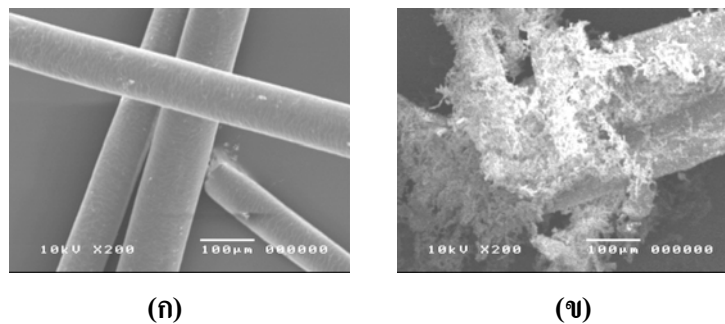
การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงวิธีการเตรียมวัสดุต่อปริมาณเคราตินที่สกัดได้ โดยแบ่งวิธีการเตรียมวัสดุออกเป็น 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 ตัดผมแบบหยาบ วิธีที่ 2 ตัดผมแบบละเอียด (ด้วยกรรไกร) และวิธีที่ 3 บดผมด้วยเครื่อง Ball mill แสดงดังรูปที่ 4.3 การนำเส้นผมมาบดด้วยเครื่อง Ball mill โดยใช้เวลา 6 ชั่วโมง บดด้วยลูกหินขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด ได้แก่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว จำนวน 20 ลูก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.75 นิ้ว 15 ลูก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 นิ้ว 20 ลูก ต่อเส้นผม 500 กรัม ผลการสกัดเมื่อเปลี่ยนแปลงวิธีการเตรียมวัสดุ แสดงดังรูปที่ 4.4 เมื่อวัสดุขนาดเล็ก ปริมาณเคราตินที่สกัดได้มากขึ้น เนื่องจากวัสดุมีพื้นที่ผิวสัมผัสต่อการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น สามารถสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในการสกัดได้มากขึ้น เมื่อพิจารณาลักษณะเส้นผมที่ตัดด้วยกรรไกรและบดด้วยเครื่อง Ball mill พบว่า พื้นผิวของเส้นผมที่บดด้วยเครื่อง Ball mill มีลักษณะเปื่อยยุ่ย ในขณะที่เส้นผมที่ตัดด้วยกรรไกรพื้นผิวเรียบ แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.3 แสดงการเตรียมวัสดุในการสกัดเคราติน (ก) วิธีที่ 1 ตัดแบบหยาบ (ข) วิธีที่ 2 ตัดแบบละเอียด (ค) วิธีที่ 3 บดด้วยเครื่อง Ball mill



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงผลการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์ด้วย 8M Urea+1.66M -2-ME+0.26M SDS (วิธีที่ 1 ในตารางที่ 4.1) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนแปลงวิธีการเตรียมวัสดุ (\*แสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%เปรียบเทียบกับ การเตรียมวัสดุวิธีที่ 1 เมื่อ n = 3)



รูปที่ 4.5 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (ก) เส้นผม และ (ข) เส้นผมเมื่อบดด้วยเครื่อง Ball mill เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

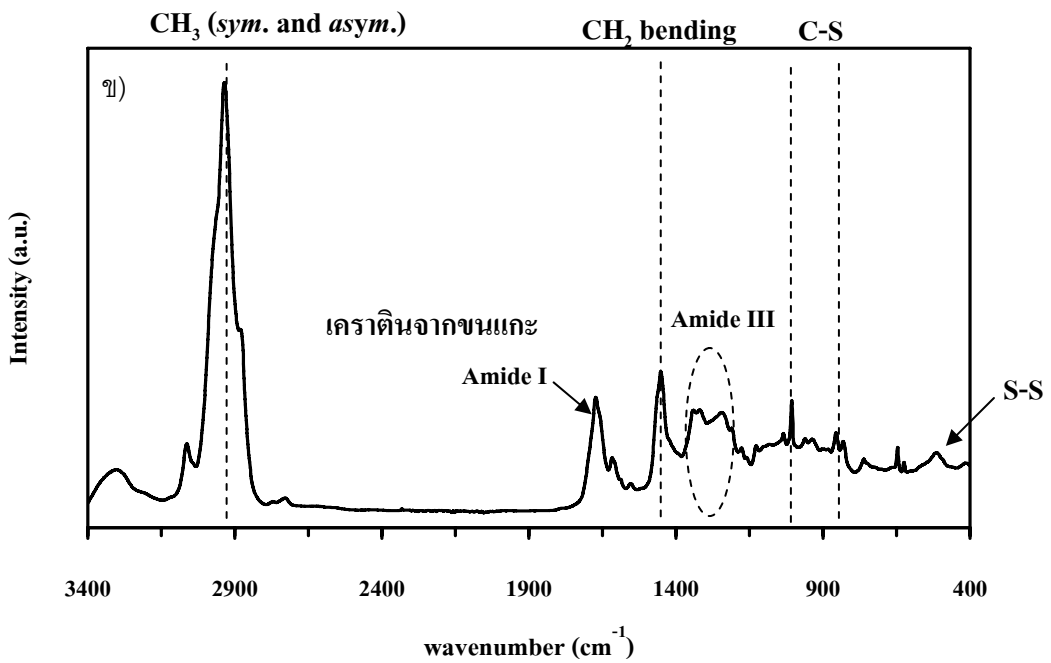
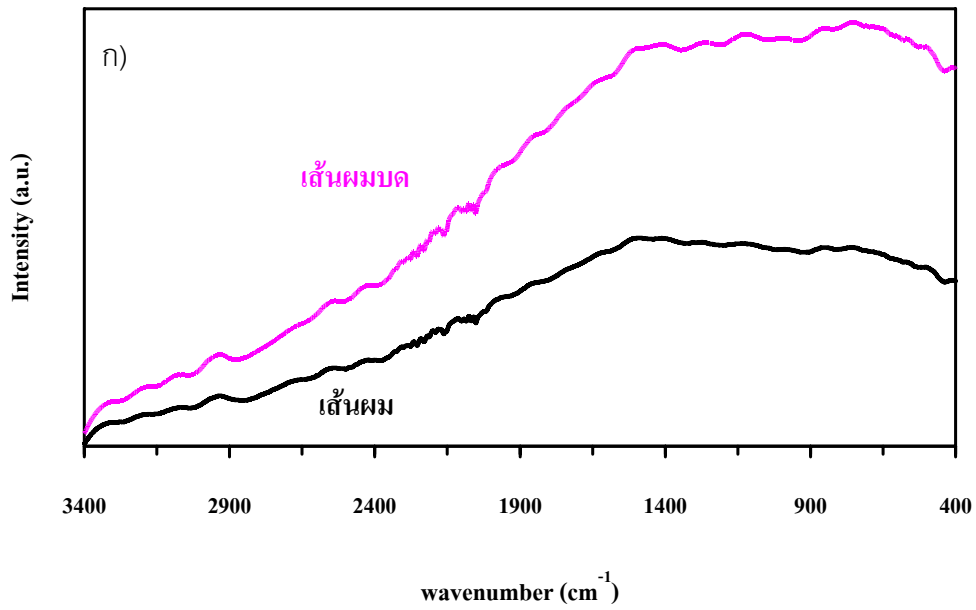


#### 4.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างเคราตินที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งโดยวิธีรามานสเปกโตรสโกปี (Fourier Transform Raman Spectroscopy)

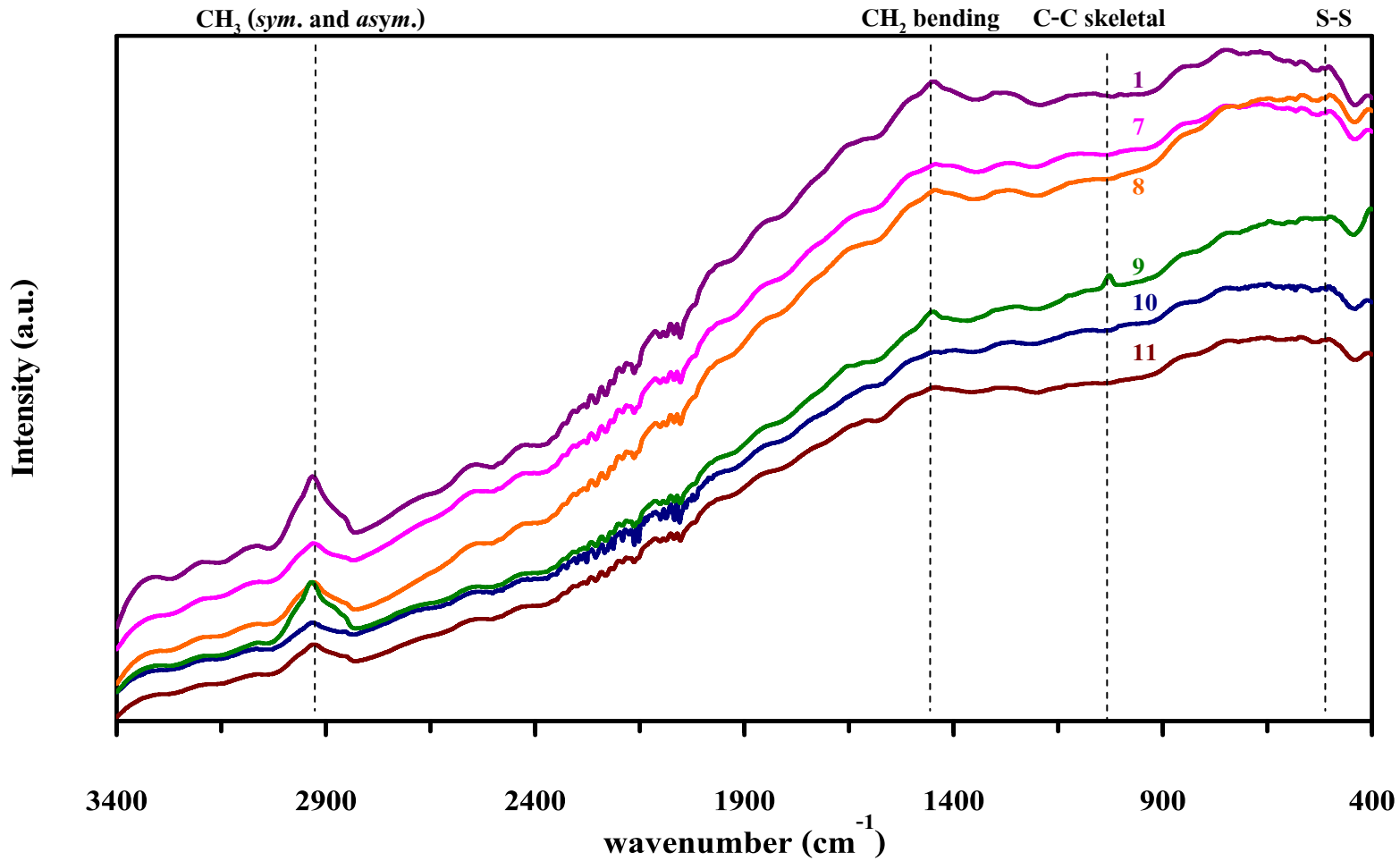
การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 1-11 (ตารางที่ 4.1) โดยใช้เทคนิครามานสเปกโตรสโกปี ซึ่งสามารถวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของเคราติน เตรียมตัวอย่างโดยนำสารละลายเคราตินที่สกัดได้ขึ้นรูปเป็น โครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็งแล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง FT-Raman (Perkin Elmer) ในช่วงความยาวคลื่น  $3400-400\text{ cm}^{-1}$  สเปกตรัมของเส้นผมและเคราตินจากขนแกะ (Commercialized) แสดงดังรูปที่ 4.6 เคราตินเป็น โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลเคราติน (-S-S) ดังนั้นพันธะนี้จึงเป็นลักษณะเฉพาะของเคราติน ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิครามานสเปกโตรสโกปี การสั่นของพันธะไดซัลไฟด์เกิดขึ้นในช่วงเลขคลื่น  $500-550\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเห็นอย่างชัดเจนในเคราตินจากขนแกะ แต่เส้นผม (รูปที่ 4.6ก.) ไม่เห็นพีกต่างๆ อย่างชัดเจน อาจเกิดจากสถานะของวัสดุที่แตกต่างกัน เคราตินจากขนแกะผ่านกระบวนการสกัดซึ่งทำลายโครงสร้างแบบ bundle ของโปรตีนให้อยู่ในรูป random coil เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ใหม่อีกครั้ง ทำให้สามารถเห็นพีกของพันธะไดซัลไฟด์ได้อย่างชัดเจนกว่าเส้นผม การสกัดเคราตินจากเส้นผมมีการใช้สารเพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้เคราตินสามารถละลายน้ำออกมาหมด โดยทั่วไปจะไม่พบพีกของพันธะ S-S แต่เมื่อนำสารละลายเคราตินที่สกัดได้มาทำแห้งเยือกแข็ง ทำให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นใหม่อีกครั้ง แต่อาจมีปริมาณน้อยลง เนื่องจากบางส่วนถูกทำลายไปตามสถานะการสกัด

เมื่อนำเคราตินที่สกัดด้วยวิธีที่ 1-11 วิเคราะห์ด้วยเทคนิครามานสเปกโตรสโกปี ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.7-4.10 เมื่อพิจารณาสเปกตรัมของเคราตินที่สกัดได้แต่ละวิธี พบว่าสเปกตรัมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่ง ได้แก่ วิธีสกัดที่ 1, 7, 8, 9, 10 และ 11 ลักษณะสเปกตรัมมีพีกแสดงการสั่นของพันธะ C-S ( $650$  และ  $600\text{ cm}^{-1}$ ) และ S-S ( $540$ ,  $520$  และ  $500\text{ cm}^{-1}$ ) เด่นชัด และกลุ่มที่สองซึ่งเห็นพีกแสดงกันสั่นของพันธะ C-S และ S-S ไม่ชัดเจน ได้แก่วิธีสกัดที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 เมื่อพิจารณาจาก SDS-PAGE พบว่า กลุ่มที่หนึ่ง ยกเว้นวิธีที่ 7 (วิธีที่ 1, 8, 9, 10 และ 11) พบขนาดโมเลกุลในช่วง  $40-60\text{ kDa}$  ซึ่งคือเคราตินที่มีโครงสร้างแบบเกลียวแอลฟา มีพันธะไดซัลไฟด์สมบูรณ์ (-CS-SC-) พบพีกการสั่นของพันธะ C-S และ S-S อย่างชัดเจน ในขณะที่กลุ่มที่สอง (วิธีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6) ไม่พบแถบโปรตีนในช่วงขนาดโมเลกุล  $40-60\text{ kDa}$  (รูปที่ 4.1) อาจเกิดการสกัดคราตินตัดสายโซ่โมเลกุลของเคราตินมากเกินไป ทำให้การสกัดในกลุ่มที่สองเห็นพีกพันธะ C-S และ S-S ไม่ชัดเจนเท่ากลุ่มแรก

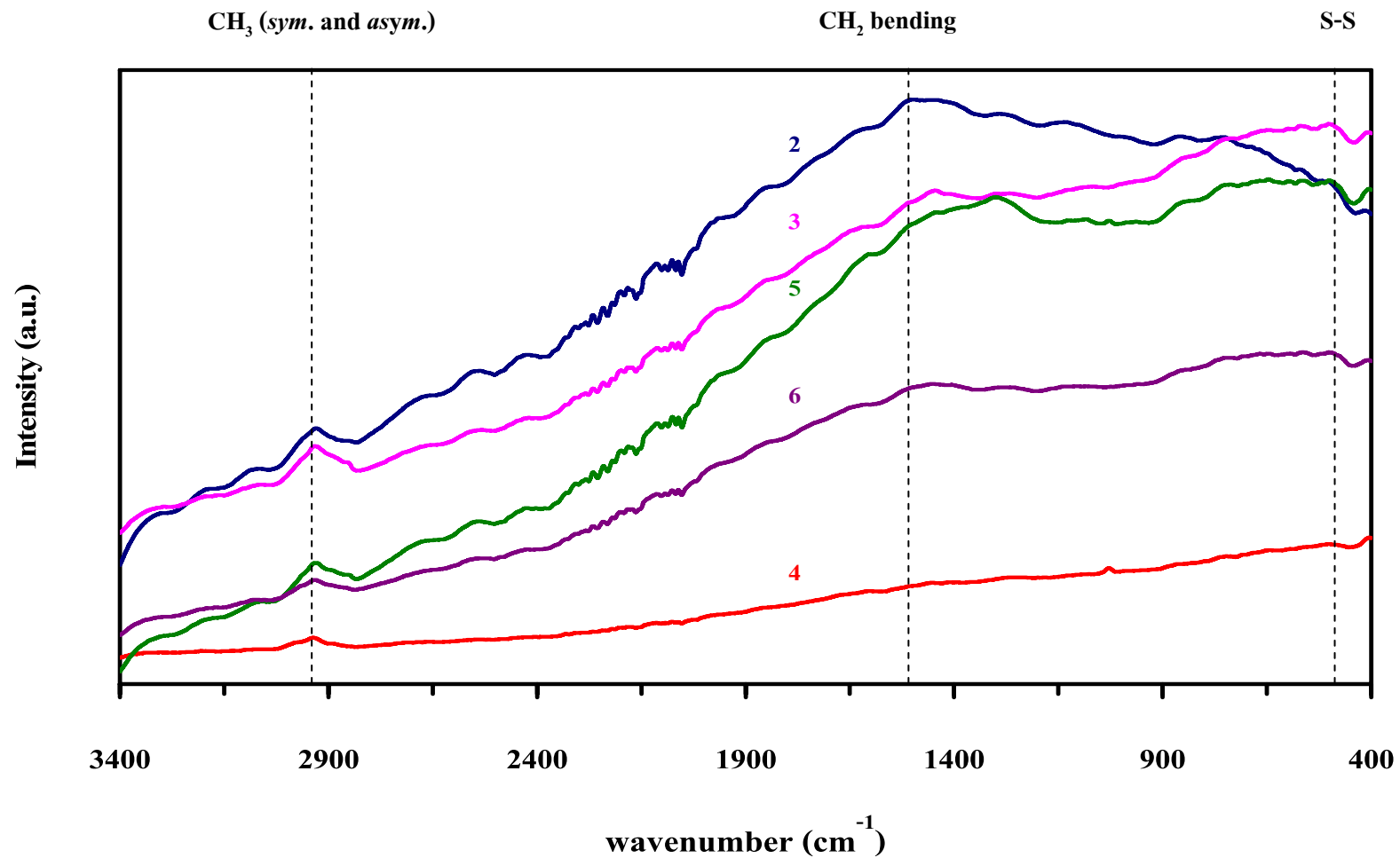
จากสเปกตรัมของเคราตินที่สกัดได้จากเส้นผมแต่ละวิธี พบว่า ทุกวิธีเกิดพีคที่แสดงลักษณะสมบัติของเคราติน โดยที่เลขคลื่นประมาณ  $650$  และ  $600\text{ cm}^{-1}$  แสดงการสั่นแบบยืดของพันธะ C-S และที่เลขคลื่นประมาณ  $540$ ,  $520$  และ  $500\text{ cm}^{-1}$  แสดงการสั่นของพันธะ S-S ซึ่งเป็นลักษณะโครงสร้างเฉพาะของเคราตินที่แตกต่างจากโปรตีนชนิดอื่น เนื่องจากเคราตินประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนเป็นจำนวนมาก สามารถเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุล (S-S) พิจารณาการสั่นที่เลขคลื่น  $520$  และ  $500\text{ cm}^{-1}$  สามารถบอกโครงรูปของพันธะ C-C และ C-S ได้ โดยที่เลขคลื่น  $540\text{ cm}^{-1}$  แสดงโครงรูปแบบ trans-gauche-trans ที่เลขคลื่น  $520\text{ cm}^{-1}$  แสดงโครงรูปแบบ gauche-gauche-gauche conformation ซึ่งเป็นโครงร่างที่มีความเสถียรที่สุด เมื่อพิจารณาสเปกตรัมในรูปที่ 4.9 พบว่าวิธีการสกัดวิธีที่ 1 เกิดพีคที่เลขคลื่น  $520\text{ cm}^{-1}$  ความเข้มมากกว่าวิธีอื่น แสดงว่าวิธีที่ 1 สามารถสกัดเคราตินให้อยู่ในรูปที่เสถียรมากกว่าวิธีอื่น และที่เลขคลื่น  $500\text{ cm}^{-1}$  แสดงโครงรูปแบบ gauche-gauche-trans conformation แสดงดังรูปที่ 4.11



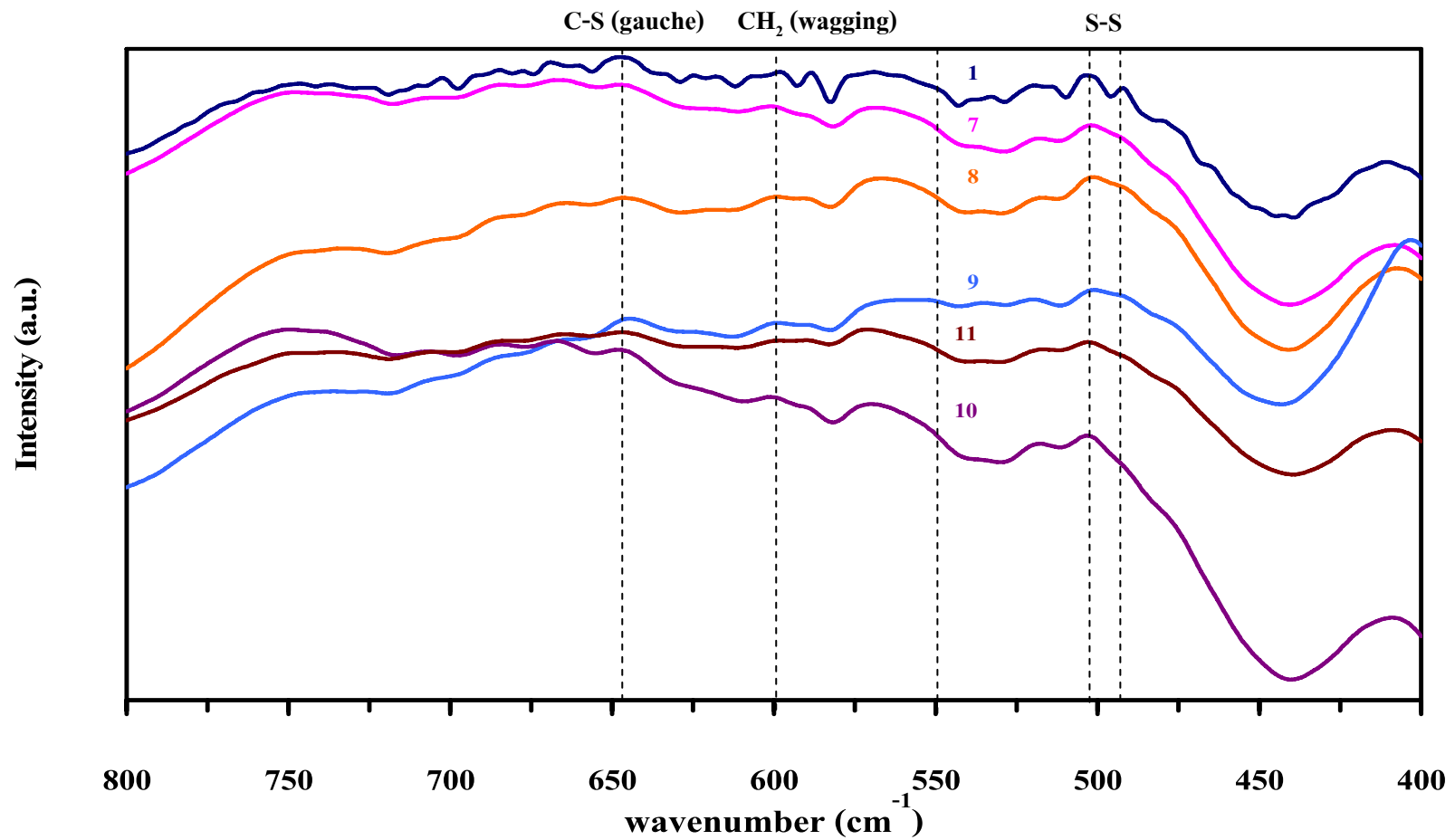
รูปที่ 4.6 FT-Raman spectra ของเส้นผมมนุษย์และเคราตินจากขนแกะ (Commercialized) ในช่วงเลขคลื่น  $3400\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  โดยเส้นประแสดงตำแหน่งเลขคลื่นที่เกิดการสั่นของพันธะต่าง ๆ



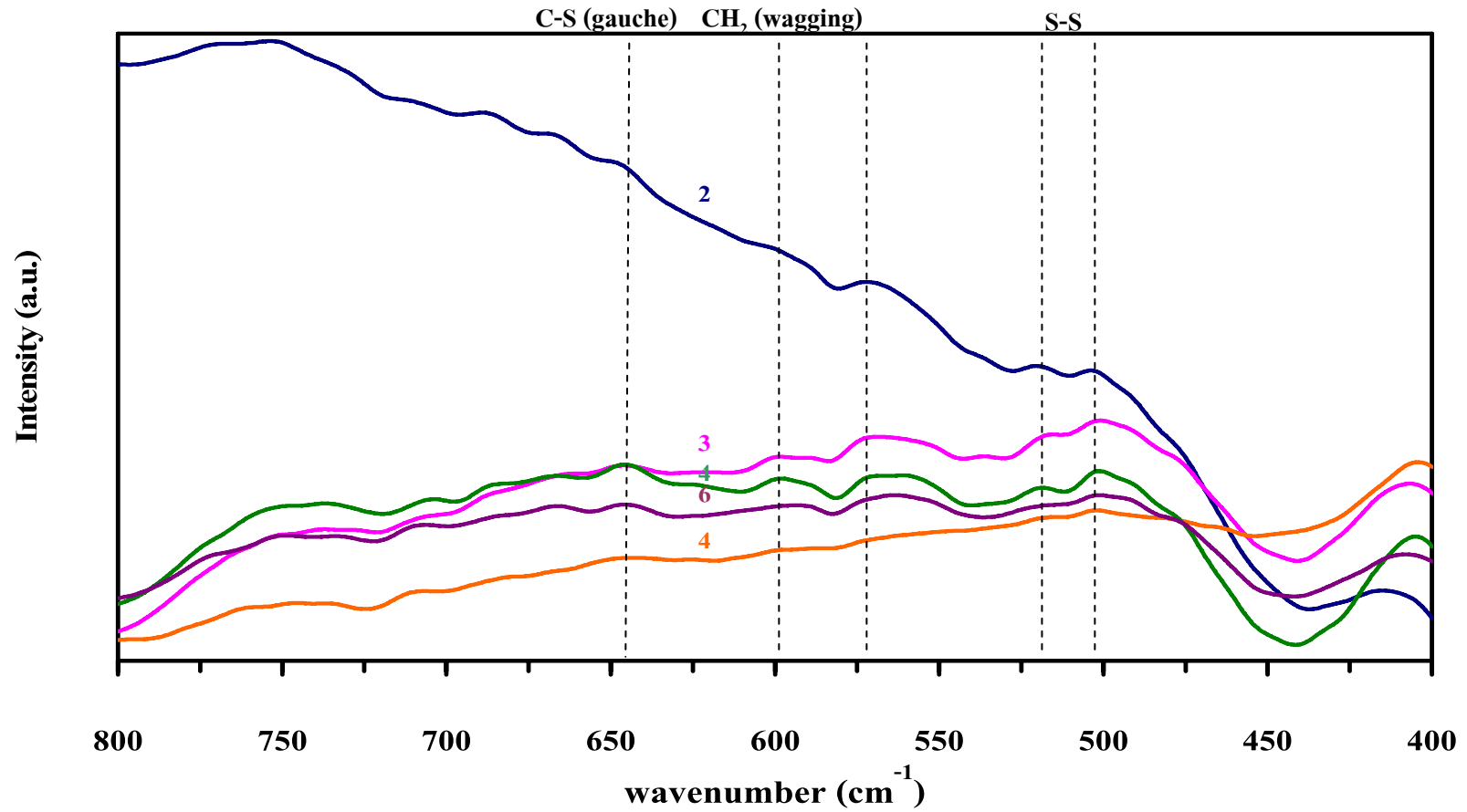
รูปที่ 4.7 FT-Raman spectra ของคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 1, 7, 8, 9, 10 และ 11 ในตารางที่ 4.1 (ตัวเลขบนเส้นกราฟแสดงถึงวิธีในการสกัด) ในช่วงเลขคลื่น 3400-400  $\text{cm}^{-1}$  โดยเส้นประแสดงตำแหน่งเลขคลื่นที่เกิดการสั่นของพันธะต่าง ๆ



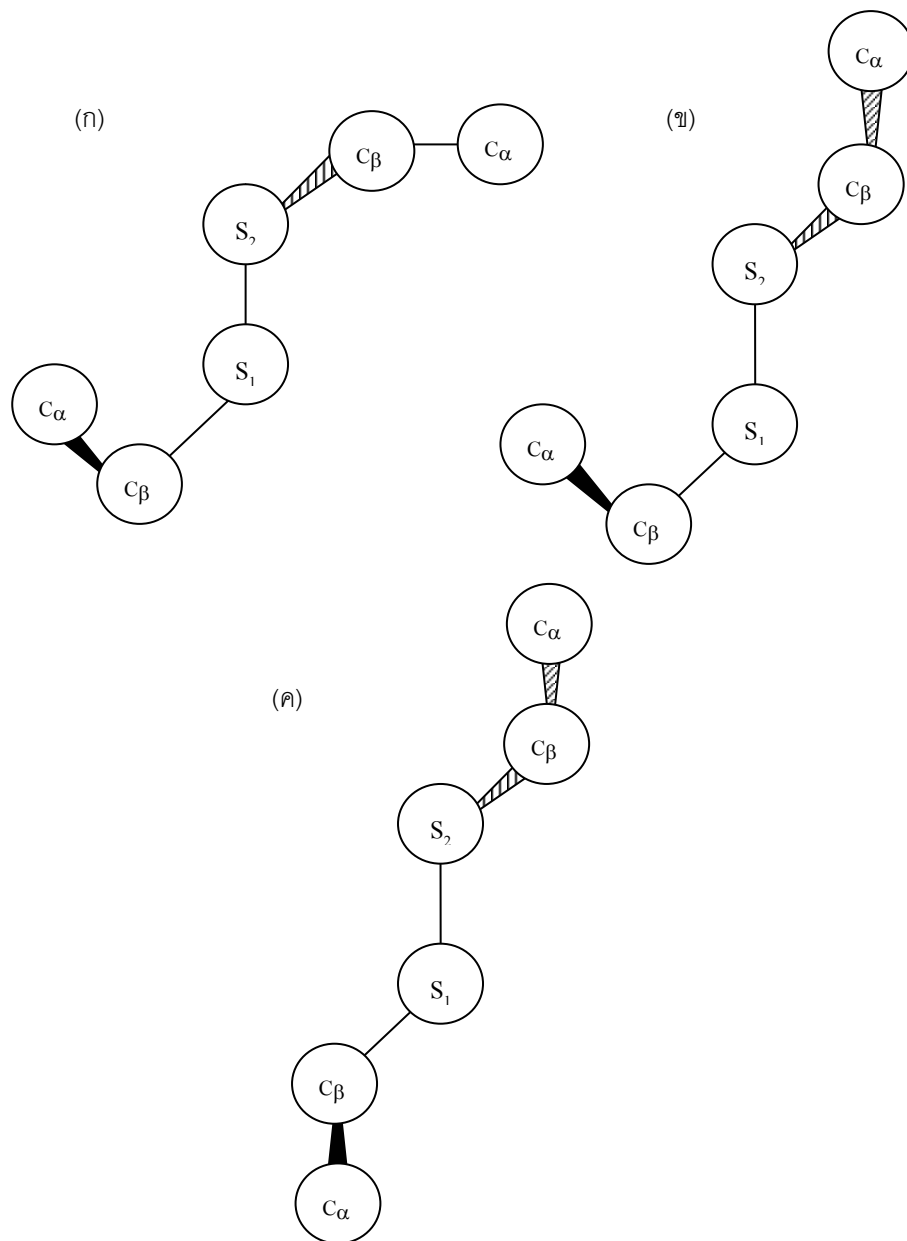
รูปที่ 4.8 FT-Raman spectra ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ในตารางที่ 4.1 (ตัวเลขบนเส้นกราฟแสดงถึงวิธีในการสกัด) ในช่วงเลขคลื่น 3400-400  $\text{cm}^{-1}$  โดยเส้นประแสดงตำแหน่งเลขคลื่นที่เกิดการสั่นของพันธะต่าง ๆ



รูปที่ 4.9 FT-Raman spectra ของคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 1, 7, 8, 9, 10 และ 11 ในตารางที่ 4.1 (ตัวเลขบนเส้นกราฟแสดงถึงวิธีในการสกัด) ในช่วงเลขคลื่น 800-400  $\text{cm}^{-1}$  โดยเส้นประแสดงตำแหน่งเลขคลื่นที่เกิดการสั่นของพันธะต่าง ๆ



รูปที่ 4.10 FT-Raman spectra ของเคราตินที่สกัดจากเส้นผมด้วยวิธีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ในตารางที่ 4.1 (ตัวเลขบนเส้นกราฟแสดงถึงวิธีในการสกัด) ในช่วงเลขคลื่น 800-400 cm<sup>-1</sup> โดยเส้นประแสดงตำแหน่งเลขคลื่นที่เกิดการสั่นของพันธะต่าง ๆ



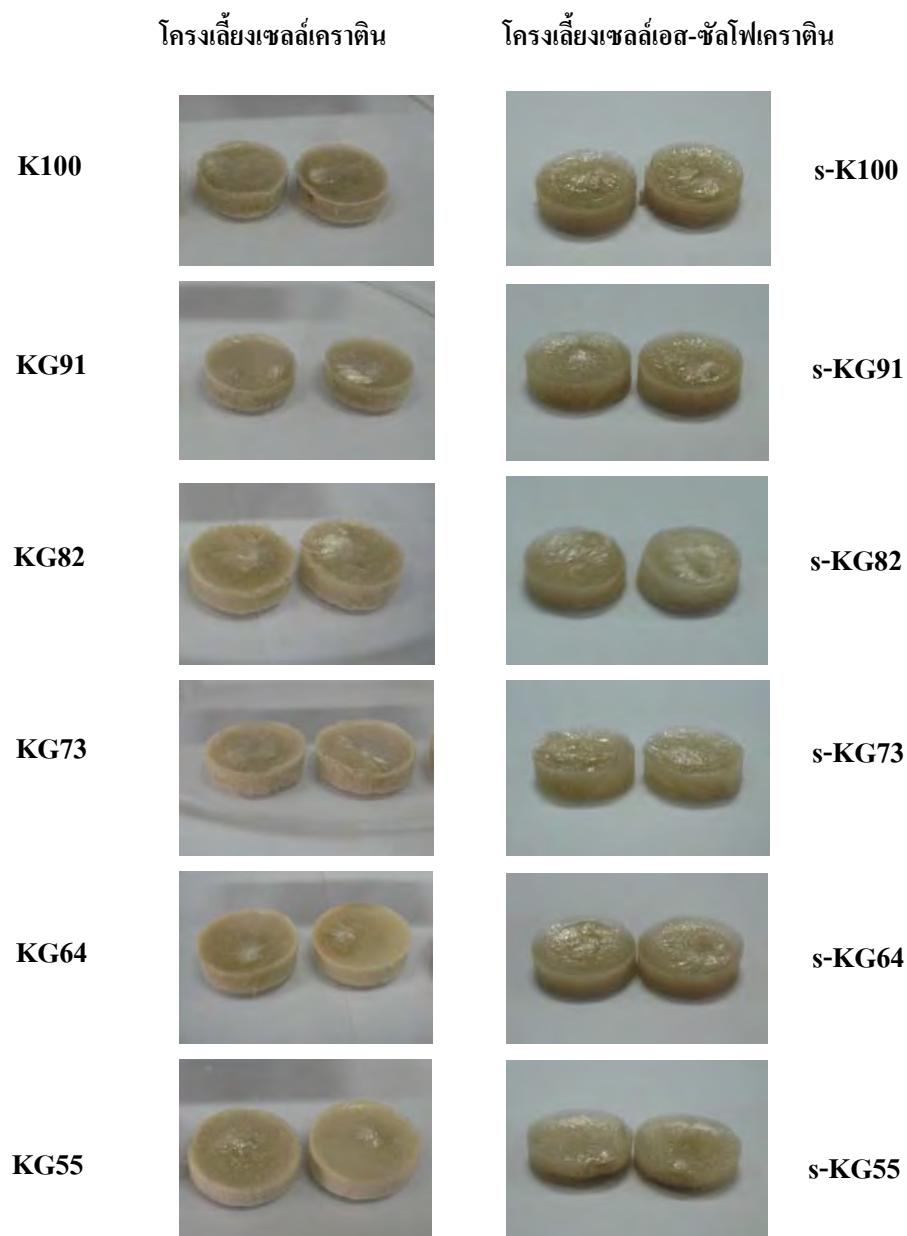
รูปที่ 4.11 แผนภาพแสดงโครงรูปของพันธะ  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ - $S_1$ - $S_2$ -  $C_{\beta}$ -  $C_{\alpha}$  ของพันธะไดซัลไฟด์ในเครา  
 ดิน (ก) gauche-gauche-gauche (ข) gauche-gauche-trans และ (ค) trans-gauche-trans [Edwards,  
 H.G.M. และคณะ, 1997]



### 4.3 ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

#### 4.3.1 ลักษณะทั่วไปทางกายภาพ

ลักษณะทั่วไปของโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (วิธีที่ 1), เอส-ซัลโฟเคราติน (วิธีที่ 5), เคราตินผสมเจลาตินและเอส-ซัลโฟเคราตินผสมเจลาติน แสดงดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 รูปถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินเมื่อผสมเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่างๆ (K: เคราติน, s-K: เอส-ซัลโฟเคราติน, G: เจลาติน รหัสโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงในหัวข้อ 3.3.3 ตารางที่ 3.1 และ 3.1)

โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินขุบตัวได้ง่ายแต่เมื่อมีการผสมเจลาตินโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้นสามารถจับได้ง่ายขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีสีมันวาวและมีความยืดหยุ่นมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน ขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินผสมกับเจลาติน Type A แสดงดังตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อขึ้นรูปด้วยเทคนิคทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่า ฤทธิ์โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเจลาติน ปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น แต่ฤทธิ์โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน ปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ใกล้เคียงกันเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเจลาติน เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ดังรูปที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์คำนวณดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ การหดตัว} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายที่ใช้ขึ้นรูป} - \text{ปริมาตร โครงเลี้ยงเซลล์}}{\text{ปริมาตรสารละลายที่ใช้ขึ้นรูป}} \times 100$$

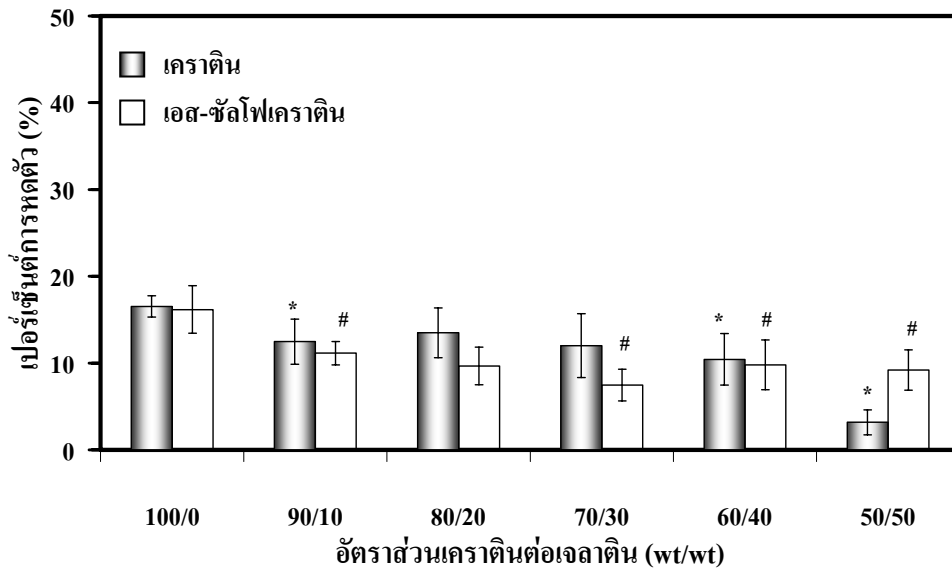
โดยปริมาตรสารละลายที่ใช้ขึ้นรูปเท่ากับ 0.75 มิลลิลิตร โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีเปอร์เซ็นต์การหดตัวลดลงเมื่ออัตราส่วนเจลาตินต่อเคราตินเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ฤทธิ์โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินเปอร์เซ็นต์การหดตัวใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นถึงโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีความคงตัวมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราติน เมื่อผสมกับเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่าง ๆ (n=5)

อัตราส่วนเคราติน/เจลาติน

(wt/wt)	โครงเลี้ยงเซลล์เคราติน			โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน		
	เส้นผ่าศูนย์กลาง (mm)	ความหนา(mm)	ปริมาตร(ml)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (mm)	ความหนา(mm)	ปริมาตร(mm)
100/0	14.19±0.13	3.96±0.04	0.63±0.01	14.17±0.06	3.99±0.22	0.63±0.03
90/10	14.21±0.15	4.27±0.27	0.65±0.02	13.90±0.13	4.33±0.10	0.66±0.01
80/20	14.09±0.24	4.07±0.24	0.65±0.03	14.05±0.10	4.18±0.18	0.66±0.03
70/30	14.22±0.15	4.11±0.15	0.66±0.04 <sup>δ</sup>	14.30±0.12	4.36±0.13	0.69±0.01 <sup>#</sup>
60/40	14.26±0.17	4.12±0.15	0.67±0.02*	14.26±0.11	4.43±0.22	0.67±0.02 <sup>#</sup>
50/50	14.43±0.12	4.36±0.15	0.72±0.01*	14.08±0.19	4.37±0.18	0.68±0.02 <sup>#</sup>

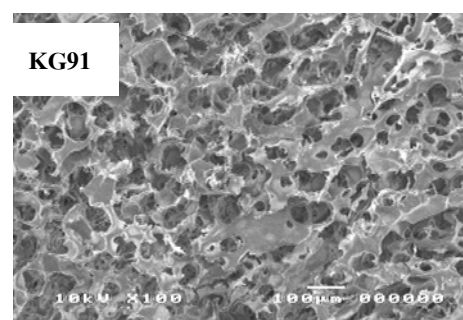
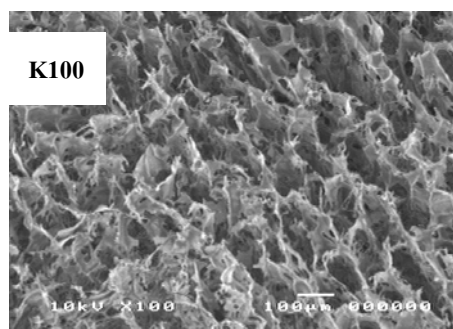
หมายเหตุ: สัญลักษณ์ \*, # และ δ แสดงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, p-value < 0.05 โดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน, โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินและเปรียบเทียบระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วนเดียวกัน



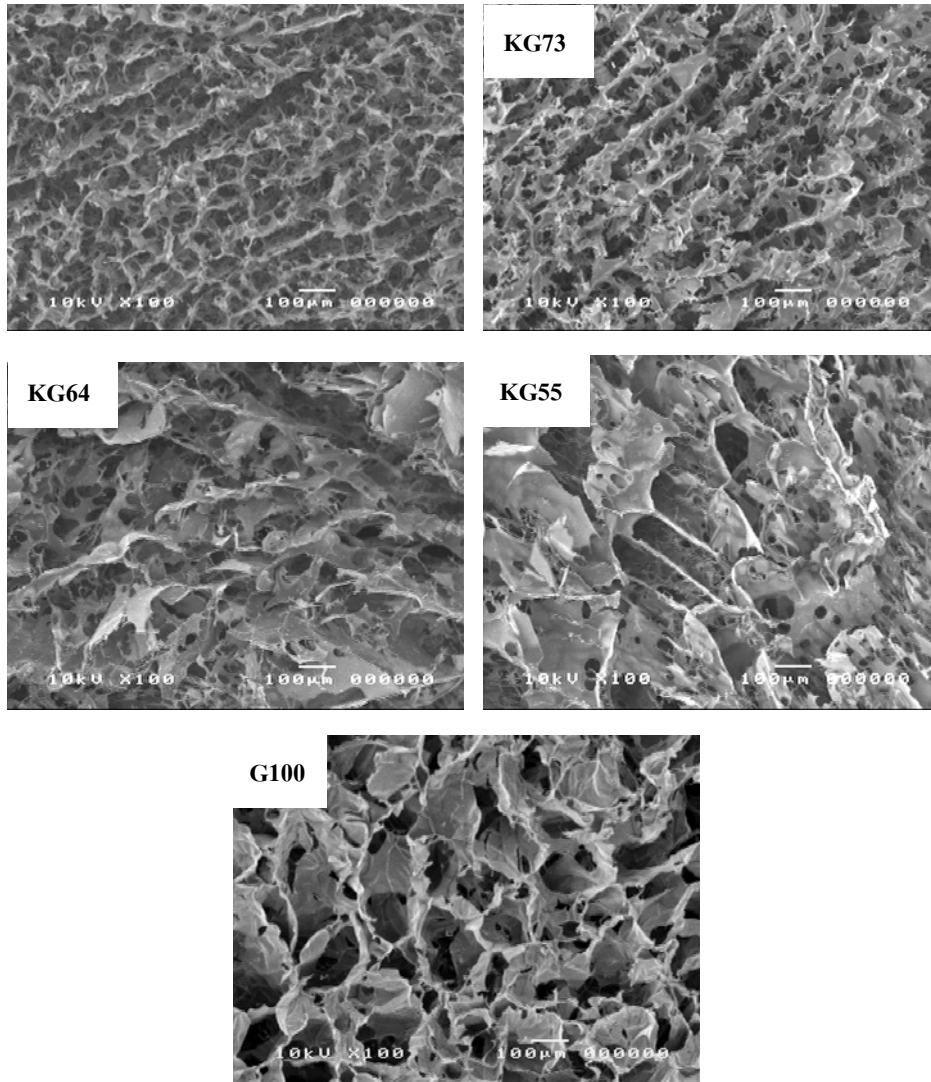
รูปที่ 4.13 การหดรตัวของโครงเลี้ยงเซลล์เคลรดินและเอส-ซัลโฟเคลรดิน เมื่อผสมเจลาตินที่อัตราส่วนต่างๆ (สัญลักษณ์ \* และ # แสดงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p$ -value < 0.05 โดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เคลรดินและโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคลรดินตามลำดับ)

ลักษณะโครงสร้างภายในของโครงเลี้ยงเซลล์เคลรดินและเคลรดินผสมเจลาติน type A อัตราส่วนเคลรดินต่อเจลาติน(wt/wt) เท่ากับ 100/0 (K100), 90/10(KG91), 80/20 (KG82), 70/30 (KG73), 60/40 (KG64) และ 50/50 (KG55) 0.8% total solid weight มีรูพรุนที่เชื่อมโยงกัน เคลรดินช่วยให้ผนังของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมมีความพรุนมากขึ้น ดังรูปที่ 4.14 โดยขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เคลรดินและโครงเลี้ยงเซลล์เคลรดินผสมเจลาตินที่อัตราส่วนต่าง ๆ อยู่ในช่วง 65-112 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.3) เมื่ออัตราส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้น ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ใหญ่ขึ้น ลักษณะโครงสร้างภายในของโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคลรดินและเอส-ซัลโฟเคลรดินผสมเจลาติน type A อัตราส่วนเอส-ซัลโฟเคลรดินต่อเจลาติน (wt/wt) 100/0 (s-K100), 90/10 (s-KG91), 80/20 (s-KG82), 70/30 (s-KG73), 60/40 (s-KG64) และ 50/50 (s-KG55) 0.8% total solid weight ดังรูปที่ 4.15 โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคลรดินมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยใหญ่กว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคลรดินประมาณสองเท่า (ตารางที่ 4.3)

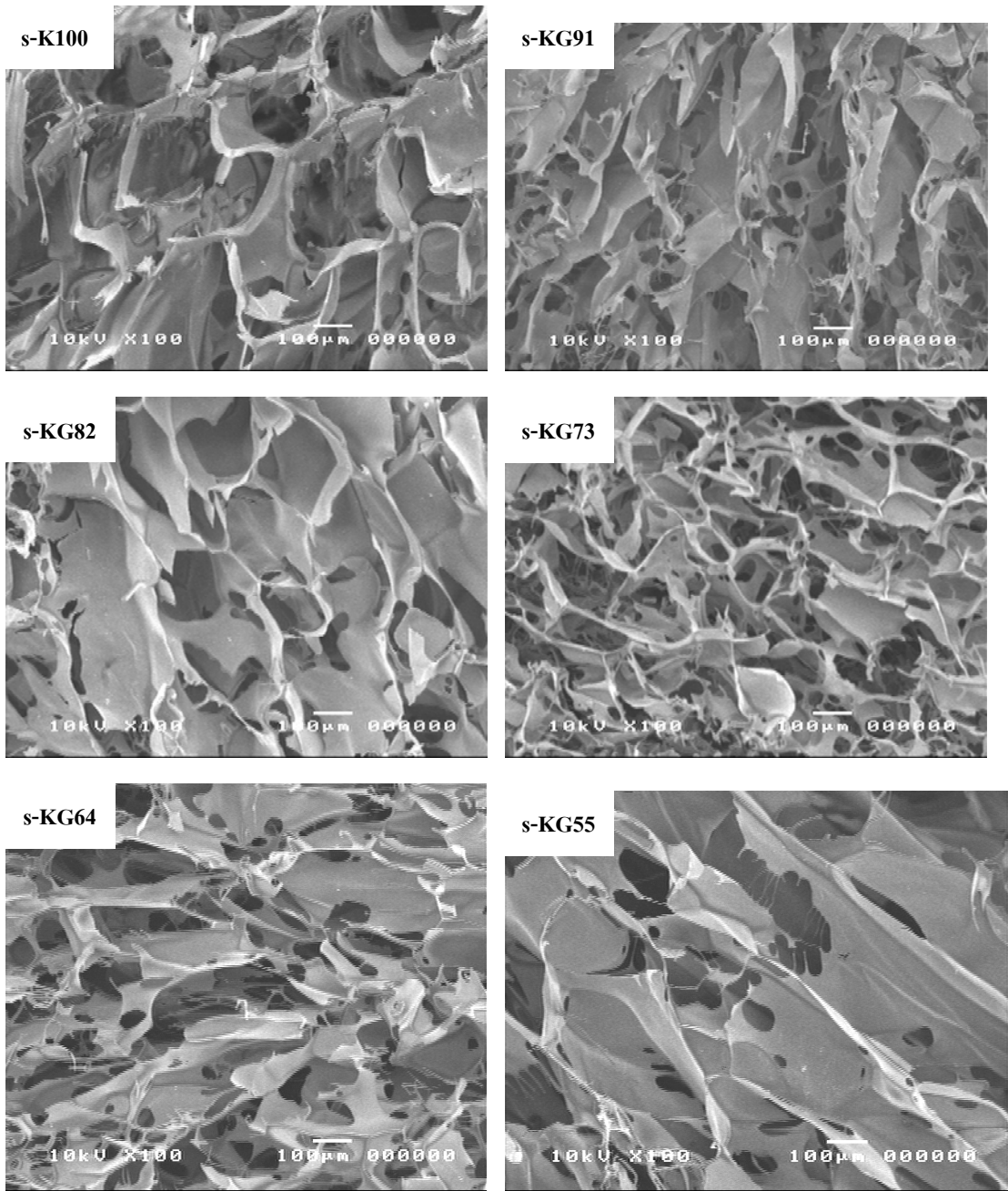
ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีความพรุนมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินเคราตินส่งผลต่อลักษณะผนังของโครงเลี้ยงเซลล์ ทำให้มีความเชื่อมโยงภายใน (interconnectivity) สูงกว่า ขนาดรูพรุนที่แตกต่างกันของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ น่าจะเกิดจากลักษณะของโครงสร้างของเคราตินที่กระจายตัวในน้ำ คือ โครงเลี้ยงเซลล์ K100, KG91, KG82 และ KG73 มีปริมาณเคราตินมาก สายพอลิเมอร์กระจายตัวในน้ำได้ดี เมื่อทำแห้งเยือกแข็ง ทำให้เกิดรูพรุนขนาดเล็ก ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ KG64 และ KG55 โครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะของเจลาคตินมากกว่า คือ อาจเกิดเจลระหว่างกระบวนการเย็นตัว ทำให้ได้ผนังของรูพรุนหนากว่า ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ s-K100, s-KG91 และ s-KG82 รูพรุนมีลักษณะคล้ายใบไม้ มีผนังที่ต่อเนื่องกันมากกว่า แสดงถึงโมเลกุลของน้ำที่เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มใหญ่ก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง นอกจากนี้ค่าประจุของสารส่งผลต่อลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยที่ค่า pH ในการเตรียมสารละลายเท่ากับ 8.1 เคราตินแสดงประจุลบ (ค่า pI ของเคราตินเท่ากับ 4.9 และ 6.1 [Alber, K.M., 1996]) และเจลาคตินแสดงประจุบวก (ค่า pI เท่ากับ 9) เมื่ออัตราส่วนเจลาคตินเพิ่มมากขึ้น เกิดการสร้างพันธะทางไฟฟ้าระหว่างประจุลบและบวกมากขึ้น อาจมีส่วนทำให้ผนังโครงเลี้ยงเซลล์หนาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้สมบัติการเข้ากันได้กับน้ำของเอส-ซัลโฟเคราตินอาจมีส่วนทำให้ลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์คล้ายกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาคตินซึ่งมีสมบัติการเข้ากันได้กับน้ำได้ดีเช่นกัน



KG82



รูปที่ 4.14 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน type A และ โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน type A อัตราส่วนเคราตินต่อเจลาติน (wt/wt) เท่ากับ 100/0 (K100), 90/10 (KG91), 80/20 (KG82), 70/30 (KG73), 60/40 (KG64), 50/50 (KG55) และ 0/100 (G100) โครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาณของแข็งรวมทั้งหมดเท่ากับ 0.8% โดยน้ำหนักที่กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.15 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเรติน และโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเรตินผสมเจลาติน type A อัตราส่วนเอส-ซัลโฟเรตินต่อเจลาติน (wt/wt) เท่ากับ 100/0 (s-K100), 90/10 (s-KG91), 80/20 (s-KG82), 70/30 (s-KG73), 60/40 (s-KG64) และ 50/50 (s-KG55) โครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาณของแข็งรวมทั้งหมดเท่ากับ 0.8% โดยน้ำหนัก ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เมื่ออัตราส่วนเจลาตินเพิ่มมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การหดตัวมีแนวโน้มลดลง ดังนั้นขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.3 ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินอัตราส่วน 70/30, 60/40 และ 50/50 มีขนาดรูพรุนสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การหดตัว แต่เมื่อพิจารณาที่อัตราส่วนอื่นๆ ขนาดรูพรุนไม่สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การหดตัว เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินซึ่งมีเปอร์เซ็นต์อัตราการหดตัวใกล้เคียงกันเมื่อผสมเจลาตินที่อัตราส่วนต่างๆ โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีเปอร์เซ็นต์การหดตัวสูงที่สุดควรมีขนาดรูพรุนเล็กที่สุด แต่เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.3 พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีขนาดรูพรุนใหญ่มากและเมื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การหดตัวเท่ากันแต่มีขนาดรูพรุนแตกต่างกันประมาณสองเท่า ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การหดตัวหลังจากการขึ้นรูปไม่น่าส่งผลต่อขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ อัตราส่วนของเคราตินต่อเจลาตินและเอส-ซัลโฟเคราตินต่อเจลาติน มีผลเป็นอย่างมากต่อรูปร่างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้

ตารางที่ 4.3 แสดงขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราติน เมื่อผสมเจลาตินที่อัตราส่วนต่างๆ

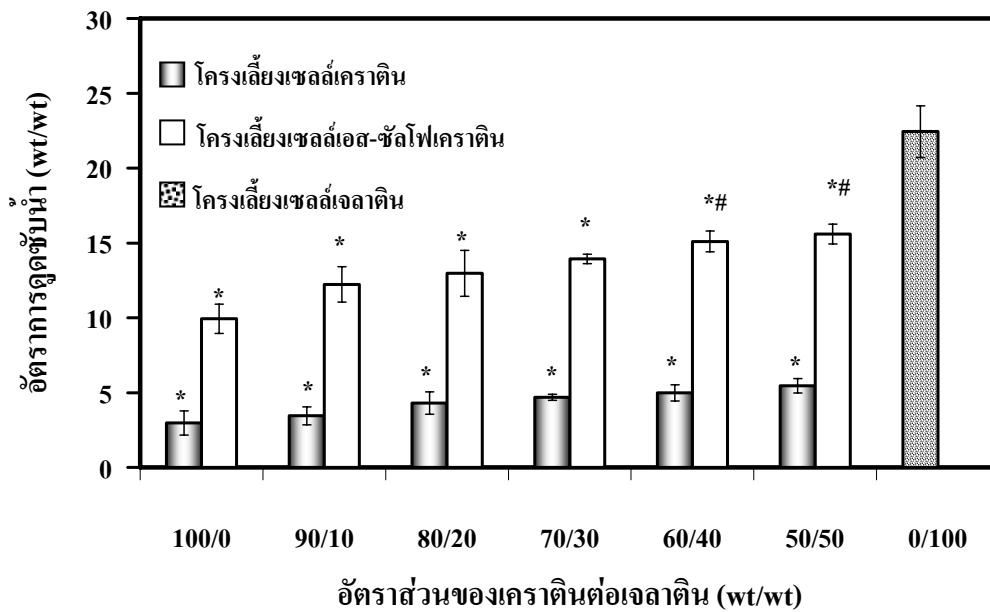
อัตราส่วนเคราตินต่อเจลาติน (wt/wt)	ขนาดรูพรุน (ไมโครเมตร)	
	โครงเลี้ยงเซลล์เคราติน	โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน
100/0	70±0.19 * <sup>δ</sup>	210±0.12 #
90/10	65±0.15 * <sup>δ</sup>	206±0.28 #
80/20	68±0.21 * <sup>δ</sup>	170±0.22 #
70/30	72±0.19 * <sup>δ</sup>	115±0.21 #
60/40	75±0.26 * <sup>δ</sup>	112±0.26 #
50/50	112±0.24 * <sup>δ</sup>	216± 0.20 #

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ \*, # และ δ แสดงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, p-value < 0.05 โดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน, โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินและเปรียบเทียบระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วนเดียวกัน



### 4.3.2 การดูดซับน้ำ

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100) เจลาติน (G100) และเคราตินผสมเจลาตินอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ อัตราส่วนเคราตินต่อเจลาติน (wt/wt) 90/10 (KG91), 80/20 (KG82), 70/30 (KG73), 60/40 (KG64) และ 50/50 (KG55) มาทดสอบสมบัติการดูดซับน้ำ พบว่า เมื่ออัตราส่วนของเจลาตินเพิ่มมากขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์สามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น เมื่อพิจารณาปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราติน อัตราส่วนเจลาตินเพิ่มมากขึ้นปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.2) เมื่อปริมาตรโครงเลี้ยงเซลล์มากขึ้นส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์สามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น พิจารณาเปอร์เซ็นต์การหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4.13) โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีเปอร์เซ็นต์การหดตัวมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน เมื่อเปอร์เซ็นต์การหดตัวมากทำให้ปริมาตรลดลง ส่งผลให้การดูดซับน้ำน้อยลง นอกจากนี้ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์อาจส่งผลต่อสมบัติการดูดซับน้ำด้วย โดยขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้นเมื่ออัตราส่วนเจลาตินมากขึ้น สมบัติการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (0/100) แสดงดังรูปที่ 4.16 โดยข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) แต่ไม่มีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100) โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีสมบัติการดูดซับน้ำเช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน คือ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเจลาติน ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ดูดซับน้ำได้มากขึ้น ดังรูปที่ 4.16 โดยโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินผสมกับเจลาตินอัตราส่วน (wt/wt) 60/40 และ 50/50 มีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญโดยเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน เมื่อพิจารณาสมบัติการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราติน พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีการดูดซับน้ำได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน 2-3 เท่า แต่เมื่อพิจารณาปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ (ตารางที่ 4.2) พบว่าปริมาตรของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน โดยอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นกรณีนี้สมบัติการดูดซับน้ำที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

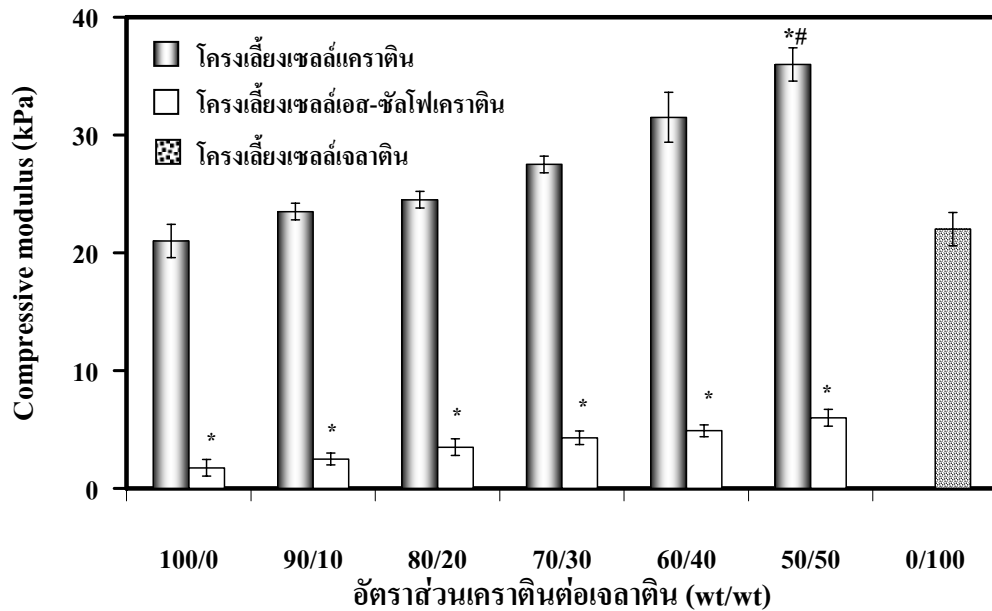


**รูปที่ 4.16** กราฟแสดงอัตราการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินผสมเจลาติน Type A (wt/wt) ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน โดยแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง [สัญลักษณ์ \*, # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบกับ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (0/100) และ โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน (100/0)]

#### 4.4 สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์

ค่า compressive modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเจลาตินมีค่าโดยเฉลี่ย 22 และ 24 kPa ตามลำดับ เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเจลาตินมากขึ้น ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีค่า compressive modulus เพิ่มมากขึ้น ความทนทานต่อแรงกดมากขึ้น ความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดการสร้างพันธะไฮออนิกระหว่างเคราตินและเจลาติน เนื่องจากการเตรียมสารละลายเท่ากับ 8.1 เคราตินมีค่า pI เท่ากับ 4.9 และ 6.1 จะมีประจุเป็นลบ ในขณะที่เจลาติน Type A มีค่า pI เท่ากับ 9 ดังนั้นในสารละลายนี้เจลาตินจึงมีประจุเป็นบวก [Tanabe, T. และคณะ, 2002] ประจุตรงข้ามกันทำให้สามารถเกิดการสร้างพันธะไฮออนิกอาจส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์แข็งแรงมากขึ้น โดยโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินอัตราส่วน 50/50 (KG55) มีค่า compressive modulus สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 35 kPa ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเจลาติน ดังรูปที่ 4.17 แนวโน้มของค่า compressive modulus เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่ออัตราส่วนเจลาตินมากขึ้น ซึ่งแสดงถึงความแข็งแรงของพันธะไฮออนิก ดังนั้นอาจลดปริมาณเคราตินที่ใช้ลงอีกได้ เนื่องจากน้ำหนัก

โมเลกุลของเคราตินต่ำกว่าเจลาตินมาก ทำให้สัดส่วนโดยน้ำหนักที่เคราตินสามารถสร้างพันธะกับเจลาตินพอดีได้คือปริมาณเจลาตินมากและปริมาณเคราตินน้อย

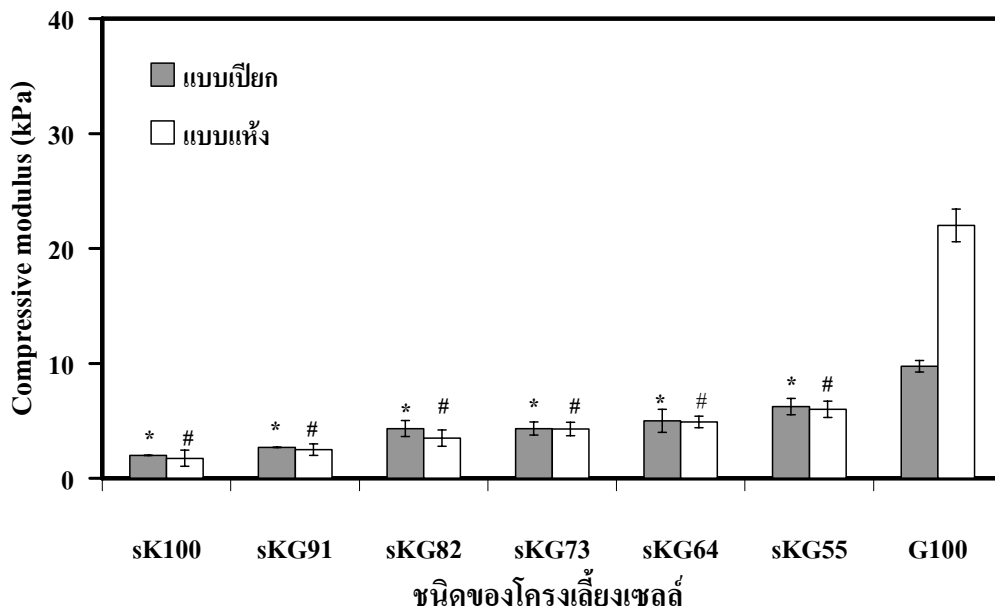


รูปที่ 4.17 กราฟเปรียบเทียบค่า Compressive modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราติน เมื่อผสมกับเจลาติน Type A (แบบแห้ง) ที่อัตราส่วนต่างๆ (สัญลักษณ์ \* และ # แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (0/100) และโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (100/0) ตามลำดับ)

ความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน เมื่อผสมกับเจลาติน ผลการทดลองมีแนวโน้มเช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน คือ เมื่อเพิ่มปริมาณเจลาตินมากขึ้น ความทนทานต่อแรงกดมีค่ามากขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น โดยข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน (s-K100) ดังรูปที่ 4.17 เมื่อเปรียบเทียบความทนทานต่อแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราติน พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีค่า compressive modulus มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน อาจเนื่องจากขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินซึ่งมีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินถึงสองเท่า ส่งผลให้ยุบตัวได้ง่ายเมื่อถูกแรงกด

การทดสอบความทนทานต่อแรงกดในสภาวะเปียก โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์มาแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ส่วนเกินออกและนำไปทดสอบความทนทานต่อแรงกด กรณีโครง

เคื่องเคลล์เอส-ซัลไฟเคราดีน พบว่า ค่า compressive modulus มีแนวโนม้เช่นเดีวกับการทดสอบ ในสภาวะแห้ง กล่าวคือ เมื่ออัตราส่วนเจลาดีนเพิ่มขึ้น ค่า compressive modulus มีค่ามากขึ้น ดังรูป ที่ 4.18 เมื่อเปรียบเทียบค่า compressive modulus ในสภาวะเปียกและแห้ง พบว่า ค่า compressive modulus มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยค่า compressive modulus ในสภาวะเปียกมีค่าสูงกว่าใน สภาวะแห้ง เนื่องจากในสภาวะเปียก โครงเคื่องเคลล์อ้อมตัวไปดว้ยน้ำ ทำให้มีแรงดันจากน้ำ ส่งผล ให้ค่า compressive modulus มีค่าสูงกว่าในกรณีสภาวะแห้ง สำหรับโครงเคื่องเคลล์เคราดีนไม่ สามารถวัดค่า compressive modulus ในสภาวะเปียกได้เช่น โครงเคื่องเคลล์เอส-ซัลไฟเคราดีน เนื่องจากโครงเคื่องเคลล์เคราดีนมีโครงสร้างเป็นแบบเส้นใยมากกว่าโครงเคื่องเคลล์เอส-ซัลไฟเครา ดีน เมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ โครงเคื่องเคลล์ค่อนข้างแบน แผ่นเป็นเส้นใย เมื่อนำไป ทดสอบวัดค่า compressive modulus ไม่สามารถกดแรงและวัดค่าได้ สำหรับโครงเคื่องเคลล์เอส- ซัลไฟเคราดีนมีโครงสร้างที่แข็งแรงกว่าเคราดีนในสภาวะเปียก เมื่อพิจารณาปริมาตรของโครงเคื่อง เคลล์เอส-ซัลไฟเคราดีนเปรียบเทียบกับโครงเคื่องเคลล์เคราดีน (ตารางที่ 4.1) พบว่าปริมาตรของ โครงเคื่องเคลล์เอส-ซัลไฟเคราดีนผสมเจลาดีนมีค่ามากกว่าโครงเคื่องเคลล์เคราดีนผสมเจลาดีน เพียงเล็กน้อยปริมาตรของโครงเคื่องเคลล์อาจส่งผลต่อความแข็งแรงของโครงเคื่องเคลล์ นอกจากนี้ สมบัติการเข้ากัน ได้กับน้ำอาจมีผลต่อความทนทานต่อแรงกดในสภาวะเปียก หลังจากผ่าน กระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง เคราดีนมีการสร้างพันธะไคซัลไฟด์ใหม่อีกครั้ง ทำให้ไม่สามารถ ละลายในน้ำได้ ส่วนเอส-ซัลไฟเคราดีนมีสมบัติการเข้ากัน ได้กับน้ำได้ดีกว่าเคราดีน โดยพิจารณา จากรูป SEM (รูปที่ 4.15) พบว่าโครงสร้างของโครงเคื่องเคลล์เอส-ซัลไฟเคราดีนมีความเป็นเนื้อ เดีวกันกับเจลาดีน ลักษณะรูพรุนคล้ายกับโครงเคื่องเคลล์เจลาดีนอย่างเห็นได้ชัด อาจมีส่วนในการ ดูดซับน้ำได้มากเช่นเดีวกับเจลาดีน นอกจากนี้โครงเคื่องเคลล์เอส-ซัลไฟเคราดีนสามารถดูดซับน้ำ ได้มากกว่าโครงเคื่องเคลล์เคราดีน อาจเนื่องจากขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่าโครงเคื่องเคลล์เคราดีน



รูปที่ 4.18 กราฟเปรียบเทียบค่า Compressive modulus แบบเปียกและแบบแห้งของโครงเลี้ยงเซลล์ ซัลโฟเคราตินผสมกับเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่างๆ (\* และ # แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) เมื่อวัดค่า Compressive modulus แบบเปียกและแบบแห้ง ตามลำดับ)

#### 4.5 สมบัติทางชีววิทยา

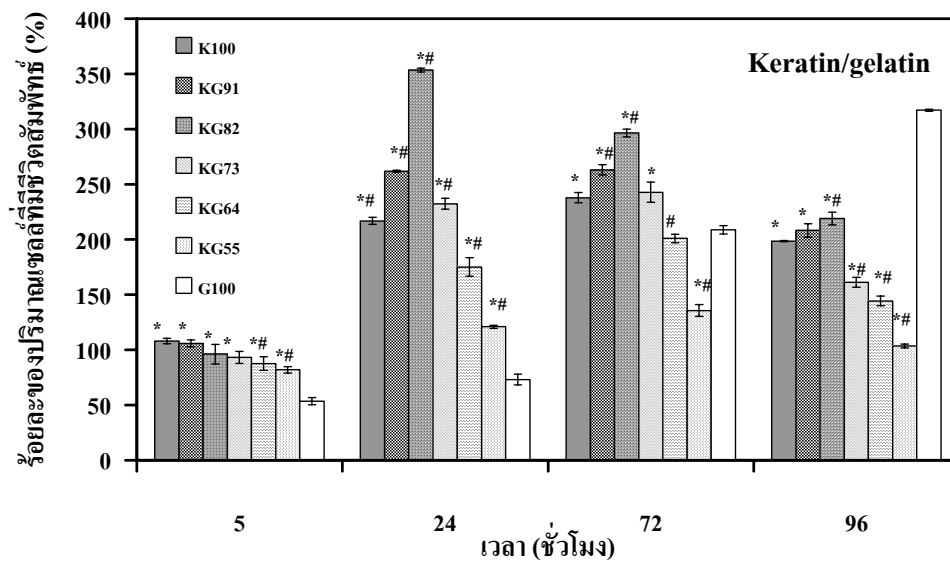
##### 4.5.1 ความเข้ากันได้กับเซลล์ในสถานะเลียนแบบร่างกาย (*In vitro* biocompatibility)

เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วนต่างๆ ทดสอบเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่ระยะเวลา 5, 24, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังจากการเพาะเซลล์ เพื่อประเมินความสามารถในการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงดังรูปที่ 4.19 โดยการทดสอบการเข้ากันได้กับเซลล์พิจารณาจากร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์คำนวณได้จาก

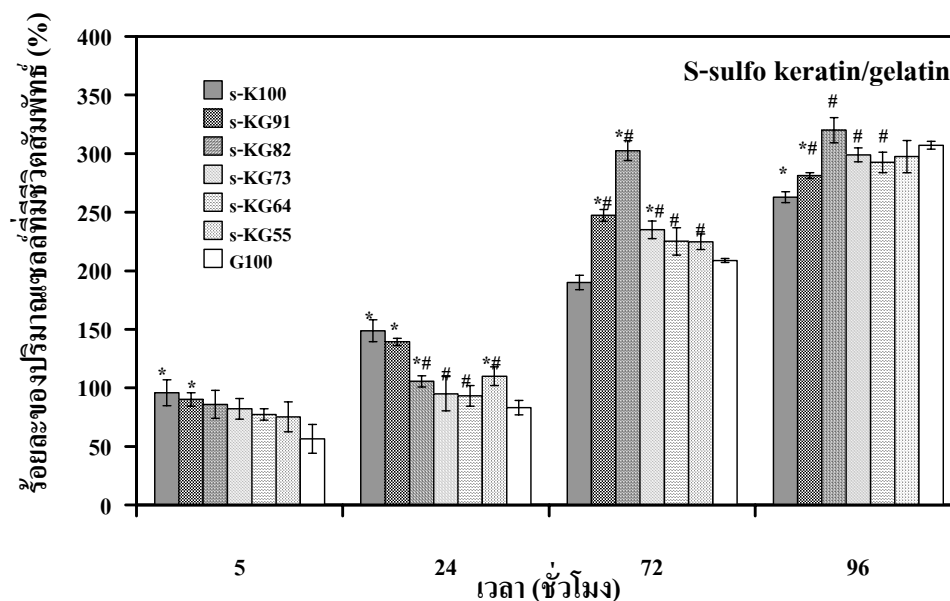
$$\text{ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ณ เวลาใด ๆ}}{\text{จำนวนเซลล์ที่เพาะใน โครงเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น}} \times 100 \%$$

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยใช้ MTT method โดยเซลล์ที่มีชีวิตไม่ไดคอนเดรีจะทำงานและปล่อยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งทำปฏิกิริยากับสาร MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] เกิดเป็นผลิตภัณฑ์น้ำเงินเข้ม โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเป็นส่วนโดยตรงกับผลึกฟอรัมาซานที่เกิดขึ้น [Tour, U. และคณะ, 1999]

พิจารณาร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสหลังจากการเพาะเซลล์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100) มีร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสสูงสุด เมื่ออัตราส่วนของเจลาตินมากขึ้น ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสลดลง แสดงถึงเซลล์สามารถยึดเกาะที่โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินได้ดีกว่าเจลาติน เนื่องจากเคราตินมีลำดับกรดอะมิโน RGD (-Arg-Gly-Asp-Ser-) และ LDV (-Leu-Gly-Val-) ที่เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี [Yamauchi, K. และคณะ, 2003] เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสมีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเพิ่มขึ้น 2 เท่าจากที่เวลา 5 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Tachibana, A. และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ซึ่งเลี้ยงเซลล์ด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินที่ดัดแปลงหมู่ SH ของเคราตินด้วยกรดไอโอโดอะซิติก พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงมีร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสเพิ่มเพียง 1.6 เท่าเท่านั้น [Tachibana, A. และคณะ, 2002] และโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินอัตราส่วน 80/20 (wt/wt) หรือ KG82 มีร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสสูงสุด ที่เวลา 72 ชั่วโมง และที่ 96 ชั่วโมง ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสลดลง และโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 มีร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสสูงสุด ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสที่ลดลง อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อพิจารณาลักษณะพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินหลังจากการเพาะเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อระยะเวลาผ่านไป ลักษณะพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีสภาพเปื่อยยุ่ยมากขึ้น พิจารณาผลการทดสอบการเข้ากันได้ของเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงถึงมีจำนวนเซลล์มากและอาจปล่อยเอนไซม์หรือของเสียต่างๆ ออกมาทำลายโครงเลี้ยงเซลล์ ส่งผลให้ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมผัสลดลง และเมื่อพิจารณาจากภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินหลังจากทดสอบการเลี้ยงเซลล์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีขนาดเล็กและมีลักษณะเปื่อยยุ่ยมากขึ้น ดังรูปที่ 4.21 และ 4.22



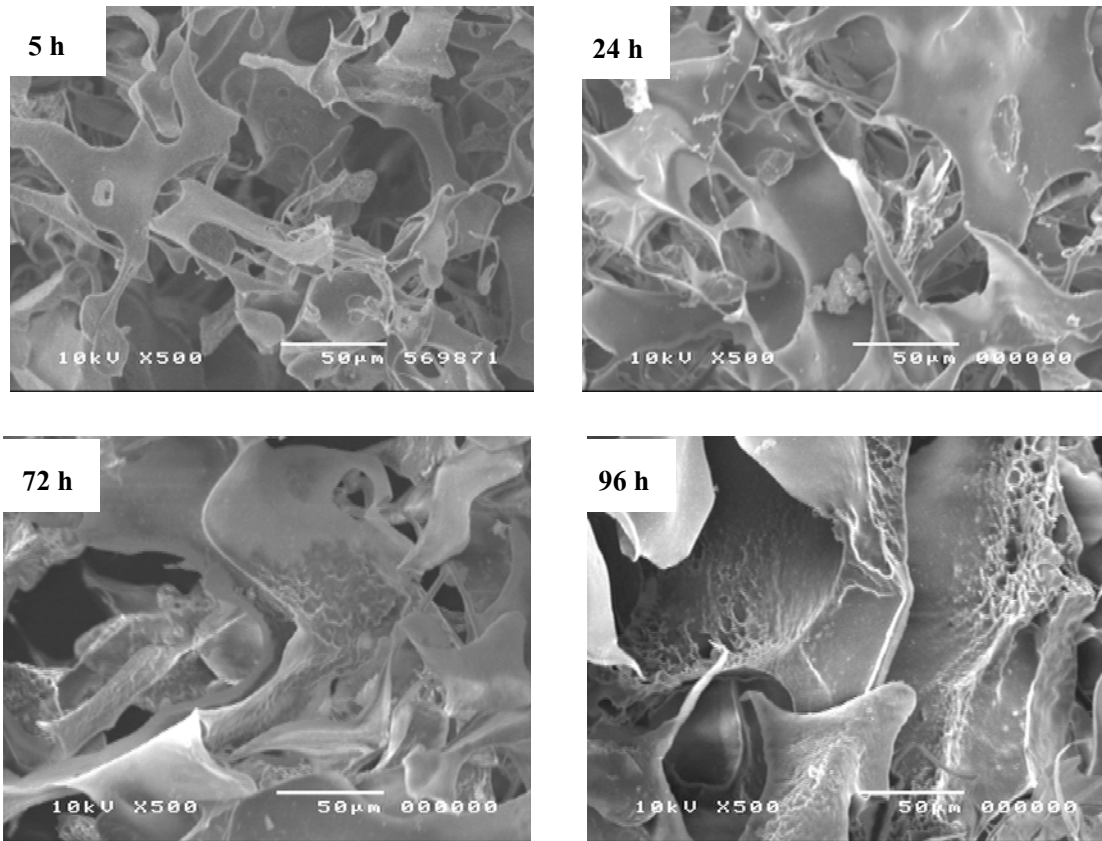
รูปที่ 4.19 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่มีชีวิตสัมพันธ์ เมื่อทดสอบด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน โดยจำนวนเซลล์ที่เพาะในโครงเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 20,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ (สัญลักษณ์ \* และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ G100 และโครงเลี้ยงเซลล์ K100 ตามลำดับ)



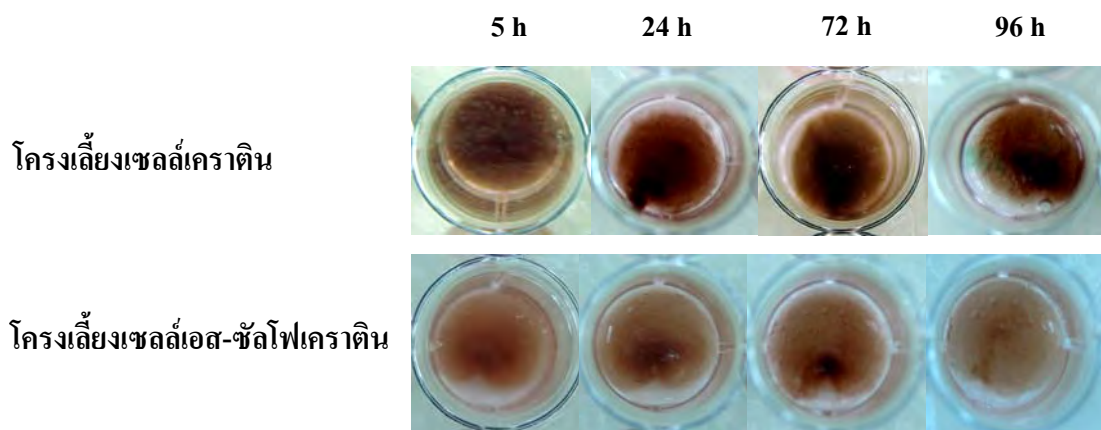
รูปที่ 4.20 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่มีชีวิตสัมพันธ์ เมื่อทดสอบด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินผสมเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน โดยจำนวนเซลล์ที่ใส่ในโครงเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 20,000 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์ (สัญลักษณ์ \* และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) และโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100) ตามลำดับ)

การทดสอบเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast ด้วยโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินผสมเจลาติน type A แสดงดังรูปที่ 4.20 เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเซลล์พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน (s-K100) เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดีที่สุด และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเจลาตินการยึดเกาะของเซลล์มีค่าลดลง เช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน ที่เวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์เพิ่มมากขึ้น โดยโครงเลี้ยงเซลล์ s-K100 ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์สูงสุด ที่เวลา 72 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์ s-KG82 มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุด โดยข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ s-K100 และโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดอื่นๆ มีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์เพิ่มขึ้นจากที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดมีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์เพิ่มมากขึ้น และโครงเลี้ยงเซลล์ s-KG82 มีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์สูงสุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน เมื่อเปรียบเทียบริ้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์ระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน พบว่ามีแนวโน้มสวนทางกัน โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง แต่มีค่าลดลงที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ G100 และโครงเลี้ยงเซลล์ s-KG ที่อัตราส่วนต่างๆ ค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และมีค่าสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์เพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป อาจเนื่องจากโครงสร้างของเอส-ซัลโฟเคราตินที่มีความแข็งแรงมากกว่าเคราติน เมื่อพิจารณารูปที่ 4.22 เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากการทดสอบเลี้ยงเซลล์พบว่าลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินยังคงเหมือนเดิม ไม่เห็นลักษณะเปื่อยยุ่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Katoh, K. และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งเลี้ยงเซลล์ L929 บนแผ่นฟิล์มเอส-ซัลโฟเคราติน ซึ่งร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์ที่เวลา 96 ชั่วโมงเพิ่มขึ้นเป็น 6.7 เท่า สำหรับงานวิจัยนี้ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพันธ์เพิ่มขึ้น 2.6 เท่า แต่เนื่องจากงานวิจัยของ Katoh ใช้ปริมาณเคราตินสูงถึง 10% wt ในขณะที่งานวิจัยนี้ใช้เคราตินน้อยกว่าประมาณ 10 เท่า (0.8% wt) แต่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีรูปร่างเป็นสามมิติ ทำให้มีพื้นที่ให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟิล์ม [Katoh, K. และคณะ 2004]





รูปที่ 4.21 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน เมื่อทดสอบการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่ระยะเวลาต่างๆ ที่กำลังขยาย 500 เท่า



รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100) และเอส-ซัลโฟเคราติน (s-K100) หลังจากทดสอบการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมเท่ากับ 1.7 มิลลิเมตร)

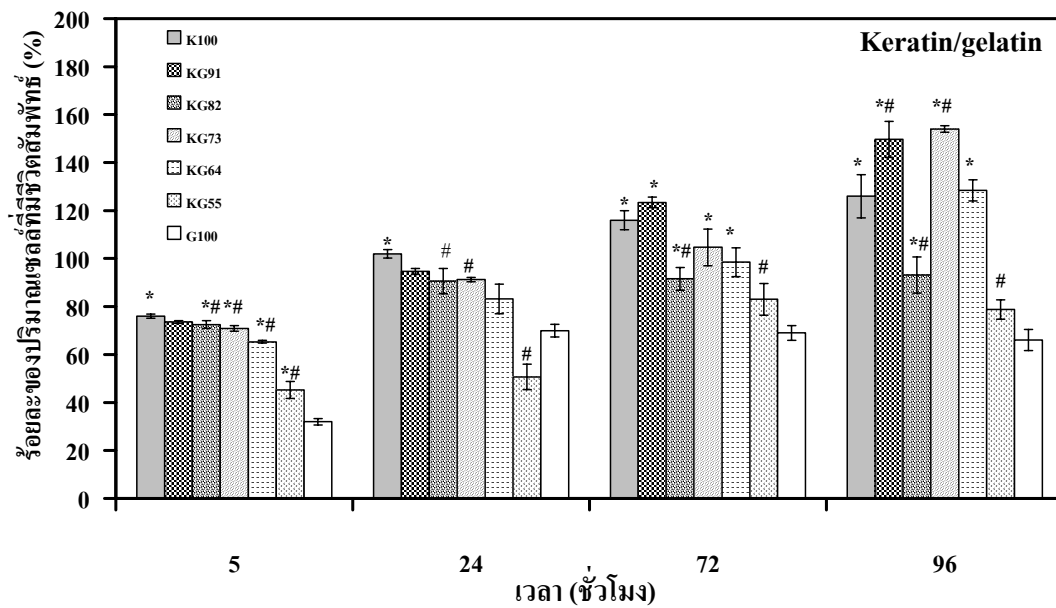
ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมงและเวลาที่เซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_D$ ) ในโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินเมื่อผสมเจลาตินที่อัตราส่วนต่าง ๆ โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเคราตินเป็นองค์ประกอบมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 16,000-40,000 เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ KG55 มีปริมาณที่มีชีวิตเซลล์ต่ำที่สุด (16,688 เซลล์) และโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (41,188 เซลล์) โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเอส-ซัลโฟเคราตินเป็นองค์ประกอบมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 52,000-64,000 เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์ s-K100 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตต่ำที่สุด (52,563 เซลล์) โครงเลี้ยงเซลล์ s-KG82 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (64,000 เซลล์) โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 61,430 เซลล์ ซึ่งมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 แต่น้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ s-KG82 เมื่อพิจารณาค่า doubling time พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเคราตินเป็นองค์ประกอบมีค่า doubling time สั้นกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเอส-ซัลโฟเคราตินเป็นองค์ประกอบและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน เซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเคราตินเป็นองค์ประกอบใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นสองเท่า น้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเอส-ซัลโฟเคราตินเป็นองค์ประกอบและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน โครงเลี้ยงเซลล์ KG55 ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นและเริ่มลดลงที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง ไม่สามารถพิจารณาค่า doubling time ได้ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่มีชีวิตที่เวลา 96 ชั่วโมงและค่า Doubling time ในโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดโครงเลี้ยงเซลล์	ปริมาณเซลล์สูงสุด	Doubling time (ชั่วโมง)
K100	39,688	23.9
KG91	38,438	18.0
KG82	41,188	12.1
KG73	26,250	17.8
KG64	22,875	24.0
KG55	16,688	-
s-K100	52,563	73.0
s-KG91	56,246	48.0
s-KG82	64,000	40.0
s-KG73	59,800	48.7
s-KG64	58,500	46.1
s-KG55	59,483	41.1
G100	61,438	48.1

นอกจากการนำโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน type A ทดสอบเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ L929 mouse fibroblast แล้ว ยังนำโครงเลี้ยงเซลล์เหล่านั้นไปทดสอบการเลี้ยงเซลล์ mesenchymal stem cells (MSC) ซึ่งถือเป็นงานวิจัยแรกที่ใช้เคราตินที่สกัดจากเส้นผมในการเลี้ยง mesenchymal stem cells โดย MSC เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกออกมาจากไขกระดูกของ Wistar rat เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ (รูปที่ 4.23) พบว่าที่เวลา 5 ชั่วโมงหลังจากการเพาะเซลล์ลงในโครงเลี้ยงเซลล์ เซลล์สามารถยึดเกาะโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน เนื่องจากเคราตินประกอบด้วยหมู่ -SH และลำดับกรดอะมิโน RGD-peptide และ LDV (-Leu-Gly-Val-) [Yamauchi, K. และคณะ, 2003] เป็นหมู่ที่ช่วยให้ MSC สามารถยึดเกาะได้ดี [Curran, J.M., และคณะ, 2006] อัตราส่วนของเจลาตินมีผลต่อความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ เมื่ออัตราส่วนของเจลาตินต่อเคราตินมากขึ้น ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพัทธ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพัทธ์มากขึ้น โดยโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพัทธ์สูงสุด และโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสม

เจลาตินที่อัตราส่วน 50/50 wt/wt (KG55) มีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพัทธ์ต่ำที่สุด ที่เวลา 72 ชั่วโมง โคร่งเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วน 90/10 wt/wt (KG91) มีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพัทธ์สูงที่สุด แต่ที่เวลา 96 ชั่วโมง โคร่งเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วน 70/30 wt/wt (KG73) มีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพัทธ์สูงที่สุด โดยมีค่าประมาณ 150% ในขณะที่โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีค่าร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสัมพัทธ์ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.23 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณเซลล์ Bone marrow derived mesenchymal stem cells ที่มีชีวิตสัมพัทธ์ เมื่อทดสอบด้วยโคร่งเลี้ยงเซลล์เคราตินและโคร่งเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน Type A ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน โดยจำนวนเซลล์ที่ได้ในโคร่งเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 20,000 เซลล์/โคร่งเลี้ยงเซลล์ (สัญลักษณ์ \* และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบกับโคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) และโคร่งเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100) ตามลำดับ)

พิจารณาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5) โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตต่ำที่สุดเท่ากับ 13,200 เซลล์ โคร่งเลี้ยงเซลล์ KG73 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 30,800 เซลล์ โดยมีค่า doubling time เท่ากับ 89.9 ชั่วโมง

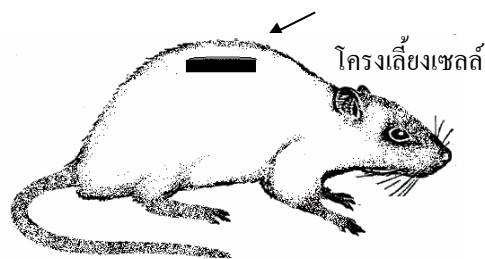
ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณเซลล์ Mesenchymal stem cell (MSC) ที่มีชีวิตที่เวลา 96 ชั่วโมงและค่า Doubling time ในโคร่งเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดโคร่งเลี้ยงเซลล์	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด
K100	25,200
KG91	29,938
KG82	18,620
KG73	30,800
KG64	25,688
KG55	15,750
G100	13,200

เคราตินและเอส-ซัลโฟเคราตินส่งผลต่อการยึดเกาะของเซลล์บนโคร่งเลี้ยงเซลล์ คือช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้อย่างรวดเร็ว และเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนบนโคร่งเลี้ยงเซลล์เคราตินได้รวดเร็วกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ L929 mouse fibroblast และเซลล์ mesenchymal stem cell (MSC) พบว่าเซลล์ L929 และ MSC สามารถยึดเกาะบนโคร่งเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ใกล้เคียงกัน แต่เซลล์ L929 สามารถเจริญเติบโตบนโคร่งเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ดีกว่าเซลล์ MSC อาจเนื่องจากเซลล์ MSC เป็นเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้ เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ ส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างช้า ๆ

#### 4.5.2 การเข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกาย (*In vivo* biocompatibility)

การทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ในร่างกาย โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) และโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วน 80/20 (KG82) และ 50/50 wt/wt (KG55) เนื่องจากเมื่อทดสอบผลการเข้ากันได้กับเซลล์ภายในสภาวะเลียนแบบร่างกาย KG82 มีผลการทดสอบดีที่สุดแต่สมบัติเชิงกลของ KG82 ยังไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจเลือก KG55 อีกตัวอย่างซึ่งมีสมบัติเชิงกลดีที่สุด โดยผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลและล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จากนั้นฝังใต้แผ่นหลังของ Wistar rat เพศเมีย อายุ 5 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.24

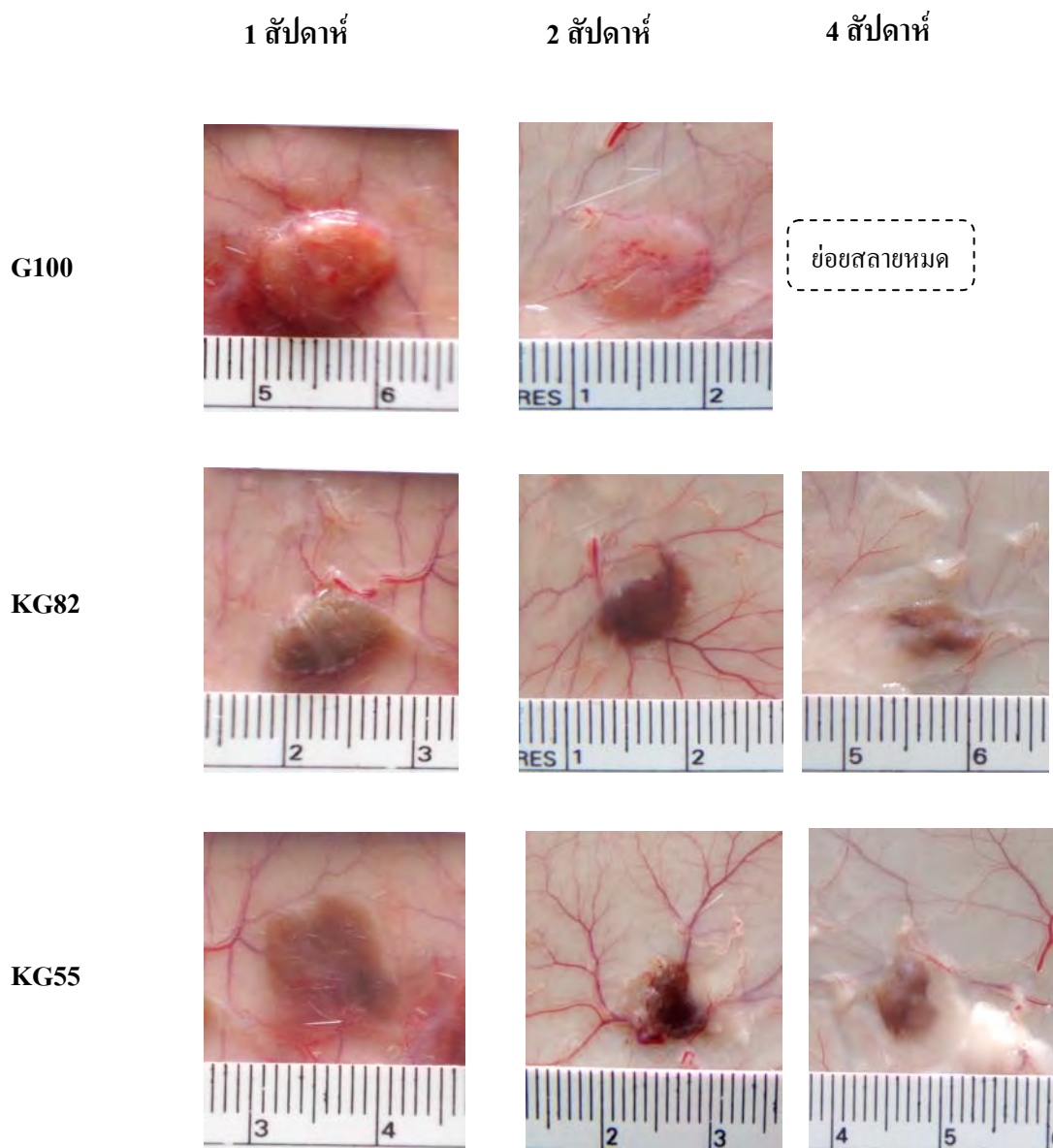


รูปที่ 4.24 แสดงการฝังโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ใต้แผ่นหลังของ Wistar rat

ลักษณะโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อฝังบริเวณใต้แผ่นหลังของหนูที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ได้ผลดังรูปที่ 4.25 พิจารณาที่เวลา 1 สัปดาห์ โครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดก่อให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนังของหนู สังเกตจากผิวหนังของหนูมีสีแดงและมีลักษณะบวมเกิดขึ้นบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเกิดอาการบวมแดงและการสร้างพังผืดหุ้มโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน(KG82 และ KG55) พังผืดที่เกิดที่โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินซึ่งเป็นปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมของร่างกายโดยธรรมชาติ เนื้อเยื่อพังผืดที่หุ้มรอบโครงเลี้ยงเซลล์นี้อาจทำให้เกิดการจำกัดในการถ่ายเทมวลสารเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ ทำให้เซลล์ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้รับอาหารและปัจจัยต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเคลื่อนที่เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์น้อยลง และที่เวลา 2 สัปดาห์ ผิวหนังของหนูอาการอักเสบลดลง และเริ่มมีเส้นเลือดมาเลี้ยงบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 และ KG55 มีเส้นเลือดแดงขนาดใหญ่เข้ามาหล่อเลี้ยง ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ G100 พบเส้นเลือดน้อยกว่าและมีขนาดเล็กลงและยังพบพังผืดบางหุ้มโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินอยู่ เมื่อพิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ KG55 พบพังผืดสีขาวอยู่รอบโครงเลี้ยงเซลล์บ้างแต่สามารถลอกออกได้ และที่เวลา 4 สัปดาห์ พบพังผืดสีขาวอยู่รอบโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 และ KG55 เมื่อพิจารณาการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อระยะเวลาผ่านไปโครงเลี้ยงเซลล์เกิดการย่อยสลายมากขึ้น ขนาดของโครงเลี้ยงเซลล์เล็กลง โดยที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินย่อยสลายหมดไป ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ KG82 และ KG55 ยังคงเหลือชิ้นโครงเลี้ยงเซลล์อยู่เล็กน้อย จะเห็นว่า

โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินจะมีค่า Compressive modulus มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดอื่นๆ แต่อัตราการย่อยสลายภายในร่างกายสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเคราตินเป็นองค์ประกอบ

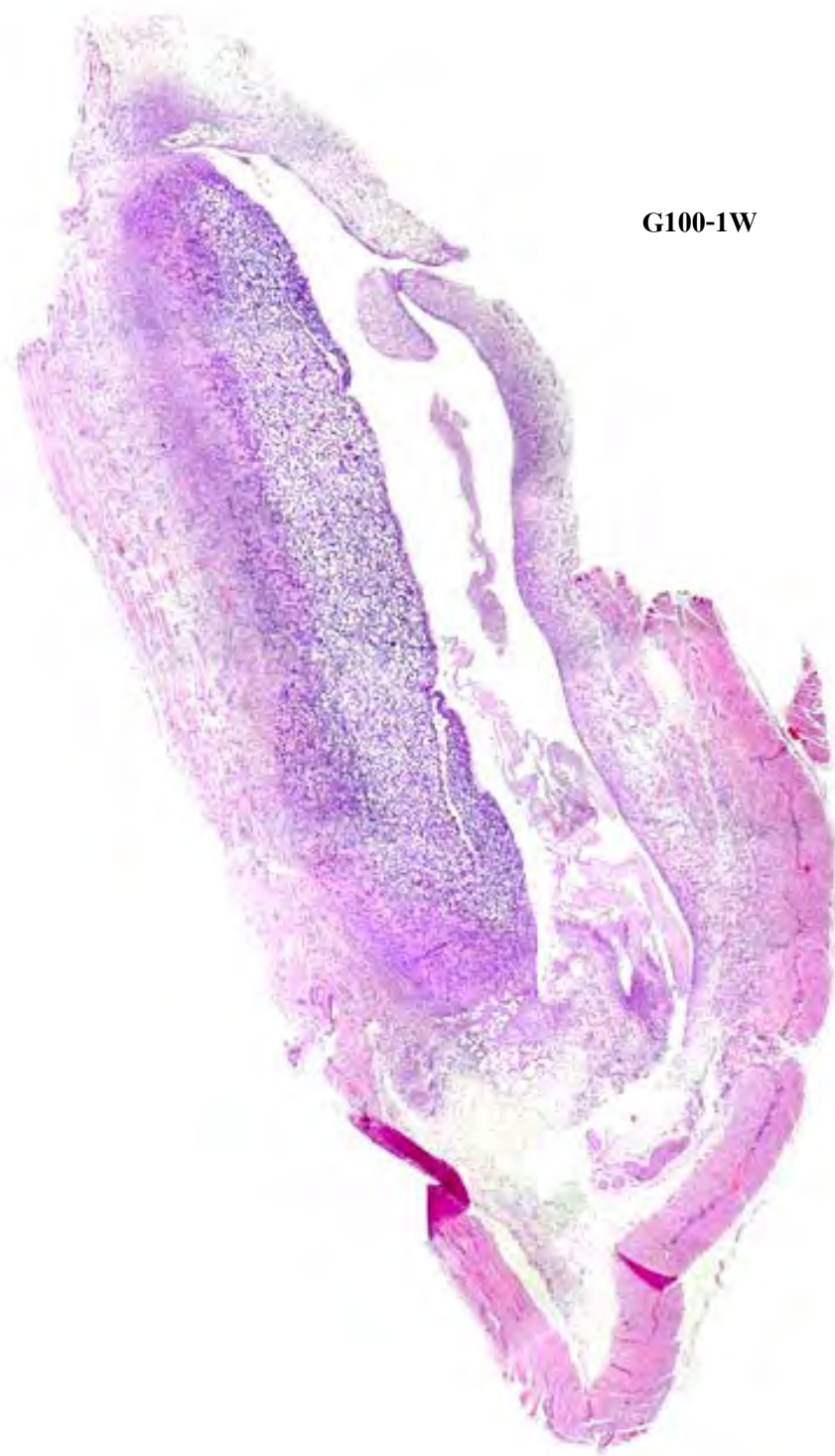
เมื่อทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคการย้อมสีแบบ H&E ในสัปดาห์ที่ 1-4 โครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดพบเซลล์ macrophage ซึ่งสังเกตุจากเซลล์กลมขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียสหลายนิวเคลียสหลายนิวเคลียส (multinucleated cell) ย้อมติดสีน้ำเงินซึ่งมีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมถือเป็นภาวะปกติเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เซลล์ชนิดนี้จะเข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ในช่วงแรกและเมื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมหมดจะไม่พบเซลล์ชนิดนี้อีก แต่ในสัปดาห์ที่ 4 ยังคงพบเซลล์นี้ในโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 และ KG55 ซึ่งอาจแสดงถึงอาการติดเชื้อเรื้อรังเนื่องจากการฆ่าเชื้อที่ไม่เพียงพอ ในโครงเลี้ยงเซลล์ KG55 พบลักษณะคล้ายเลือดซึ่งอาจเกิดจาก 2 สาเหตุคือ เกิดจากขั้นตอนการฟุ้งชิ้นงานในสัตว์ทดลอง เกิดบาดแผลภายในตัวสัตว์ทดลองทำให้เลือดออกและพบเซลล์ Hemo-Siderin-Laden ซึ่งมีหน้าที่เก็บกินเม็ดเลือดที่ออกมาบริเวณปลูกถ่าย หรืออาจเกิดจากสารเคมีที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ทำให้เส้นเลือดในตัวสัตว์ทดลองแตกออกหรือมีการแตกเลือดเกิดขึ้นเมื่อพิจารณาการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ ที่สัปดาห์ที่ 1 โครงเลี้ยงเซลล์ KG82 (รูปที่ 4.31, 4.40-4.42) เซลล์สามารถเข้ามาภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างทั่วถึง มีเส้นเลือดงอกใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงโครงเลี้ยงเซลล์และมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่ ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ G100 ในสัปดาห์แรก (รูปที่ 4.26, 4.34-4.36) เซลล์สามารถเข้ามาถึงด้านในของโครงเลี้ยงเซลล์เพียงเล็กน้อยและพบการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่เพียงเล็กน้อยแต่ยังคงมีเส้นเลือดเข้ามาหล่อเลี้ยงโครงเลี้ยงเซลล์ และโครงเลี้ยงเซลล์ KG55 (รูปที่ 4.28, 4.37-4.39) เซลล์สามารถเข้ามาภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างทั่วถึงเช่นเดียวกับโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่เล็กน้อยแต่ไม่พบเส้นเลือด ที่เวลา 2 สัปดาห์ โครงเลี้ยงเซลล์มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้นทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์และมีเส้นเลือดเล็กๆ เกิดขึ้นใหม่เพิ่มมากขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์ G100 มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่เช่นเดียวกันแต่น้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 และโครงเลี้ยงเซลล์ KG55 ไม่พบเส้นเลือดที่เข้ามาหล่อเลี้ยงหรือเกิดขึ้นใหม่แต่มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่ ที่เวลา 4 สัปดาห์โครงเลี้ยงเซลล์ G100 เกิดการย่อยสลายหมด โครงเลี้ยงเซลล์ KG82 มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้นอีกและส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์เริ่มน้อยลง (สีชมพูเข้ม) เนื่องจากเกิดการย่อยสลาย พิจารณาโครงเลี้ยงเซลล์ KG55 เหลือส่วนที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์น้อยกว่า KG82 แสดงว่า KG55 ย่อยสลายเร็วกว่า KG82 และพบเส้นใยคอลลาเจนใหม่ซึ่งมีสีชมพูบริเวณด้านนอก จากการตรวจสอบเนื้อเยื่อนี้แสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์ KG82 มีสมบัติการเข้ากันได้กับเซลล์ภายในร่างกายได้ดีที่สุด มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่อย่างรวดเร็วและมีอัตราการย่อยสลายช้ากว่าโครงเลี้ยงเซลล์อื่นๆ รูปภาพโครงเลี้ยงเซลล์แสดงดังรูปที่ 4.26-4.42



ย่อยสลายหมด

รูปที่ 4.25 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) และโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน type A ที่อัตราส่วน 80/20 (KG82) และ 50/50 wt/wt (KG55) หลังจากฝังได้ผ่านหลัง Wistar rat อายุ 5 สัปดาห์ ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์





รูปที่ 4.26 โครงสร้างเซลล์เจลาติน (G100) หลังจากการฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

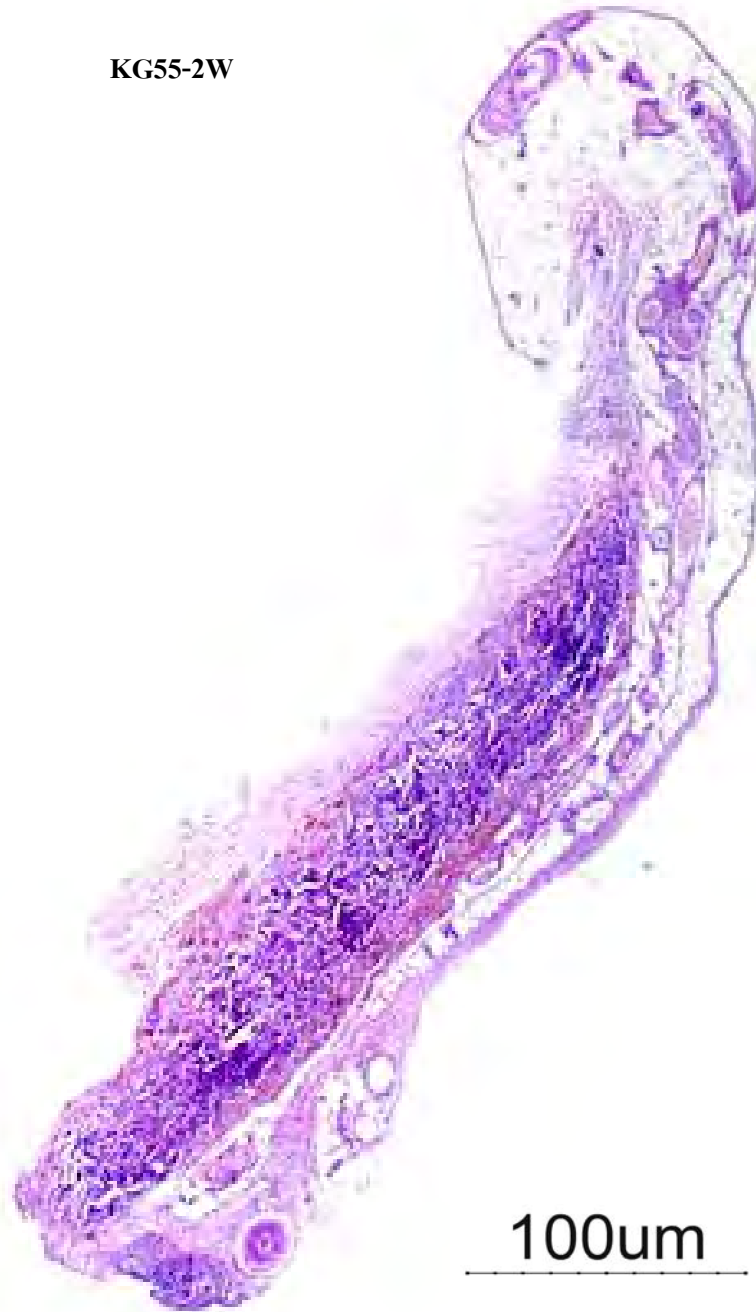


รูปที่ 4.27 โคร่งเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) หลังจากการฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนูที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E



รูปที่ 4.28 โครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (KG55) หลังจากการฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

KG55-2W



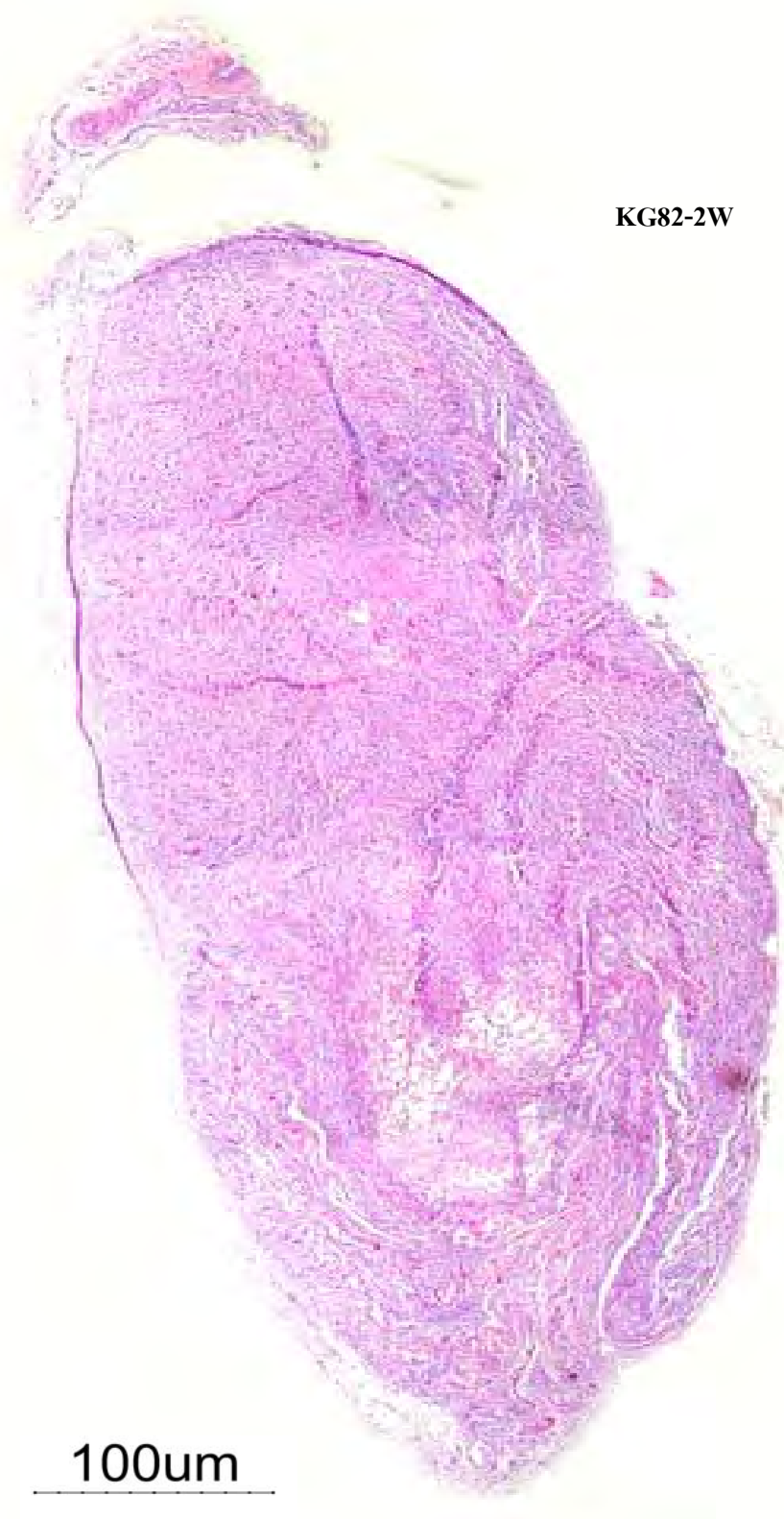
รูปที่ 4.29 โครงเลียงเซลล์เคราติน (KG55) หลังจากการฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E



รูปที่ 4.30 โคร่งเลี้ยงเซลล์เคราติน (KG55) หลังจากการฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E



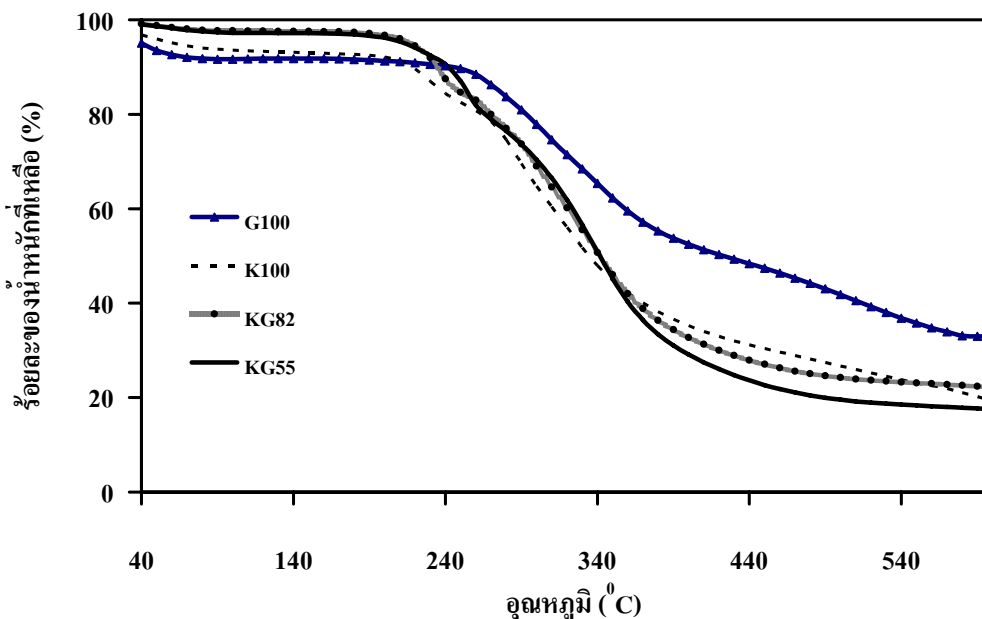
รูปที่ 4.31 โครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (KG82) หลังจากการฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E



รูปที่ 4.32 โครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (KG82) หลังจากการฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยผ่านการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

#### 4.6 การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกาย (*in vivo* biodegradability)

พิจารณา ค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนนำไปทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายในร่างกายสัตว์ทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.43 โดยวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวที่เปลี่ยนไปด้วยเครื่อง Thermalgravimetric Analysis (TGA)



รูปที่ 4.43 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวด้วยเครื่อง TGA ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราติน (K100), เจลาติน (G100), เคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วน 80/20wt/wt (KG82) และอัตราส่วน 50/50wt/wt (KG55) 0.8% total solid weight ก่อนการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ

จากผลการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดยคิดจากวิธี on set (ภาคผนวก ข) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีค่าอุณหภูมิการสลายตัวสูงที่สุด คือ 260 °C และโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีค่าอุณหภูมิการสลายตัวเท่ากับ 240 °C และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเจลาติน ค่าอุณหภูมิในการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้น อุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วน 80/20wt/wt (KG82)) เท่ากับ 242 °C ซึ่งใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินและโครงเลี้ยงเซลล์ KG55 มีค่าอุณหภูมิการสลายตัวเท่ากับ 250 °C ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและ KG82 ดังตารางที่ 4.6 จากผลค่าอุณหภูมิการสลายตัวแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีเสถียรภาพทางความร้อนมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ KG55, KG82 และ K100 ตามลำดับ อาจเนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินมากกว่าเคราติน แม้เคราตินมีพันธะไคซัลไฟด์ ซึ่งควรมีเสถียรภาพทางความร้อนสูงกว่าเจลาติน จากงานวิจัยของ Ionashiro, E.Y. และคณะ พบว่า



ค่าอุณหภูมิการสลายตัวของเคราตินจากเส้นผมมนุษย์มีค่าเท่ากับ 230 องศาเซลเซียส [Ionashiro, E.Y. และคณะ, 2004] งานวิจัยนี้ค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีค่าสูงกว่าเนื่องจากผ่านกระบวนการเชื่อมโยงพันธะด้วยความร้อน (240 องศาเซลเซียส, ตารางที่ 4.6)

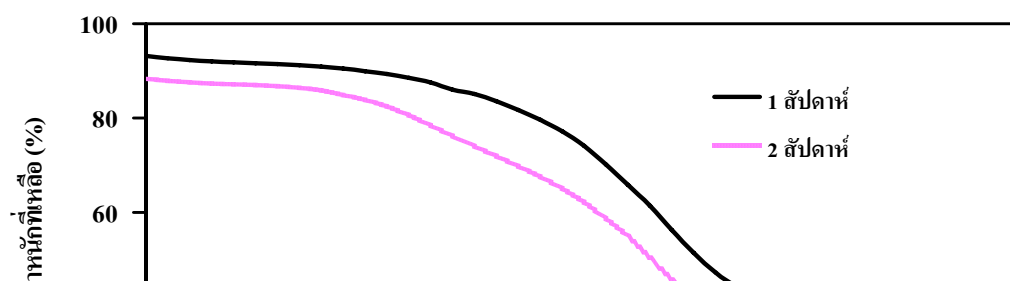
**ตารางที่ 4.6** แสดงค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ก่อนการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ

การย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ภายในร่างกาย (*in vivo* biodegradability) โดย

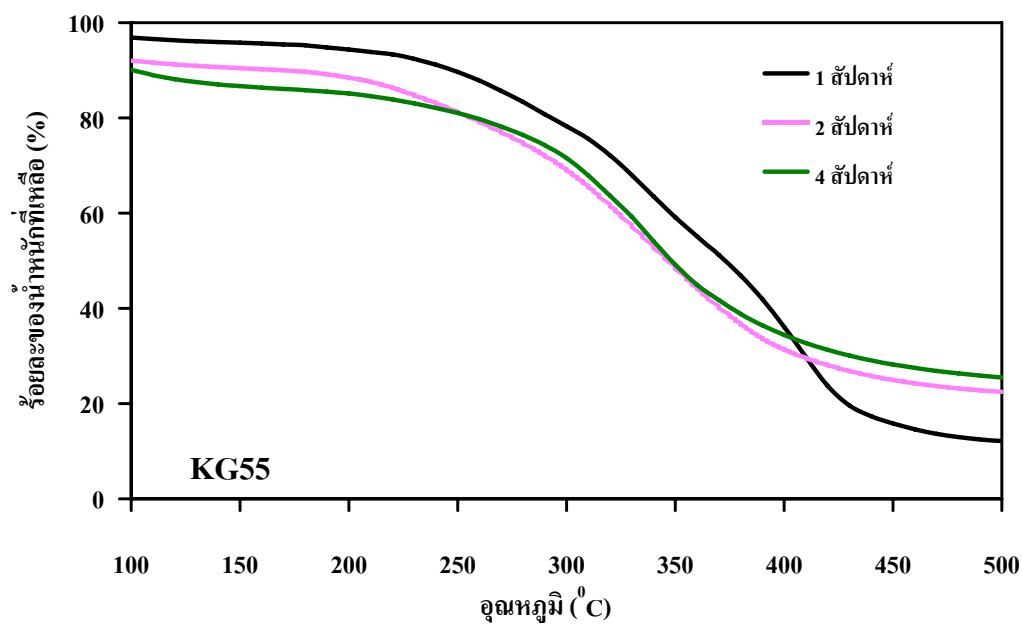
**ชนิดโครงเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิการสลายตัว (°C)**

K100	240
KG82	242
KG55	250
G100	260

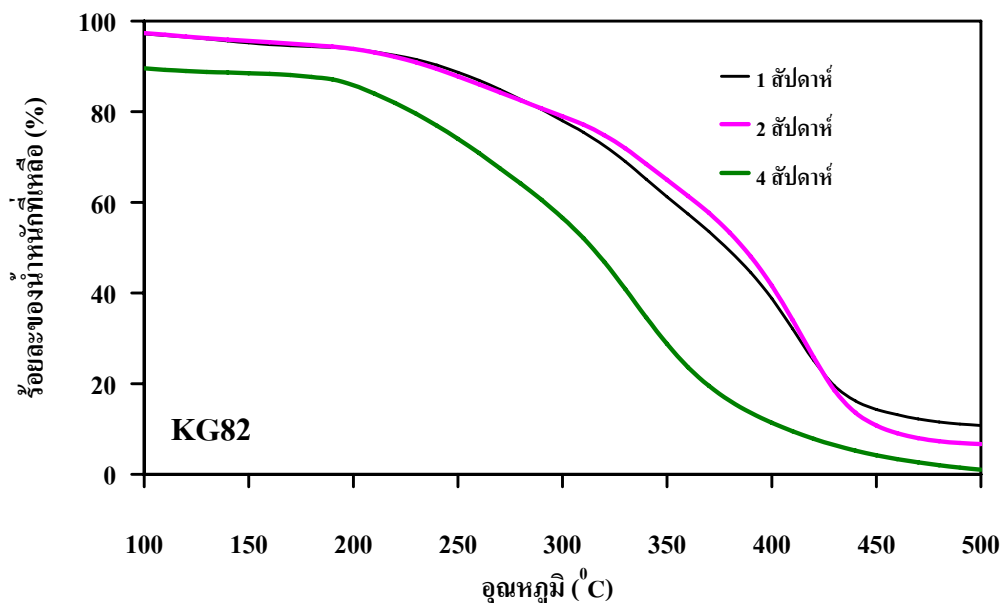
พิจารณาอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่อง TGA หลังจากนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน type A ที่อัตราส่วนเคราตินต่อเจลาตินเท่ากับ 80/20 และ 50/50(wt/wt) 0.8% total solid weight ฝังใต้ผิวหนังบนหลังของ Wistar Rat เพศเมีย อายุ 4-5 สัปดาห์ และวิเคราะห์ผลที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ค่าอุณหภูมิการย่อยสลายแสดงดังรูปที่ 4.44-4.46



รูปที่ 4.44 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวด้วยเครื่อง TGA ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (G100) 0.8% total solid weight หลังจากการย่อยสลายภายในร่างกายสัตว์ทดลองที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.45 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวด้วยเครื่อง TGA ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน อัตราส่วน 50/50wt/wt (KG55) 0.8% total solid weight หลังจากการย่อยสลายภายในร่างกายสัตว์ทดลองที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.46 กราฟแสดงการวิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวด้วยเครื่อง TGA ของโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาติน อัตราส่วน 80/20wt/wt (KG82) 0.8% total solid weight หลังจากการย่อยสลายภายในร่างกายสัตว์ทดลองที่เวลาต่าง ๆ

ค่าอุณหภูมิการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อนำไปฝังใต้ผิวหนังบนหลังหนู มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองมากขึ้น ค่าอุณหภูมิการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากฝังในสัตว์ทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 พิจารณาค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์กับผลการย่อยสลายในร่างกาย พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินซึ่งมีค่าอุณหภูมิการย่อยสลายสูงที่สุดควรมีการย่อยสลายในร่างกายช้า และโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินซึ่งมีค่าอุณหภูมิการสลายตัวต่ำกว่าควรย่อยสลายได้เร็วกว่า แต่จากผลการย่อยสลายในร่างกาย (รูปที่ 4.25) โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินย่อยสลายหมดเร็วที่สุด อาจเนื่องจากเอนไซม์ในร่างกายมีความเฉพาะเจาะจงกับเจลาตินมากกว่า

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด หลังจากฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ ในสัตว์ทดลอง (สัปดาห์)	อุณหภูมิการสลายตัว (°C)		
	G100	KG55	KG82
0	260	250	242
1	258	250	242
2	210	248	240
4	-	225	220

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ – แสดงถึง โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการย่อยสลายหมดไป

เมื่อพิจารณาค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดพบว่า เสถียรภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อความร้อนลดลงเมื่อระยะเวลาที่ฝังโครงเลี้ยงเซลล์ในสัตว์ทดลองมากขึ้น ค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินและเคราตินที่เวลา 0 สัปดาห์มีค่าใกล้เคียงกันอาจเกิดจากการที่สารเป็น โปรตีนธรรมชาติเช่นเดียวกัน มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันและพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลเคราตินที่สกัดมีปริมาณน้อย ทำให้การวิเคราะห์ปริมาณเนื้อสารที่เหลือด้วยเครื่อง TGA ไม่ได้ จึงควรใช้วิธีอื่นๆ เช่น การทดสอบการย่อยสลายในสภาวะเลียนแบบร่างกายโดยใช้เอนไซม์เคราตินเนสแล้วหาน้ำหนักที่หายไป

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์ โดยเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ urea, thiourea, 2-mercaptoethanol, sodium sulfide, sodium metabisulfite และ SDS พบว่าการสกัดด้วย 5M urea, 3M thiourea, 0.5M sodium sulfide, 1.66M 2-mercaptoethanol และ 0.26M SDS (วิธีที่ 11) ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงสุดคือ 66% ผลของการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการสกัดเมื่อใช้เวลาในการสกัดมากขึ้น เปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่ามากขึ้น การสกัดโดยใช้เวลา 72 ชั่วโมงให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงสุดเท่ากับ 40% การเตรียมวัสดุโดยการบดเส้นผมด้วยเครื่อง Ball mill ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงสุดเท่ากับ 76% เมื่อนำเคราตินที่สกัดได้แต่ละวิธีไปศึกษาลักษณะสมบัติด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีพบว่า เคราตินที่สกัดแต่ละวิธีแสดงการสั่นของพันธะ S-S ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเคราติน นอกจากนี้ การสกัดแต่ละวิธีสามารถสกัดเคราตินได้น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยพบแถบโปรตีนอยู่ในช่วง 20-30 kDa และ 40-60 kDa ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของเคราตินแบบแอลฟา ซึ่งคล้ายโครงสร้างเคราตินธรรมชาติในเส้นผมมนุษย์ แต่ทุกวิธีการสกัดได้เคราตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเป็นส่วนใหญ่ โดยสาร 2-mercaptoethanol มีหน้าที่ตัดพันธะไดซัลไฟด์

เมื่อนำเคราตินที่สกัดได้จากเส้นผมมนุษย์ด้วยวิธีที่ 1 (เคราติน) และวิธีที่ 5 (เอส-ซัลโฟเคราติน) ผสมกับเจลาติน type A ที่อัตราส่วนต่าง ๆ และขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบฟองน้ำด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-drying) และทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยเทคนิค dehydrothermal treatment ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบสมบัติเชิงกลโดยวัดค่า compressive modulus พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินมีค่า compressive modulus สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราติน โดยเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเจลาตินในโครงเลี้ยงเซลล์ทำให้มีความแข็งแรงมากขึ้น ผลการทดสอบสมบัติการเข้ากันได้กับเซลล์ในสภาวะเลียนแบบร่างกาย (*In vitro* biocompatibility) โดยใช้เซลล์ L929 mouse fibroblast พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เอส-ซัลโฟเคราตินมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์เคราตินจำนวนเซลล์เริ่มลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง เนื่องจากโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์เปื่อยยุ่ย ผลการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ที่ดีที่สุดคือโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินผสมเจลาตินที่อัตราส่วน 80/20 (KG82) เมื่อพิจารณาค่า doubling time พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเคราตินเป็นองค์ประกอบมีค่า doubling time ต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเอส-ซัลโฟเคราตินเป็นองค์ประกอบและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน (ตัวควบคุม), โครงเลี้ยงเซลล์ KG82 ซึ่งมีผลการเลี้ยงเซลล์ดีที่สุดและโครงเลี้ยงเซลล์ KG55 ซึ่งมีสมบัติทางกลดีที่สุด ฝังได้ผิวหนังบนหลังหนูที่เวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ตรวจสอบ

เนื้อเยื่อด้วยเทคนิค H&E พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ KG82 ให้ผลดีที่สุด โดยมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นมาใหม่ทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์อย่างรวดเร็วตั้งแต่สัปดาห์แรกและมีเส้นเลือดเกิดขึ้นใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ไม่ได้มีการเติม GAG (Glycosaminoglycan) ซึ่งจำเป็นใน Extra Cellular Matrix (ECM) ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

## 5.2 ข้อเสนอแนะและงานวิจัยต่อไปในอนาคต

1. การสกัดเคราตินอาจสกัดโดยใช้เวลาในการสกัดให้น้อยลง เพื่อให้เคราตินที่สกัดได้มีขนาดโมเลกุลที่อยู่ในช่วงที่ต้องการและยังคงมีโครงสร้างแบบเกลียวอัลฟาซึ่งเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ควรนำเคราตินที่สกัดได้จากวิธีที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงสุด (วิธีที่ 11) ขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์และนำไปทดสอบสมบัติต่างๆ

2. ควรมีการแยกใช้เคราตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่าๆ กัน เพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น

3. การศึกษาลักษณะสมบัติของเคราตินที่สกัดได้ นอกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิครามานสเปกโตรสโกปีและ SDS-PAGE แล้ว อาจใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในเคราตินที่สกัดได้หรือหาลำดับกรดอะมิโนเพื่อให้ทราบว่า มี RGD-peptide เหลืออยู่หรือไม่ถ้าสกัดได้น้ำหนักโมเลกุลขนาดต่างๆ

4. นอกจากการสกัดเคราตินจากเส้นผมมนุษย์แล้ว อาจเปลี่ยนวัสดุจากเส้นผมเป็นขนสัตว์ชนิดอื่น เช่น ขนหนุทคลอง เพื่อลดปัญหาในเรื่องเม็คสีเส้นผม แม้ว่าเม็คสีจะไม่เป็นปัญหาต่อสมบัติการเข้ากันได้ทางชีวภาพ

5. ปรับปรุงสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์โดยทำการเชื่อมโยงพันธะวิธีอื่นๆ เช่น เดิมสารเชื่อมโยงพันธะ ได้แก่ EGDE (ethylene glycol diglycidyl ether) เป็นต้น

6. ปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์โดยการเติม GAG ซึ่งจำเป็นใน ECM หรืออาจจะเพิ่มเนื้อโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อลดความเร็วในการย่อยสลายด้วย

7. นำโครงเลี้ยงเซลล์เคราตินไปทดสอบเลี้ยงเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์ประสาท และเซลล์กระดูก เป็นต้น เพื่อให้ทราบศักยภาพของวัสดุ

## รายการอ้างอิง

### ภาษาอังกฤษ

- Albers, KM. Keratin Biochemistry. Clinics in Dermatology. 14 (1996): 309-320.
- Aluigi, A., et al. Studies on keratin/cellulose films from cuprammonium solution. Autex Research Journal 4 (2004)
- Akhtar, W., Edwards, H.G.M., Farwell, D.W. and Nutbrown, M. Fourier-transform Raman spectroscopic study of human hair. Spectrochem Acta Part A. 53 (1997): 1021-31.
- Akhtar, W. and Edwards, H.G.M. Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers. Spectrochem Acta Part A. 53 (1997): 81-90.
- Anthony, C. and Richard, R. Preparation of protein sample for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips. Novagen, Inc. and McArdle Laboratory for Cancer Research: University of Wisconsin-Madison.
- Buckley, C. and O'Kelly, K. Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering. Dublin: Centre for bioengineering, Department of mechanical and manufacturing engineering, Trinity College, Ireland. (2004): 147-166.
- Cao, J. Melting study of the  $\alpha$ -form crystallites in human hair keratin by DSC. Thermochemica Acta 335 (1999): 5-9.
- Chang, B.S., Lee, C.K., Hong, K.S., Youn, H.J., Ryu, H.S., Chung, S.S. and Park, K.W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. Biomaterials 21(2000): 1291-1298.
- Cheryl, R., Arlene, J., Mark, E., Scott, F. and Robert, A. Keratin-base poeders and hydrogel for pharmaceutical application. U.S. Patent 2003.
- Chu, T.M.G., Orton, D.G., Hollister, S.J., Feinberg, S.E., Halloran, J.W. Mechanical and in vivo performance of Hydroxyapatite implants with controlled architectures. Biomaterials 23 (2002): 1283-1293.
- Coello, W.F. and Khan, M.A.Q. Effects of keratin on heavy metal chelation and toxicity to aquatic organisms. In: Symposium on Toxicology & Risk Assessment. Amer. Soc. Testing & Materials. 7 (1998): 233-239.

- Curran, J.M., John, R.C. and Hunt, J.A. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. Biomaterials 27 (2006): 4783-4793.
- Donzelli, E., Salvade, A., Mimo, P., Vigano, M., Morrone, M. Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M. and Tredici, G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. Archives of oral biology 52 (2007): 64-73.
- Dowling, L.M., Crewther, W.G., and Parry, DAD. Secondary structure of component 8c-1 of  $\alpha$ -keratin: analysis of the amino acid sequence. Biochem J. 236 (1986): 705-712.
- Folin, M. and Contiero, E. Electrophoretic analysis of non-human primates hair keratin. Forensic Science International. 83 (1996): 191-199.
- Freimoser, F., Jakob, C., Aebi, M. and Tuor, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. Applied and Environmental Microbiology. (1999): 3727-3729.
- Grande, D.A. and Lucas, P.A. Mesenchymal stem cells for cartilage repair. U.S. Patent (2001)
- Gillespie, J.M. and Frenkel, M.J. The diversity of keratins. Comp. Biochem. Physiol. 47B (1974): 339-346.
- Ionashiro, E.Y., Hewer, T.R.S., Fertoni, F.L., Almeida, E.T. and Ionashiro, M. Application of differential scanning calorimetry in hair samples as a possible tool in Forensic Science. Ecl Quim. 29 (2004): 53-56.
- Ishaug, S.L., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G., Three dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. Biomaterials. 15 (1998): 1405-1412.
- Katoh, K., Shibayama, M., Tanabe, T. and Yamauchi, K. Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. Biomaterials. 25 (2004): 2265-2272.
- Kram, P., Pizzolo, G., Aprilli, G. and Franchini, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. Bone 39 (2006): 678-683.
- Kyte, J. Structure in protein chemistry. Garland Publishing (1995)



- Lee, Y.M., Lee, S.B., Jeon, H.W., Lee, Y.M., Song, K.W., Park, M.K., Nam, Y.S. and Ahn, H.C. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6)- $\beta$ -glucan. Biomaterials 24 (2003): 2503-2511.
- Lee, Y.M., Lee, S.B., Jeon, H.W., Chong, M.S., Hong, S.H. and Lee, Y.W. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. Biomaterials 26 (2005): 1961-1968.
- Lennon, D.P., Haynesworth, S.E., Young, R.G., Dennis, J.E. and Caplan, A.I. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. Experimental Cell Research. 219 (1995): 211-222.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.R. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951): 265-275.
- Musso, M. Raman Spectroscopy: Comparison of Infrared Spectra with those gathered by Raman Spectroscopy of selected substances. Available from:  
<http://www.sbg.ac.at/ipk/avstudio/pierofun/protocol/raman.pdf> (2000)
- Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K. and Fujii, T. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. Biol. Pharm. Bull. 25 (2002): 569-572.
- Neuman, R.E. The amino acid composition of gelatins, collagens and elastins from different sources. Arch Biochem. 24 (1949): 289-297.
- Palsson, B. Principles and applications in engineering series: Tissue engineering. CRC Press LLC (2003)
- Peter, X.M. Scaffolds for tissue fabrication. Materialstoday. (2004):30-40.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemin, G. Tissue engineered bone regeneration. Nat Biotechnol 18 (2000):959-63.
- Pountos, A. and Giannoudis, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. Injury, Int. J. Care Injured 365 (2005): 508-512.
- Radboud University, Faculty of Science. Hair.[Online]. Available from:  
<http://www.vcbio.science.ru.nl/en/fesem/applets/hair/> (25 Sep 2004)

- Tabata, Y., Nagano, A. and Ikada, Y. Growth factor release from biodegradable hydrogels to induce neovascularization. Adv Drug Delivery Rev 31 (1998): 287-301.
- Tabata, Y., Takahashi, Y. and Yamamoto, M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate. Biomaterials 26 (2005): 3587-3596.
- Tachibana, A., Furuta, Y., Takeshima, H., Tanabe, T. and Yamauchi, K. Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. J. Biotechnol. 93 (2002):165-170.
- Tanabe, T., Okitsu, N. and Yamauchi, K. Fabrication and characterization of chemically crosslinked keratin films. Biomaterials. 24 (2004): 441-446.
- Tanabe, T., Okitsu, N., Tachibana, A. and Yamauchi, K. Preparation and characterization of keratin–chitosan composite. Biomaterials. 23 (2002):817–825.
- Yamauchi, K. and Khoda, A. Novel proteinous microcapsules from wool keratins. Colliods and Surface B: Biointerfaces. 9 (1997): 117-119.
- Young, B. and Health, J.W. Wheater's functional histology a text and colour atlas. 4<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, (2000)
- Wales, J. Keratin [Online]. Wikipedia foundation, Inc. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Keratin> (24 Jan 2006)
- White, P. Crime Scene to Court: The Essentials of Forensic Science. The Royal Society of chemistry publisher (1998)
- Wolfram, L.J., Human hair: A unique physicochemical composite. J Am Acad Dermatol 48 (2003): 106-114.

ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน**

Lowry's method เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน หลักการวิเคราะห์ในหัวข้อ 2.3.1 โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

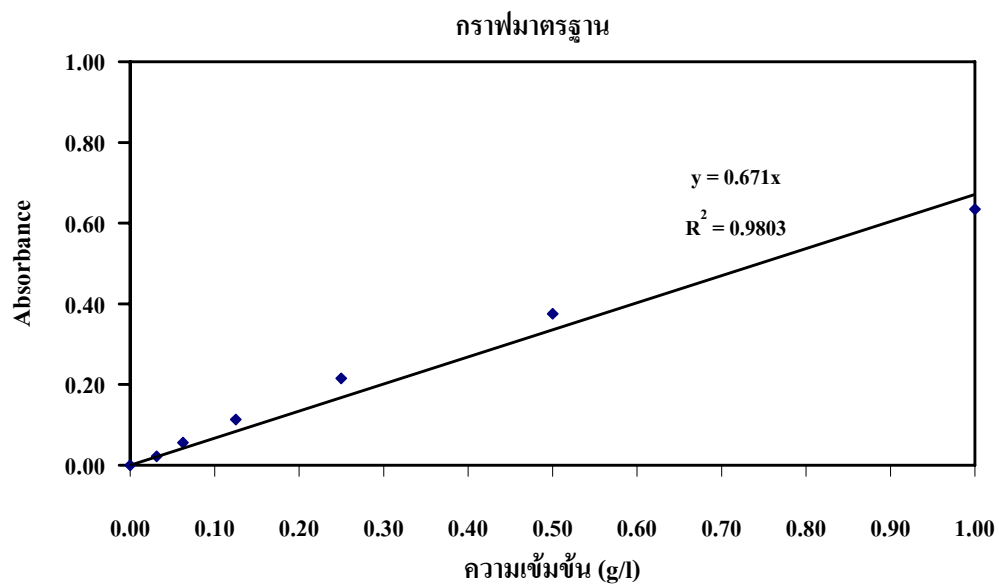
**สารเคมีที่ใช้**

1. สารละลาย A: 0.5% (w/v) Copper(II) sulfate
2. สารละลาย B: 2% (w/v) Sodium potassium ttrate
3. สารละลาย C: 2% (w/v) Sodium carbonate
4. สารละลาย D: 0.1 M Sodium hydroxide
5. สารละลาย E: ผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตร, สารละลาย D 49 มิลลิลิตร, สารละลาย A 1 มิลลิลิตร และสารละลาย B 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ
6. สารละลาย F: เจือจาง Folin Ciocalteuas Reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 v/v

**วิธีการวิเคราะห์**

1. เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
2. เติมสารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ที่มา: Lowry, O.H. และคณะ, 1951)

## ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน



## ภาคผนวก ข

## การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วย

## Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

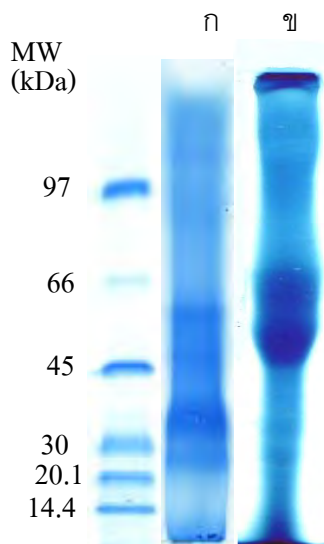
## การเตรียมสารเคมี

1. 30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide : ละลาย acrylamide 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตรและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
2. 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 : ละลาย Tris-HCl 18.17 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 1M HCl และปรับปริมาตรสารละลาย เป็น 100 มิลลิลิตร
3. 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 : ละลาย Tris-HCl 6.06 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 1M HCl และปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร
4. 1% SDS : ละลาย SDS 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
5. 10% ammonium persulfate : ละลาย ammonium persulfate 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง)
6. Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ของ polyacrylamide gel ทำให้เจลแข็งตัว
7. 5X Sample buffer : ผสม 1M Tris-HCl (pH 6.8) 0.6 มิลลิลิตร, 50% v/v glycerol 5 มิลลิลิตร, 10% SDS 2 มิลลิลิตร, 2-mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร, 1% bromophenol blue 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร
8. Electrophoresis buffer : ละลาย Tris-HCl 3.03 กรัม, glycine 14.40 กรัม, SDS 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
9. Staining Solution : ผสม Coomassie Brilliant Blue R 0.04 กรัม ใน 95% ethanol 27 มิลลิลิตร, copper sulfate 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 63 มิลลิลิตร, กรดอะซีติก 10 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
10. First destaining solution : ละลาย copper sulfate 5 กรัมด้วย 95% ethanol 120 มิลลิลิตร, กรดอะซีติก 70 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 810 มิลลิลิตรและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
11. Second destaining solution : เตรียมเช่นเดียวกับ First destaining solution แต่ไม่ต้องใส่ copper sulfate

ตารางการผสม polyacrylamide gel

สารเคมี	Stacking Gel (3% gel)	Separating gel (15% gel)
	ปริมาตร (μl)	
30% acrylamide	500	5000
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	2500
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1250	-
1% SDS	500	1000
น้ำกลั่น	2750	1500
10% ammonium persulfate	25	50
TEMED	5	5
รวม (μl)	5000	10000

ตัวอย่างผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE



รูปตัวอย่างการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ก) เติมนสาร 2-ME และ ข) ไม่เติมนสาร 2-ME ในสารละลายบัฟเฟอร์ (5X sample buffer)

## ภาคผนวก ค

### การสกัด Mesenchymal Stem Cells (MSC) จากไขกระดูก

#### วิธีสกัด

1. สกัด MSC จากกระดูกต้นขาหลังของ Wistar rat เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ น้ำหนัก 30-40 กรัม ทำให้หนูเสียชีวิตโดยการฉีดยาสลบ thiopental เกินขนาด (มากกว่า 60 มก.ต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กก.)
2. โคนขนหนูให้เกลี้ยงและพ่น 70% ethanol ให้ทั่วตัวหนูเพื่อฆ่าเชื้อโรค
3. ผ่าเอากระดูกต้นขาหลังของหนูตั้งแต่บริเวณสะโพก เลาะเศษเนื้อเยื่ออื่นออกให้สะอาด
4. ตัดที่ปลายทั้งสองข้างของกระดูกจะพบช่องไขกระดูก ใช้เข็ม (26-gauge needle) ฉุดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (Dulbecco's modified Eagle minimal essential medium: DMEM ที่มี 15% FCS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) จะล้างผ่านช่องไขกระดูกลงหลอดขนาดหนึ่งมิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งก้อนไขกระดูกหลุดออกหมด
5. ทำสารแขวนลอยเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เข็มฉีดพ่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นดูดใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 มิลลิลิตร ไว้เรียบร้อยแล้ว
6. ทำการเพาะเซลล์ในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
7. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 4 หลังจากการเพาะเซลล์ เพื่อกำจัดเซลล์เลื้อยที่ไม่เกาะจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน
8. ในวันที่ 7-10 หลังจากการเพาะเซลล์ สามารถทำการแบ่งเซลล์ได้ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 mM (pH7.4) ที่มี 0.25 wt% trypsin และ 0.02 wt% EDTA อบอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
9. สำหรับการทดลองทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ใช้เซลล์ใน passage ที่สอง



## ภาคผนวก ง

### MTT assay หรือ (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay

เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ หลักการคือ เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ไม่ได้ออกเอนไซม์โฮโคโรจินเนส ซึ่งทำปฏิกิริยากับสาร MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ซึ่งมีสีเหลือง เกิดเป็นผลึกฟอร์มazan (Formazan) สีนํ้าเงินเข้ม จากนั้นทำการละลายผลึกสีนํ้าเงินที่เกิดขึ้นด้วย dimethylsulfoxide นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลึกฟอร์มazanที่เกิดขึ้น [Tour, U. และคณะ, 1999]

#### วิธีวิเคราะห์

1. คุกอาหารเลี้ยงเซลล์ในงานเลี้ยงเซลล์ทิ้ง
2. เติม 0.5% 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT solution) 0.35 มิลลิลิตรต่อโครงเลี้ยงเซลล์ อบในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยห่อกระดาดฟลอยด์เพื่อป้องกันแสงรบกวนปฏิกิริยา
3. คุกสารละลาย MTT ทิ้ง และละลายผลึก formazan ซึ่งมีสีนํ้าเงินด้วยสารละลายผสมระหว่าง dimethylsulfoxide (DMSO) และ glycine ในอัตราส่วน 9:1 v/v 1 มิลลิลิตรต่อโครงเลี้ยงเซลล์
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

## ภาคผนวก จ

### การตรวจสอบเนื้อเยื่อทาง Histology

#### เทคนิคการย้อมสี (staining)

การย้อมสีมีหลายวิธี เช่น ย้อมขณะเนื้อเยื่อยังมีชีวิตอยู่ หรือย้อมหลังจากเนื้อเยื่อถูกทำให้คงสภาพแล้ว อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อโดยทั่วไปไม่ปรากฏสีเด่นชัดพอที่จะเห็นความแตกต่างของส่วนประกอบ จึงต้องมีวิธีที่จะทำให้ส่วนประกอบเหล่านั้นเด่นชัดขึ้นมาเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นจึงมีการเลือกสีที่เหมาะสม เพื่อให้เห็นลักษณะเด่นของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดและสามารถทราบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

1. การย้อมสีขณะมีชีวิต (vital staining) เป็นการย้อมสีส่วนประกอบของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในร่างกาย (*in vitro* staining) โดยฉีดสีย้อมเข้าไปในอวัยวะ หรือทำโดยการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสดแช่ในสารละลายสีย้อม (*in vitro* staining) การย้อมสีวิธีนี้เป็นการย้อมสีเพื่อศึกษาเซลล์ออร์แกนเนลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย หรือเพื่อศึกษากลไกการทำงานของเซลล์
2. การย้อมสีเนื้อเยื่อที่ทำให้คงสภาพแล้ว
  1. การย้อมสีโดยตรง (direct staining) คือ การย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดเพียงสีเดียว แต่ส่วนประกอบของเนื้อเยื่อติดสีเข้มหรือจากต่างกัน
  2. การย้อมสีทางอ้อม (indirect staining) คือ การย้อมสีโดยใช้สารช่วยติดสี เพื่อให้เห็นลักษณะเด่นของส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ
  3. การย้อมแบบก้ำก๋วหน้า เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อเรียงตามขั้นตอนที่กำหนดไว้ ไม่มีการล้างสีออกให้จางลง ควบคุมคุณภาพการย้อมสีโดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
  4. การย้อมสีแบบถอยหลัง เป็นเทคนิคที่เนื้อเยื่อถูกย้อมจนมากเกินพอดีแล้ว จึงล้างสีย้อมออก ทำให้สีจางลง เพื่อให้เห็นส่วนประกอบส่วนใดส่วนหนึ่งของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเด่นกว่าส่วนอื่น

#### สีย้อม

1. ฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) ทำหน้าที่เป็นสีย้อมสำหรับเนื้อเยื่อที่มีประจุลบ
2. อีโอซิน (eosin) เป็นสีย้อมสำหรับเนื้อเยื่อที่มีประจุบวก ใช้เป็นสีย้อมทับเพื่อให้เห็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น

3. ฮีมาทอกซิลิน-อีโอซิน (Harris's hematoxylin-eosin) เป็นสีย้อมที่นิยมใช้ สามารถใช้แสดงส่วนประกอบของเนื้อเยื่อได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น เนื้อเยื่อที่มีไขมันมาก ใช้ย้อมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะ

ขั้นตอนการย้อมสี ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ดังนี้

1. Deparaffinization เป็นขั้นตอนละลาย wax medium ที่เคลือบเซลล์และส่วนอื่นของเนื้อเยื่อไว้ไม่ให้ติดสีที่ใช้ย้อม

2. Hydration เป็นการล้างไซลินออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์และนำเนื้อเยื่อลงสู่น้ำเพื่อการย้อมสี

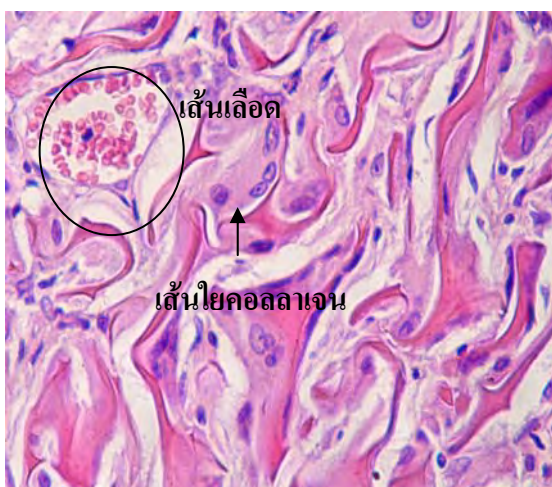
3. Staining เป็นการย้อมสีขึ้นเนื้อเยื่อ

4. Dehydration ทำให้ขึ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจากน้ำที่เกิดจากสีที่ใช้ย้อม

5. Clearing เป็นการทำให้ขึ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ใสขึ้น โดยใช้ไซลินเป็นตัวดึงแอลกอฮอล์ที่ตกค้างอยู่ที่ขึ้นเนื้อเยื่อออกให้หมด

6. Mounting เป็นขั้นตอนการนำเอาแผ่นกระจกบางๆ ปิดทับลงบนชิ้นเนื้อเยื่อสไลด์โดยใช้ mounting medium ช่วยยึดแผ่นให้ติดกับสไลด์ ช่วยให้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เห็นภาพได้ชัดเจนและเป็นวิธีการเก็บรักษาสไลด์เนื้อเยื่อได้นาน

ผลที่ได้จากการย้อม คือ นิวเคลียสติดสีน้ำเงินของฮีมาทอกซิลิน และไซโตพลาสซึมติดสีส้มแดงของอีโอซิน ตัวอย่างแสดงดังรูป 1



รูปแสดงชิ้นเนื้อเมื่อผ่านการย้อมสีแบบ H&E

## ภาคผนวก ข

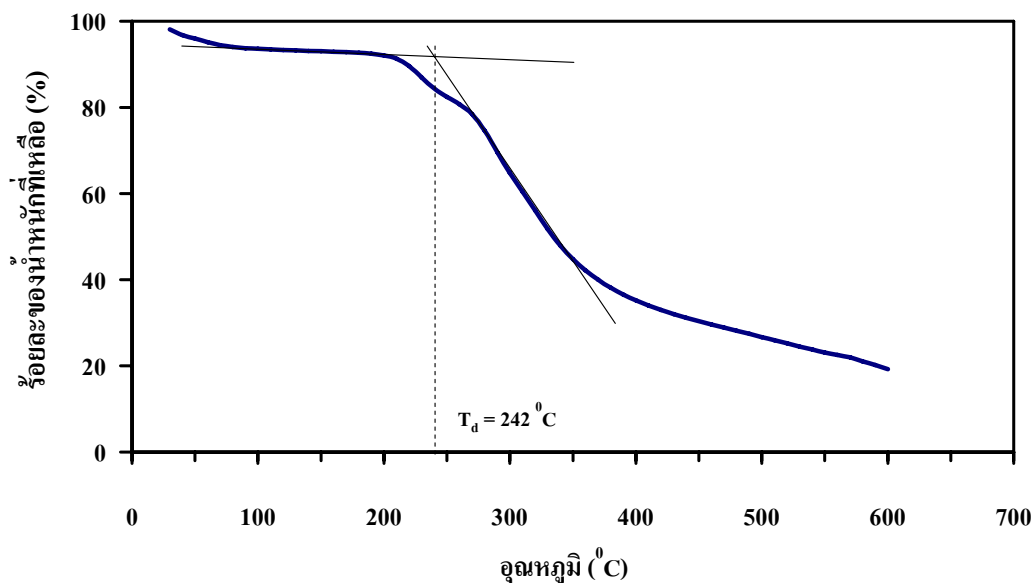
## เครื่อง Thermalgravimetric Analysis (TGA)

## หลักการทํางาน

เครื่อง TGA วัดค่าน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปต่ออุณหภูมิ ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของสาร ผลการวิเคราะห์ที่ได้ประกอบด้วย ค่าน้ำหนักที่หายไปซึ่งเป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิและอัตราการหายไปของน้ำหนักต่ออุณหภูมิ โดยผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะของสาร การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเกิดจากการสลายตัวที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น นอกจากนี้สามารถใช้เครื่อง TGA วิเคราะห์หาค่าอุณหภูมิการสลายตัว ( $T_d$ ) ของตัวอย่างได้ ดังรูป

## การเตรียมตัวอย่าง

ควรอบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง เพื่อได้ความชื้นที่มีอยู่ในตัวอย่าง ไม่ให้การวิเคราะห์คลาดเคลื่อน ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ควรมีน้ำหนักไม่เกิน 10 มิลลิกรัม เพื่อลดผลกระทบจากความแตกต่างของอุณหภูมิ



การหาค่าอุณหภูมิการสลายตัวของโพร่งเลียงเซลล์