

Extraction and Application of Proteoglycan from Fish Cartilage for the Treatment of
Burn Wounds

Mr. Panya Weerawatkapong



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

การสกัดและประยุกต์ใช้สารโปรตีนโกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลาเพื่อเร่งการหายของบาดแผล
ใหม่



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดและประยุกต์ใช้สารโปรตีนโกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลาเพื่อเร่งการหายของบาดแผลใหม่
โดย	นายปัญญา วีระวิฑกพงศ์
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นายสัตวแพทย์ ดร.สุเมธ อำภาวงษ์)

ปัญหา วิวัฒนาการ : การสกัดและประยุกต์ใช้สารโปรตีโอไกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลาเพื่อเร่งการหายของบาดแผลไหม้ (Extraction and Application of Proteoglycan from Fish Cartilage for the Treatment of Burn Wounds) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: รศ. ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ญ. ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์, 76 หน้า.

กระดูกอ่อนบริเวณส่วนหัวของปลาประกอบด้วยโปรตีโอไกลแคนที่มีคุณสมบัติคล้ายสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนังได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการขึ้นรูปโครงสร้างเส้นใยเซลล์จากไฟโบรอินจากไหม (SF) และเจลาติน (G) โดยมีและไม่มีสารโปรตีโอไกลแคน (E) ที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลาและทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ, เคมี และชีวภาพของโครงสร้างเส้นใยเซลล์ที่เตรียมได้ โดยการขึ้นรูปโครงสร้างเส้นใยเซลล์จากไฟโบรอิน และเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งปรากฏว่าทุกกลุ่มตัวอย่างสามารถถูกขึ้นรูปได้สำเร็จยกเว้นโครงสร้างเส้นใยเซลล์ SF75G25E ดังนั้นจึงเลือกโครงสร้างเส้นใยเซลล์ SF25G75, SF25G75E, SF50G50 และ SF50G50E มาทำการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและ ทางชีวภาพ ต่อไป ในด้านสมบัติทางกายภาพของโครงสร้างเส้นใยเซลล์พบว่าโครงสร้างเส้นใยเซลล์ที่นำมาศึกษาทั้งหมดมีโครงสร้างที่มีรูพรุนและมีการเชื่อมต่อของรูพรุนสูง โดยโครงสร้างเส้นใยเซลล์ SF25G75E มีขนาดของรูพรุนใหญ่ที่สุด นอกจากนี้ โครงสร้างเส้นใยเซลล์ SF25G75 มีความสามารถในการดูดซับน้ำได้สูงกว่าโครงสร้างเซลล์ในกลุ่มอื่นๆ ผลจากการวิเคราะห์โครงสร้างเส้นใยเซลล์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างเส้นใยเซลล์ที่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบมีหมู่ฟังก์ชันเอไมด์และน้ำตาลอยู่ในโครงสร้าง ในด้านคุณสมบัติทางชีวภาพพบว่าโครงสร้างเส้นใยเซลล์ที่มีโปรตีโอไกลแคนส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้สูงกว่าโครงสร้างเส้นใยเซลล์ที่ไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบอย่างมีนัยสำคัญ แต่รูปแบบการหายของแผลภายนอก ร่างกายของโครงสร้างเส้นใยเซลล์ทุกกลุ่มตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สุดท้ายยังพบว่าโปรตีโอไกลแคนมีผลในการเพิ่มอัตราการย่อยสลายสภาพทางชีวภาพของโครงสร้างเส้นใยเซลล์ให้เร็วขึ้น สรุปได้ว่าโปรตีโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลาสามารถนำมาผสมในการขึ้นรูปเป็นโครงสร้างเส้นใยเซลล์ได้ และมีแนวโน้มในการนำไปใช้ประโยชน์ในการช่วยส่งเสริมการหายของแผลโดยการเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนัง

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5670278621 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS: PROTEOGLYCAN / FISH CARTILAGE / BURN WOUNDS / SILK FIBROIN / GELATIN

PANYA WEERAWATKAPONG: Extraction and Application of Proteoglycan from Fish Cartilage for the Treatment of Burn Wounds. ADVISOR: ASSOC. PROF. MUENDUEN PHISALAPHONG, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. PORNANONG ARAMWIT, Pharm.D., Ph.D., 76 pp.

Fish cartilage in head part contains epidermal growth factor-like proteoglycan which can stimulate the growth of skin. The objectives of this study were to fabricate silk fibroin (SF) - gelatin (G) scaffold, with and without fish cartilage extracted proteoglycan (E), and to investigate physical, chemical and biological properties of the scaffolds. The composite scaffolds with different blend ratios, with and without the proteoglycan, were fabricated using freeze drying technique. All scaffolds were successfully prepared except SF75G25E. Therefore, SF25G75, SF25G75E, SF50G50 and SF50G50E scaffolds were further characterized for physical, chemical and biological properties. In terms of physical properties, these scaffolds showed porous structures with high pore interconnectivity. SF25G75E scaffold had the largest average pore size. Furthermore, SF25G75 scaffolds had significantly higher water swelling ability than the others. Results from Fourier transform infrared spectroscopy assay showed that the fabricated scaffold containing the extracts had amide and sugar functional group. Regarding biological properties, the scaffold with proteoglycan promoted significantly higher fibroblast cell proliferation rate than those without it. However, the in vitro wound healing was not significantly different with respect to wound closure among all groups. Lastly, the proteoglycan increased biodegradation rate of the scaffold. In conclusion, proteoglycan from fish cartilage was successfully fabricated as the scaffold and had the potential to be used for promoting wound healing by increasing fibroblast cell proliferation.

Field of Study: Biomedical Engineering Student's Signature

Academic Year: 2015

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ เกษัชรหญิง ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูง ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ซึ่งได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อาจารย์ ดร. จุฑามาศ รัตนวารภรณ์ และ นายสัตวแพทย์ ดร. สุเมธ อัมภา วงษ์ ที่ท่านได้ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำในสิ่งที่เป็นอย่างประโยชน์ ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยวิเคราะห์จุดบกพร่องของวิทยานิพนธ์เพื่อให้ผู้วิจัยทำการแก้ไขปรับปรุงให้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สนอง เอกสิทธิ์ และคุณดวงตา ทองสกุล หน่วยปฏิบัติการวิจัยอุปกรณ์รับรู้ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความ อนุเคราะห์ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีด้วยทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.- อุตสาหกรรม ประจำปี 2555 ที่สนับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณรุ่งนภา แยมเดช ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ คณะ วิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้ความช่วยเหลือ ให้ ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งสอนเทคนิควิธีการทำการทดลองที่จำเป็นต้องรู้สำหรับ การทำวิจัยในครั้งนี้

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณ ครอบครัวของผู้วิจัย บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนด้าน การศึกษาจนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
บทที่ 1 บทนำ	3
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	3
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 แผลไหม้.....	6
2.2 กระบวนการหายของแผล	7
2.3 ประเภทของกระบวนการหายของแผล.....	11
2.4 กลไกของกระบวนการหายของแผล	11
2.5 โพรตีนโอไกลแคน.....	14
2.5.1 สมบัติทั่วไปของโปรตีนโอไกลแคน.....	14
2.5.2 โพรตีนโอไกลแคนในกระดุกอ่อน.....	16
2.5.3 หน้าที่ของโปรตีนโอไกลแคนต่อกระบวนการหายของแผล.....	21
2.4 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ	24
2.5 วัสดุชีวภาพ.....	26
2.5.1 ไฟโบรอิน.....	26

2.5.2	เจลาติน	29
2.5.3	วัสดุชีวภาพผสม (ไฟโบรอิน/เจลาติน).....	33
2.6	การเชื่อมขวางโปรตีนด้วยกลูตาแอลดีไฮด์.....	34
2.7	การผลิตโครงสร้างสแคลโฟลด์ด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying).....	35
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย		36
3.1	วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.2	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.3	วิธีการวิจัย	38
3.3.1	สารโปรตีนไฮโดรเจลที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลา	39
3.3.2	การเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากรังไหมไทยพันธุ์จูล 1/1	40
3.3.3	การเตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ.....	44
3.3.4	การขึ้นรูปโครงแข็งเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน และเจลาตินในอัตราส่วน แตกต่างกัน โดยมีและไม่มีสารโปรตีนไฮโดรเจลเป็นองค์ประกอบ	44
3.3.5	การวัดขนาดรูพรุนและลักษณะทางกายภาพของโครงแข็งเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบ รอิน เจลาตินและสารสกัดโปรตีนไฮโดรเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด	45
3.3.6	ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงแข็งเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาตินและ สารสกัด โปรตีนไฮโดรเจลด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR).....	45
3.3.7	การทดสอบความสมดุลของการบวมพอง (swelling test)	45
3.3.8	การทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929).....	46
3.3.9	การทดสอบการหายของแผล (scratch test) ภายนอกร่างกาย (in vitro).....	47
3.3.10	การทดสอบการย่อยสลายในทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (in vitro).....	47
3.3.11	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	48

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	49
4.1 ผลการขึ้นรูปโครงสร้างของเซลล์.....	49
4.2 ผลการวัดขนาดรูพรุนและลักษณะทางกายภาพของโครงสร้างเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาตินและสารสกัดโปรตีนโอไกลแคนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	49
4.3 ผลการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงสร้างเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาตินและสารสกัดโปรตีนโอไกลแคนด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR).....	51
4.4 ผลการทดสอบความสมดุลของการบวมพอง (swelling test).....	52
4.5 ผลการทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929).....	53
4.6 ผลการทดสอบการหายของแผล (scratch test) ภายนอกร่างกาย (<i>in vitro</i>)	56
4.7 ผลการทดสอบการย่อยสลายในทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (<i>in vitro</i>).....	58
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	59
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	65
6.1 สรุปผลการทดลอง	65
6.2 ข้อเสนอแนะ	65
รายการอ้างอิง	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	76

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ชนิดและหน้าที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของบาดแผล	7
ตารางที่ 2.2 ชนิดและหน้าที่ของ growth factor ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล	8
ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบของไกลโคซามิโนไกลแคนส์ชนิดต่าง ๆ (GlcA,glucuronic acid; IdoA, iduronic acid; GlcNAC, N-acetyl glucosamine; GalNAC, N-acetyl galactosamine; Gal, galactose; GlcNSO ₃ , glucosamine-N-sulfate)	15
ตารางที่ 2.4 แสดงตัวอย่างวิธีการสกัดโปรตีโอไกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลา.....	18
ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบต่างๆ ของโปรตีโอไกลแคนจากกระดูกอ่อนส่วนจมูกของปลาแซลมอน .	20
ตารางที่ 2.6 โปรตีโอไกลแคนชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (Tissue Repair)	23
ตารางที่ 2.7 สมบัติการยืดตัว (tensile) ของไหมจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน	27
ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในเส้นใยไฟโบรอิน	28
ตารางที่ 2.9 องค์ประกอบของแร่ธาตุหลักในเจลาติน.....	31
ตารางที่ 2.10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาติน.....	32
ตารางที่ 4.1 สรุปรูปขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ.....	49
ตารางที่ 4.2 สมดุลของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ.....	52
ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ.....	53

รูปที่ 2.1 ระดับความรุนแรงของแผลไหม้	6
รูปที่ 2.2 ขั้นตอนของกระบวนการหายของแผลในช่วงระยะเวลาต่างๆ	13
รูปที่ 2.3 โพรตีโอไกลแคนชนิดต่าง ๆ ภายในกระดูกอ่อน (cartilage)	16
รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของโปรตีโอไกลแคนชนิดต่าง ๆ ที่มีไกลโคซามิโนไกลแคนส์ ชนิด chondroitin sulfate เป็นหลัก (CS, chondroitin sulfate; IGD, interglobular domain)	17
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ epidermal growth factor ของหนู (โพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 53 ตัว และพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลจำนวน 3 พันธะ)....	22
รูปที่ 2.6 วิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ : (A) การเลี้ยงเซลล์ในโครงสร้างสแคลโฟลด์ให้ เจริญเติบโตกลายเป็นเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการก่อนปลูกถ่ายไปยังร่างกาย; (B) การ ปลูกถ่ายโครงสร้างสแคลโฟลด์ไปยังร่างกายแล้วปล่อยให้เซลล์ในร่างกายเข้ามา เจริญเติบโตกลายเป็นเนื้อเยื่อภายในโครงสร้างสแคลโฟลด์ที่ฝังอยู่ภายในร่างกาย	24
รูปที่ 2.7 ลักษณะโครงสร้างเส้นใยไหมของหนอนไหม	27
รูปที่ 2.8 กระบวนการเตรียมเจลาตินชนิดเอและบีจากคอลลาเจน	30
รูปที่ 2.9 กระบวนการเชื่อมขวางโปรตีนด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ (X แทน $(CH_2)_3$)	35
รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการกำจัดเซรีซินจากไหม (Degumming)	41
รูปที่ 3.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน (Dialysis of silk fibroin solution)	43
รูปที่ 4.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย ไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็น องค์ประกอบ.....	50
รูปที่ 4.2 ลักษณะของอินฟราเรดสเปกตรัมที่วิเคราะห์ได้จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปก- โทรสโกปีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนต่าง กันโดยมีและไม่มีสารสกัดโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ.....	51
รูปที่ 4.3 สมดุลของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินใน อัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ (* = ต่าง อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างอื่นทั้งหมด).....	52

- รูปที่ 4.4 ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกัน โดยมีและไม่มีโปรตีนโกลแคนเป็นองค์ประกอบ (* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (DMEM) ณ เวลาเดียวกัน (24 ชั่วโมง), ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง SF25G75 และ SF50G50 ณ เวลาเดียวกัน (24 ชั่วโมง) 54
- รูปที่ 4.5 ลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์หลังจากที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผ่านการแช่ชิ้นงานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และลักษณะการย้อมติดสีของ MTT หลังจากการทำ MTT assay 55
- รูปที่ 4.6 ร้อยละของการปิดของแผลของเซลล์หลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกัน โดยมีและไม่มีโปรตีนโกลแคนเป็นองค์ประกอบ 56
- รูปที่ 4.7 ภาพแสดงลักษณะการหายของแผลภายนอกร่างกายหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกัน โดยมีและไม่มีโปรตีนโกลแคนเป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ..... 57
- รูปที่ 4.8 อัตราการย่อยสลายภายนอกของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ sodium azide 0.01 เปอร์เซ็นต์บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 7.4 เป็นเวลา 168 ชั่วโมง 58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

หัวปลาประกอบไปด้วยกระดูกอ่อนที่มีส่วนประกอบของสารโปรติโอไกลแคนในปริมาณสูง โดยสารโปรติโอไกลแคนเหล่านี้จะมีคุณสมบัติคล้าย epidermal growth factor ที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบัน epidermal growth factor ไม่สามารถผลิตได้ในประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้น ซึ่งในต่างประเทศกระบวนการผลิต epidermal growth factor ได้มาจาก human recombinant technique ทำให้ผลผลิตดังกล่าวมีราคาสูง หากมีการนำสารโปรติโอไกลแคนมาใช้ทดแทนได้ก็จะเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรได้อย่างมาก

แผลที่เกิดจากไฟลวกมักใช้ระยะเวลาการหายของแผลนาน หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมอาจส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อน ทำให้แผลหายช้า และอาจก่อให้เกิดแผลเป็น (hypertrophic scar) หรือแผลเป็นหดรั้ง (scar contracture) ซึ่งส่งผลกระทบต่อบุคลิกภาพ และรบกวนการทำงานของผู้ป่วย จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารโปรติโอไกลแคนมีส่วนสำคัญต่อกระบวนการหายของบาดแผล โดยเชื่อว่าโปรติโอไกลแคนมีคุณสมบัติเร่งการหายของบาดแผล โดยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผิวหนัง การสร้างเนื้อเยื่อออกทดแทน และการสร้างหลอดเลือดใหม่ ดังนั้นโปรติโอไกลแคนจึงน่าจะเอื้อประโยชน์ต่อการหายของแผลใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประกอบกับโปรติโอไกลแคนที่ใช้ในการศึกษานี้สกัดได้จากกระดูกอ่อนส่วนหัวของปลา ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอวัยวะส่วนนี้จะถูกนำไปทิ้งหรือใช้เป็นอาหารสัตว์ ภายหลังจากที่นำปลามาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนั้นหากสามารถนำหัวปลามาสกัดเพื่อให้ได้โปรติโอไกลแคนและนำมาขึ้นรูปเพื่อใช้รักษาบาดแผลก็สามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตผู้ป่วย ลดค่าใช้จ่าย และเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุทางการเกษตรได้อย่างมาก

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักอยู่ในไหมซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยหนอนไหมในระยะ metamorphosis เนื่องจากไฟโบรอินมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) และถูกย่อยสลายได้ในทางชีวภาพ (biodegradation) จึงถูกนิยมในการนำมาใช้ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น นำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) หรือนำไปขึ้นรูปเป็นหลอดเลือดเทียม

เจลาตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่แปลงสภาพมาจากคอลลาเจนโดยผ่านกระบวนการ partial hydrolysis มีสมบัติสามารถเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ และสามารถละลายได้ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เจลาตินถูกนิยมนำมาใช้ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับไฟโบรอิน

เนื่องจากมีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) และถูกย่อยสลายได้ในทางชีวภาพ (biodegradation) นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้อีกด้วย

สารโปรตีนไฮโดรเจลถูกนำมาประยุกต์ใช้โดยการขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ที่ประกอบด้วยโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน (fibroin) เจลาติน (gelatin) และสารสกัดโปรตีนไฮโดรเจลในอัตราส่วนที่ต่างกันไป แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวโดยดูจากคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง เพื่อดูว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดโปรตีนไฮโดรเจลเป็นองค์ประกอบสามารถใช้รักษาบาดแผลได้อย่างมีประสิทธิภาพได้มากน้อยเพียงใด

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์และทดสอบสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์จากสารโปรตีนไฮโดรเจลที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลาร่วมกับไฟโบรอินและเจลาติน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของสารโปรตีนไฮโดรเจลซึ่งถูกสกัดจากหัวปลานิล (ได้มาจากบริษัท ไร่กำนันจุล จำกัด (เพชรบูรณ์)) ด้วยสารละลายกรด โดยการวัดค่าการละลายของสารโปรตีนไฮโดรเจลที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิล และหาค่าความเป็นกรดต่าง

1.3.2 ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน และเจลาตินในอัตราส่วนต่างกันไป โดยมีและไม่มีสารโปรตีนไฮโดรเจลเป็นองค์ประกอบ

ก. SF25G75 คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก

ข. SF50G50 คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก

ค. SF75G25 คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาตินร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก

ง. SF25G75E คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และมีสารโปรตีนไฮโดรเจลร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก

จ. SF50G50E คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 เจลาตินร้อยละ 48.75 และมีสารโปรตีนไฮโดรเจลร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก

ฉ. SF75G25E คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 เจลาตินร้อยละ 23.75 และมีสารโปรตีนไฮโดรเจลร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก

1.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

ก. ศึกษาลักษณะโครงสร้างพื้นฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ข. ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมี ด้วยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

ค. ทดสอบความสมดุลของการบวมพอง (swelling test)

1.3.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

ก. ทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929)

ข. ทดสอบการหายของแผล (scratch test)

ค. ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในการศึกษาแบบ *In vitro*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

1.4.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้รักษาบาดแผล สามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยให้ดีขึ้น ลดค่าใช้จ่าย และเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุทางการแพทย์ได้อย่างมาก



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แผลไหม้

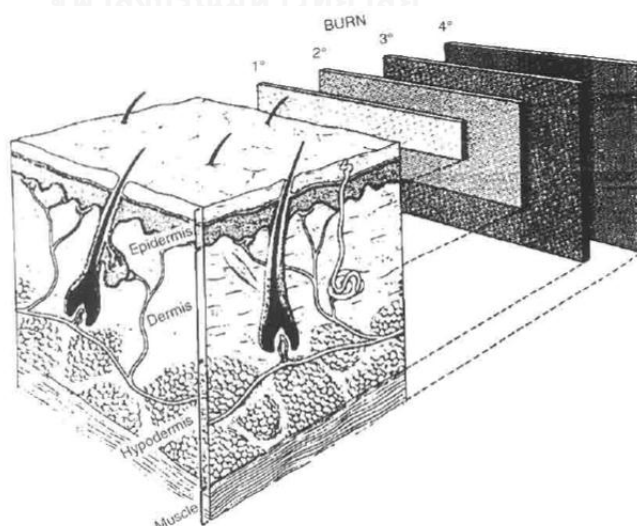
แผลไหม้เกิดจากการสัมผัสกับความร้อนหรือกระแสไฟฟ้า เช่น ถูกไฟไหม้ ถูกน้ำร้อนลวก หรือถูกกระแสไฟฟ้าช็อต เป็นสาเหตุที่ทำให้ผิวหนังได้รับความเสียหายถูกทำลายไป ความรุนแรงจากแผลไหม้นั้นสามารถถูกแบ่งออกตามความลึกหรือบริเวณชั้นของผิวหนังที่สูญเสียไปได้เป็น 4 ระดับดังต่อไปนี้ คือ [1]

1) แผลไหม้ระดับที่หนึ่ง (first-degree burn) เป็นระดับแผลไหม้ที่ไม่รุนแรง เกิดการสูญเสียผิวหนังชั้นนอกสุดหรือชั้นหนังกำพร้าเท่านั้น

2) แผลไหม้ระดับที่สอง (second-degree burn) เป็นระดับแผลไหม้ที่มีการสูญเสียผิวหนังจากชั้นนอกสุดไปจนถึงชั้นผิวหนังแท้บางส่วนที่ติดกับชั้นหนังกำพร้า

3) แผลไหม้ระดับที่สาม (third-degree burn) เป็นระดับแผลไหม้ที่มีการสูญเสียผิวหนังตั้งแต่ชั้นนอกสุด ชั้นผิวหนังแท้ในส่วนที่มีทั้งรูขุมขนและต่อมเหงื่อถึงชั้นใต้ผิวหนังแท้ซึ่งเป็นผิวหนังชั้นในสุดหรือที่เรียกกันว่าชั้นไขมัน

4) แผลไหม้ระดับที่สี่ (fourth-degree burn) เป็นระดับแผลไหม้ที่มีความรุนแรงมากที่สุด เกิดการสูญเสียผิวหนังทุกชั้น ตลอดจนชั้นกล้ามเนื้อและกระดูกรวมทั้งเส้นเอ็นที่ยึดระหว่างกล้ามเนื้อกับกระดูก



รูปที่ 2.1 ระดับความรุนแรงของแผลไหม้ [1]

2.2 กระบวนการหายของแผล

กระบวนการหายของแผล (wound healing) อาศัยการทำงานร่วมกันของเซลล์และ growth factor ชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.1 และ 2.2 นอกจากนี้ยังต้องอาศัยของเหลวซึ่งเป็นองค์ประกอบอยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่มีส่วนสำคัญในการช่วยให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโต (growth) และเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) เพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ คือ

- 1) โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) เช่น collagen และ elastin
- 2) โกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะ (multidomain adhesive glycoprotein) เช่น fibronectin, vitronectin และ laminin
- 3) โกลโคซามิโนไกลแคนส์ (glycosaminoglycan) เช่น hyaluronan และ proteoglycan (เช่น versican, syndecans, glypicans และ perlecan)
- 4) โปรตีนในของเหลวที่อยู่ภายนอกเซลล์ (matricellular protein) เช่น thrombospondin, tenascin และ osteopontin

ตารางที่ 2.1 ชนิดและหน้าที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของบาดแผล [2, 3]

ชนิด	เวลาที่ปรากฏ	หน้าที่
เกล็ดเลือด	ทันทีหลังเกิดบาดแผล	สร้าง thrombus, กระตุ้นการอักเสบและสร้างไซโตไคน์หลายชนิด เช่น TGF- β , PDGF, β -thromboglobulin, platelet factor-4
นิวโทรฟิล	สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง	เป็นเซลล์แรกที่แทรกซึมเข้าไปในตำแหน่งที่เกิดอาการบาดเจ็บ และเป็นเซลล์ที่จับกินแบคทีเรียด้วยวิธี phagocytosis
โมโนไซต์ หรือ แมคโครฟาจ	8 ชั่วโมง	จับกินแบคทีเรียด้วยวิธี phagocytosis, กำจัดเศษเซลล์และเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว, สร้างสารสื่อกลาง

		ในการอักเสบและ ไซโตไคน์, กระตุ้นการแบ่งตัวของ ไฟโบรบลาสต์ และการสังเคราะห์ คอลลาเจนรวมทั้งยังสามารถกระตุ้น การสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) ได้
ลิมโฟไซต์	72-120 ชั่วโมง	อาจจะสร้างไซโตไคน์ในชนิดของแผล บางอย่าง
ไฟโบรบลาสต์	120 ชั่วโมง	สร้างสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้หลาย ชนิด เช่น คอลลาเจน, fibronectin, hyaluronic acid และ proteoglycans และเกี่ยวข้องกับ การสร้าง granulation tissue

ตารางที่ 2.2 ชนิดและหน้าที่ของ growth factor ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล [2]

ชนิด	แหล่งที่สร้างและหลัง	หน้าที่
VEGF	Platelet, neutrophil	กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใน granulation tissue และ peripheral vascular disease
FGFs	Fibroblasts, endothelial cell, smooth muscle cell, macrophage	เพิ่มการสร้างเซลล์ fibroblast และ เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันอย่าง รวดเร็ว, เกิดการสะสมของ matrix, การหดตัวของแผล และ การสร้างหลอดเลือด
TNF	Macrophages, mast cells, T-lymphocytes	เพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์

KGFs	Fibroblast	เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและ การเคลื่อนที่ของ keratinocytes
EGF	Platelet, macrophage, keratinocyte, saliva, urine, milk, plasma	เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลง รูปร่างของเซลล์, การเพิ่ม จำนวนเซลล์, การเคลื่อนที่ของ เซลล์ และการยึดเกาะของเซลล์ ใน keratinocytes และยัง เกี่ยวข้องกับการสร้าง granulation tissue
PDGF	Platelet, fibroblast, macrophage, endothelial cell	เกี่ยวข้องกับการ mitogenic ของ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ, เซลล์ เนื้อเยื่อผิวหนังและไฟโบรบลาสต์, เป็นตัวดึงดูดเม็ดเลือดขาว นิวโทรฟิลและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน เซลล์ไฟโบรบลาสต์และการสลาย คอลลาเจน
G-CSF	Monocyte, fibroblast, lymphocyte	กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาว นิวโทรฟิล, ส่งเสริมการทำงานของ ของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลและ โมโนไซต์ และส่งเสริมการเพิ่ม จำนวนของ keratinocytes
GM-CSF	Keratinocytes, macrophages, lymphocytes, fibroblasts	เป็นสื่อกลางในการเพิ่มจำนวน ของเซลล์ผิวหนัง
TGF- α	Activated macrophages, platelets, epithelial cells	กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เนื้อเยื่อผิวหนังและไฟโบรบลาสต์ และเกี่ยวข้องกับการสร้าง granulation tissue

TGF- β	Platelets, macrophages, fibroblasts, neutrophils, keratinocytes	เกี่ยวข้องกับ mitogenic ของไฟโบรบลาสและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ, การเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาส, เป็นสารชักนำเม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ, กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยทางอ้อมและกระตุ้นการสลายคอลลาเจน
IL-1	Macrophages, lymphocytes, many other tissues and cells	เป็นสารชักนำเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลและเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาส
IGF-1	Fibroblasts, plasma, liver	เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสและกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนโกลแดนและคอลลาเจน
HGF	Fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells, tumor cells	เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังใหม่, การสร้างหลอดเลือดใหม่และการสร้าง granulation tissue
Serotonin	Platelets	เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือด, การเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด, เป็น chemotaxis และเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผนังของหลอดเลือด

2.3 ประเภทของกระบวนการหายของแผล

กระบวนการหายของแผลแบ่งออกเป็น 3 ประเภทดังนี้ คือ [2, 4]

1) กระบวนการหายของแผลแบบปฐมภูมิ (primary wound healing)

พบในแผลที่มีลักษณะฉีกขาดหรือแผลจากการผ่าตัด บาดแผลจะลึกผ่านชั้น basement membrane แต่ส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเสียหายไม่มากนัก โดยจะมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทนโดยใช้ระยะเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง

2) กระบวนการหายของแผลแบบทุติยภูมิ (secondary wound healing)

พบในแผลที่เกิดการสูญเสียเนื้อเยื่อเป็นบริเวณกว้าง เช่น แผลไฟไหม้ และแผลกดทับ กระบวนการหายของแผลอาศัยการสร้าง granulation tissue, องค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix), และคอลลาเจน เป็นต้น

3) กระบวนการหายของแผลแบบตติยภูมิ (tertiary wound healing)

คือ กระบวนการหายของแผลแบบปฐมภูมิที่ใช้ระยะเวลาในการหายของแผลนานกว่าปกติ (delayed primary intention) เนื่องมาจากบาดแผลได้รับการปนเปื้อนหรือติดเชื้อ เช่น แผลที่เรีย ส่งผลให้แผลหายช้ากว่ากระบวนการหายของแผลแบบปฐมภูมิปกติ

2.4 กลไกของกระบวนการหายของแผล

กลไกของกระบวนการหายของแผลประกอบด้วยหลายขั้นตอนซึ่งสามารถถูกแบ่งออกได้เป็น 5 ช่วงดังนี้ คือ

1) Haemostasis

เมื่อเกิดการบาดเจ็บที่ผิวหนัง หลอดเลือดจะหดตัวทันทีเพื่อลดการสูญเสียเลือด เกิดเลือด จะเข้าไปเกาะที่ผนังหลอดเลือดที่เสียหายหรือฉีกขาดและไปเกาะที่คอลลาเจนภายในองค์ประกอบนอกเซลล์ (extracellular matrix) จากนั้นเกล็ดเลือดจะปลดปล่อยไซโตไคน์, growth factor, และ สารสื่อกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจำนวนมากทำให้เกล็ดเลือดมารวมตัวกันเกิดการแข็งตัวของเลือดและเกิดเป็นไฟบรินมาปิดผนังหลอดเลือดที่เสียหายเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด

กระบวนการหายของแผลจะเริ่มขึ้นด้วยอิทธิพลของ growth factor ที่เกล็ดเลือดสร้างขึ้น โดย platelet-derived growth factor (PDGF) จะมีผลต่อการเคลื่อนที่เข้าหาสิ่งกระตุ้นของเซลล์ เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลกับแมคโครฟาจและกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้าง mitogen แมคโครฟาจจะถูกชักนำโดย transforming growth factor-beta (TGF- β) ให้เข้าไปที่บริเวณบาดแผลและสร้างไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ คือ fibroblast growth factor (FGF), PDGF, tumour necrosis alpha (TNF- α) และ interleukin-1 (IL-1)

2) Inflammation

การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อและการแข็งตัวของเลือดกระตุ้นให้ mast cell ปลดปล่อยไฮสโตไคน์ เช่น prostaglandin และ histamine ไปเพิ่มการขยายตัวของหลอดเลือดและความสามารถในการซึมผ่านผนังของเส้นเลือดฝอย เป็นผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์เคลื่อนที่ผ่านหลอดเลือดไปยังบริเวณบาดแผลได้ นอกจากนี้ยังทำให้ของเหลวซึมผ่านหลอดเลือดเข้าไปในบริเวณบาดแผลและเนื้อเยื่อที่อยู่รอบ ๆ บาดแผลได้ส่งผลให้เกิดการบวมน้ำ (oedema) และมีอาการเจ็บปวดมากขึ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเกิดการบาดเจ็บ เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลจะเคลื่อนตัวมาที่บริเวณบาดแผล และทำหน้าที่เป็นตัวทำความสะอาดบริเวณบาดแผลโดยจับกินเศษซากเซลล์และเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี phagocytosis ทำให้เกิดเป็นน้ำหนองที่บริเวณแผล นิวโทรฟิลจะเริ่มหายหมดไปในช่วง 2-3 วันโดยนิวโทรฟิลจะเกิดการตายแบบ apoptosis แต่การทำความสะอาดแผลยังคงดำเนินต่อไปโดยเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์จะแทรกซึมไปที่บริเวณบาดแผลแล้วเปลี่ยนรูปร่างกลายเป็นแมคโครฟาจซึ่งจะปลดปล่อย PDGF กับ TGF- β ไปดึงดูดให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเคลื่อนที่เข้าไปในบริเวณบาดแผล แมคโครฟาจจะจับกินเซลล์ตาย, นิวโทรฟิลที่ได้จับกินแบคทีเรียแล้ว, องค์ประกอบภายนอกเซลล์ที่ถูกทำลาย, เศษซากเซลล์และแบคทีเรียที่บริเวณบาดแผล และจะสร้าง nitric oxide ที่สามารถต้านจุลชีพได้ เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจจะดึงดูดให้เซลล์เนื้อเยื่อบุผิวหลอดเลือด (vascular endothelial cell) ให้เข้าไปยังบริเวณบาดแผลเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการสร้างหลอดเลือดใหม่ต่อไป (angiogenesis) ระยะของการอักเสบนี้จะคงอยู่เป็นเวลาประมาณ 3 วัน สำหรับแผลที่เกิดจากการผ่าตัดหรือแผลเฉียบพลัน

3) Proliferation, Contraction และ Epithelialization

ในระยะนี้จะเกิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหลอดเลือดมาเติมเต็มบริเวณบาดแผลที่มีการสูญเสียเนื้อเยื่อเดิมไปเป็นจำนวนมากทำให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อใหม่ เรียกว่า granulation tissue มีการปลดปล่อยไฮสโตไคน์ vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast factor (bFF) และ TGF- β มากระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) เซลล์บุผิวในเส้นเลือดฝอยที่อยู่ใกล้กับบริเวณบาดแผลจะสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่เข้าไปในบริเวณบาดแผล และจะสร้างเอนไซม์มาย่อยองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) เดิมที่บริเวณแผลแล้วสร้างใหม่ เช่น คอลลาเจน เพื่อช่วยในการสร้างหลอดเลือดใหม่ หลอดเลือดใหม่ที่เกิดขึ้นในบริเวณบาดแผลจะนำพาออกซิเจนมาที่บริเวณบาดแผลสูงขึ้น และจะส่งผลให้การสร้างไฮสโตไคน์ VEGF ลดลง

การหดตัวของบริเวณบาดแผลจะเกิดขึ้นในบาดแผลที่มีลักษณะเป็นแผลเปิด โดยบริเวณขอบแผลจะเกิดการหดตัวเข้าหากัน

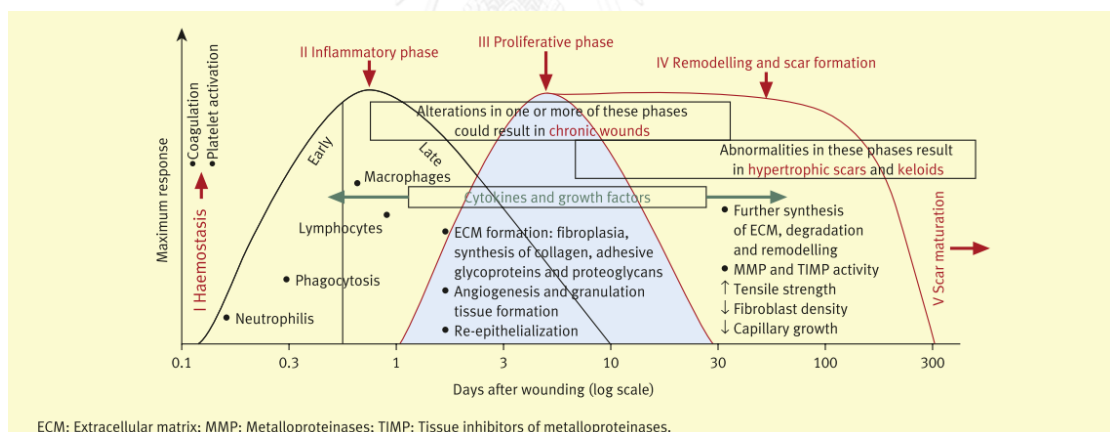
เซลล์บุผิวจะเคลื่อนตัวจากบริเวณขอบแผลไปยังพื้นผิวของบาดแผล การสร้างเนื้อเยื่อบุผิวใหม่ในกระบวนการหายของแผลแบบปฐมภูมิจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในขณะที่กระบวนการหายของแผลแบบทุติยภูมิจะเกิดการสร้างเนื้อเยื่อบุผิวใหม่ช้ากว่า โดยจะเกิดขึ้นหลังการสร้าง granulation tissue

4) Remodelling

ระยะนี้อาจใช้เวลายาวนานตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป โฟโบริบลาสควบคุมการย่อยสลายแมทริกซ์ของแผลด้วยเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) และการสังเคราะห์องค์ประกอบภายนอกเซลล์ขึ้นใหม่ (extracellular matrix) กระบวนการนี้เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และจะเพิ่มความแข็งแรงให้กับบริเวณแผลจนเกิดเป็นแผลเป็นขึ้น แต่ความแข็งแรงของแผลเป็นนี้จะน้อยกว่าบริเวณเนื้อเยื่อที่ปกติ

5) Scar maturation [2]

Fibronectin และ hyaluronan จะถูกย่อยสลายไป แต่จะเกิดการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้นแทนซึ่งแผลเป็นบริเวณผิวหนังที่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้วจะมีความแข็งแรงเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ของผิวหนังปกติ



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนของกระบวนการหายของแผลในช่วงระยะเวลาต่างๆ [2]

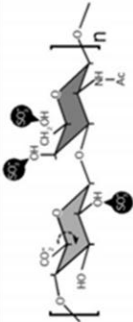
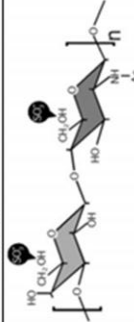
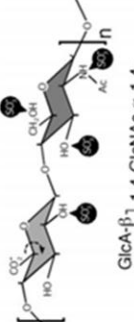
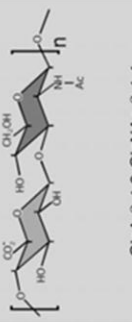
2.5 โพรตีโอไกลแคน

2.5.1 สมบัติทั่วไปของโปรตีโอไกลแคน

โปรตีโอไกลแคนเป็นไกลโคโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของสารที่เป็นองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix, ECM) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีน (protein core) และส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต คือ ไกลโคซามิโนไกลแคนส์ (glycosaminoglycan, GAGs) ซึ่งยึดเกาะกับสายของโปรตีนด้วยพันธะโคเวเลนต์ ในลำดับสายของไกลโคซามิโนไกลแคนส์เกิดขึ้นจากน้ำตาลโมเลกุลคู่เรียงตัวซ้ำ ๆ กัน โดยจะแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิดตามโครงสร้างการเรียงตัวและชนิดของโมเลกุลคู่ที่แตกต่างกัน คือ heparin sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate และ keratin sulfate นอกจากนี้ยังมีไกลโคซามิโนไกลแคนส์อีก 1 ชนิดที่ไม่มีส่วนที่เป็นโปรตีน แต่สามารถถูกจับด้วยพันธะ non-covalent กับโปรตีโอไกลแคนได้คือ hyaluronan สรุปได้ว่ามีไกลโคซามิโนไกลแคนส์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีโอไกลแคนอยู่ทั้งหมด 5 ชนิด คือ [5]

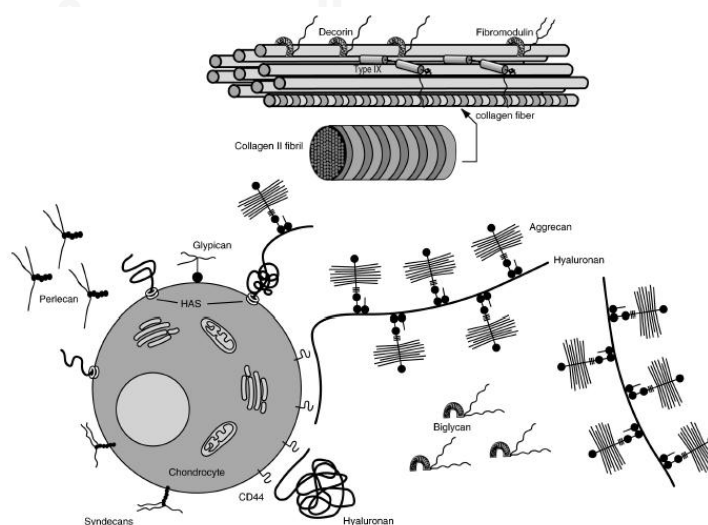
1. Chondroitin sulfate ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลคู่ระหว่าง $[\beta 1-4]$ -D-Glucuronic acid และ $[\beta 1-3]$ N-acetyl-D-galactosamine เรียงตัวซ้ำ ๆ กัน หมู่ซัลเฟตจะอยู่ในส่วนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 หรือ 6 ของ hexosamine และ อาจจะพบที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของ hexuronic acid
2. Dermatan sulfate ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลคู่ระหว่าง $[\beta 1-4]$ -L-Iduronic acid และ $[\alpha 1-3]$ N-acetyl-D-galactosamine เรียงตัวซ้ำ ๆ กัน หมู่ซัลเฟตจะอยู่ในส่วนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 หรือ 6 ของ hexosamine และ อาจจะพบที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของ hexuronic acid
3. Keratan sulfate ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลคู่ระหว่าง $[\beta 1-3]$ -D-Galactose และ $[\beta 1-4]$ N-acetyl-D-galactosamine เรียงตัวซ้ำ ๆ กัน หมู่ซัลเฟตจะอยู่ในส่วนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ hexosamine และ อาจจะพบที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาล galactose
4. Heparan sulfate ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลคู่ระหว่าง $[\alpha 1-4]$ -L-Iduronic acid และ $[\alpha 1-4]$ N-acetyl-D-glucosamine หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ระหว่าง $[\alpha 1-4]$ -D-Glucuronic acid และ $[\beta 1-4]$ N-acetyl-D-glucosamine เรียงตัวซ้ำ ๆ กัน หมู่ซัลเฟตจะอยู่ในส่วนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2, 3 หรือ 6 ของ hexosamine และ คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของ hexuronic acid
5. Hyaluronan ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลคู่ระหว่าง $[\beta 1-4]$ -D-Glucuronic acid และ $[\beta 1-3]$ N-acetyl-D-glucosamine เรียงตัวซ้ำ ๆ กัน ไม่พบหมู่ซัลเฟต

ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบของไกลโคซามินโกลิโคแซนส์ชนิดต่าง ๆ (GlcA, glucuronic acid; IdoA, iduronic acid; GlcNAC, N-acetyl glucosamine; GalNAC, N-acetyl galactosamine; Gal, galactose; GlcNSO₃, glucosamine-N-sulfate) [5-7]

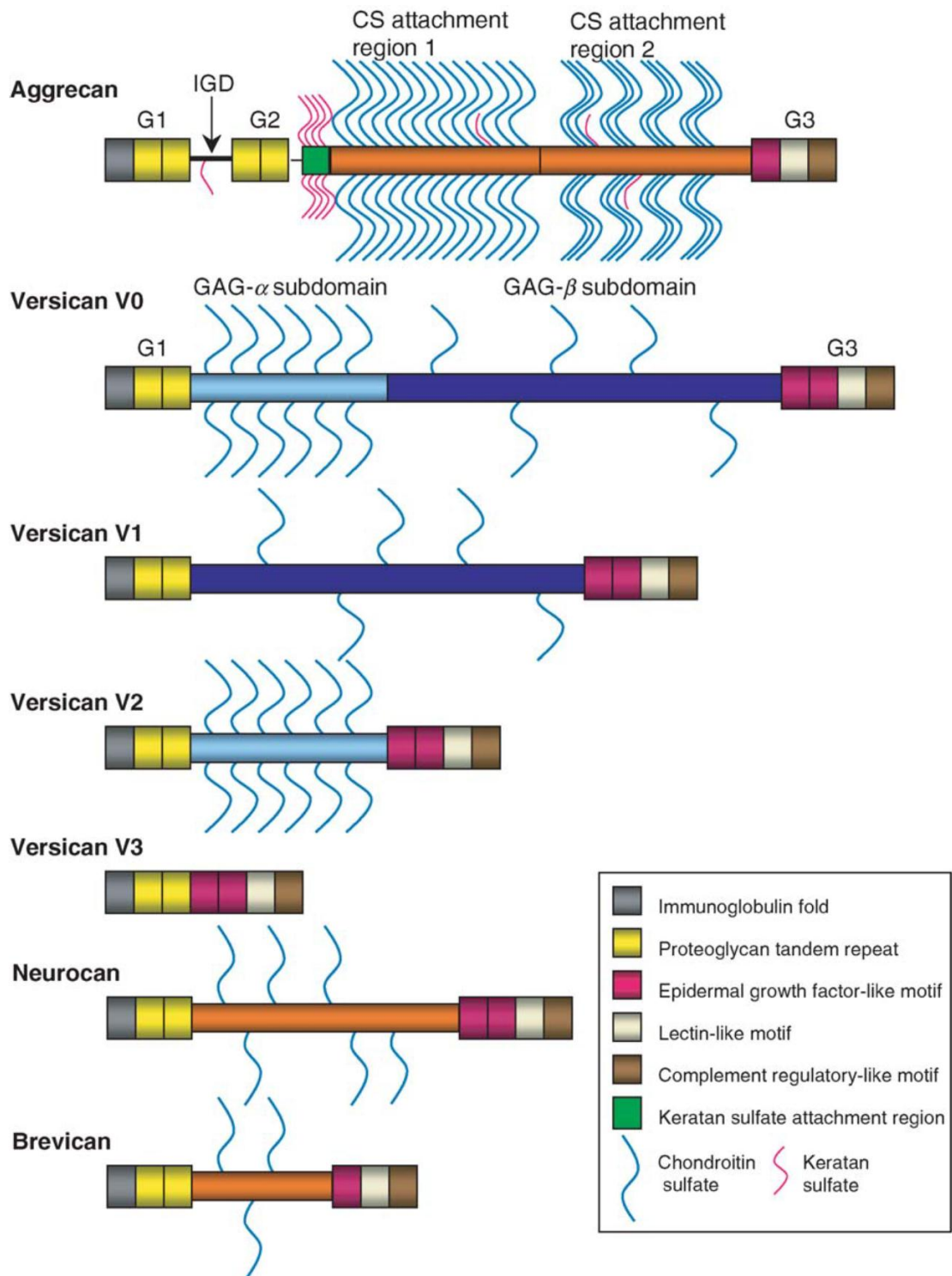
ชนิด	องค์ประกอบเป็นโครงสร้าง	ลักษณะโครงสร้างของน้ำตาลโมลกุลในไกลโคซามินโกลิโคแซนส์	จำนวนน้ำตาลโมลกุลต่อหนึ่งสาย
Chondroitin sulfate	-GlcA-GalNAC-GlcA-GalNAC-	 <p>GlcA-β-1,3-GalNAC-β-1,4-IdoA-α-L</p>	50
Dermatan sulfate	-IdA-GalNAC-GlcA-GalNAC-		50
Keratan sulfate	-Gal-GlcNAC-Gal-GlcNAC-	 <p>GlcA-β-1,3-Gal-β-1,3-GlcA-β-1,3-Gal-β-1,4-GlcNAC-β-1,3-</p>	15
Heparan sulfate	-IdA-GlcNSO ₃ -GlcA-GlcNAC-	 <p>GlcA-β-1,4-GlcNAC-α-L-1,4-IdoA-α-L</p>	50
Hyaluronan	-GlcA-GlcNAC-GlcA-GlcNAC-	 <p>GlcA-β-1,3-GlcNAC-β-1,4-</p>	10,000

2.5.2 โปรติโอไกลแคนในกระดูกอ่อน

ภายในกระดูกอ่อน (cartilage) มีโปรติโอไกลแคนอยู่หลายชนิดกระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ของกระดูกอ่อน ดังรูปที่ 2.3 ซึ่งโปรติโอไกลแคนที่พบเป็นส่วนมากและเป็นโครงสร้างหลักของกระดูกอ่อน คือ aggrecan โดย aggrecan นี้มีขนาดของโปรตีนแกนกลางประมาณ 220 kDa [5] ซึ่งจะประกอบด้วย 3 globular domain คือ G1, G2, G3 ดังรูปที่ 2.4 G1 เป็นส่วนที่อยู่ติดกับปลายทางด้านหมู่อะมิโนของโปรตีนแกนกลางซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากันของ aggrecan กับ hyaluronan และโปรตีนเชื่อม (link protein) ระหว่าง G1 และ G2 จะมีส่วนที่เรียกว่า interglobular domain ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนที่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase โดยในส่วนนี้จะเกี่ยวข้องกับการ catabolism ของ aggrecan ในส่วนของ G2 ยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน และส่วนสุดท้ายคือส่วนของ G3 ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ติดกับปลายทางด้านหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนแกนกลางโดยในส่วนนี้จะมีผลต่อส่วนประกอบของ matrix อื่น ๆ และยังมีโครงสร้างส่วนหนึ่งที่มีลักษณะเหมือน epidermal growth factor อยู่ที่ G3 [8] ระหว่าง G2 และ G3 ของ aggrecan จะถูกยึดเกาะด้วยไกลโคซามิโนไกลแคนชนิด keratin sulfate และ chondroitin sulfate ด้วยความที่ aggrecan มีสภาพความเป็นประจุลบที่สูงจึงส่งผลให้ดึงดูดและจับกับน้ำได้ดี ช่วยรักษาน้ำในเนื้อเยื่อและต้านต่อแรงบีบอัดได้ โปรติโอไกลแคนที่อยู่บริเวณพื้นผิวเซลล์ (cell surface proteoglycans) คือ syndecans และ glypican โปรติโอไกลแคนที่มีขนาดเล็กและมีส่วนของโปรตีนที่มี leucine เรียงต่อกันมาก (small leucine-rich proteoglycans) คือ decorin, biglycan, fibromodulin, lumican และ epiphygan โปรติโอไกลแคนที่อยู่บริเวณเมมเบรน (basement membrane proteoglycan) คือ perlecan [9]



รูปที่ 2.3 โปรติโอไกลแคนชนิดต่าง ๆ ภายในกระดูกอ่อน (cartilage) [9]



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของโปรติโอไกลแคนชนิดต่าง ๆ ที่มีไกลโคซามิโนไกลแคนส์ชนิด chondroitin sulfate เป็นหลัก (CS, chondroitin sulfate; IGD, interglobular domain) [5]

ตารางที่ 2.4 แสดงตัวอย่างวิธีการสกัดโปรตีนโกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลา

สิ่งมีชีวิต	ส่วนที่ใช้สกัด	วิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์	ผลการสกัด	อ้างอิง
ปลาเซลมอน	กระดูกอ่อนส่วนจมูก	<ol style="list-style-type: none"> 1. แ่งกระดูกอ่อนจมูกหนัก 62 กรัมใน NaCl เข้มข้น 0.9% 2. ตัดเป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำมาบดให้ละเอียด 3. สกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 4% ปริมาตร 10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 4. นำไปกรองและปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออก 5. นำสารที่สกัดในส่วนที่เป็นของเหลวไปตกตะกอนด้วยเอทานอลที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บส่วนที่ตกตะกอน 6. นำส่วนที่ตกตะกอนไปละลายด้วยการดออะซิติกความเข้มข้น 4% แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการ dialysis ด้วยน้ำ โดยใช้เยื่อแผ่นเมมเบรนที่มี molecular mass cut off ที่ 1,000 กิโลดาลตัน แล้วทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (lyophilization) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. โปรตีนโกลแคนแห้งหนัก 240 มิลลิกรัม 2. มวลโมเลกุลของโปรตีนโกลเท่ากับ 344 กิโลดาลตัน 3. โปรตีนโกลแคนที่ได้มีปริมาณโปรตีน 7% 4. โปรตีนโกลแคนนี้มีอัตราส่วนของ hexosamine, hexuronic acid และ sulfate เท่ากับ 1.00:0.99:0.67 ตามลำดับ 	[10]

สิ่งมีชีวิต	ส่วนที่ใช้สกัด	วิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์	ผลการสกัด	อ้างอิง
ปลาแซลมอน	กระดูกอ่อนส่วนจมูก	<p>1. ลอกผิวหนังของกระดูกอ่อนบริเวณจมูกหนัก 1 กิโลกรัม</p> <p>2. บดให้ละเอียดแล้วล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85%</p> <p>3. สกัดโปรตีนโอไกลแคนโดยใช้ 2 เกล็ดวิธี ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส</p> <p>3.1 นำกระดูกอ่อนที่บดแล้วมาล้างด้วย acetone ทั้งหมดและหลังการกำจัดไขมันออก แล้วนำกระดูกอ่อนที่แห้งแล้ว 33.5 กรัม มาสกัดด้วย guanidinium chloride (GdnHCl) เข้มข้น 4 M ใน sodium acetate buffer เข้มข้น 50 mM pH 6.0 ซึ่งมี protease inhibitor จากนั้นกรองกากทิ้งแล้วเก็บส่วนน้ำมาตกตะกอนด้วย ethanol และละลายใน distilled water ก่อนที่จะตกตะกอนอีกครั้ง</p> <p>3.2 นำกระดูกอ่อนหนัก 200 กรัมไปปั่นรวมใน 4%CH₃COOH ปริมาตร 10 ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วกรองเอาส่วนน้ำไปตกตะกอนด้วย ethanol แล้วนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี dialysis โดยใช้ cellulose ester membrane (exclusion limitation : M_w 1,000,000) ใน distilled water แล้วนำไปทำแห้งด้วยความเย็นจัด (lyophilization)</p>	<p>ผลการสกัด</p> <p>1. วิธีที่ 1 ได้ผงหนัก 15.6 กรัม โดย 1 กรัม ประกอบด้วย uronic acid 375 มิลลิกรัมและ โปรตีน 63 มิลลิกรัม</p> <p>2. วิธีที่ 2 ได้ผงหนัก 0.96 กรัม โดย 1 กรัม ประกอบด้วย uronic acid 420 มิลลิกรัม และ โปรตีน 18 มิลลิกรัม</p> <p>3. การสกัดโปรตีนโอไกลแคนในแต่ละวิธีจะได้องค์ประกอบต่างๆของโปรตีนโอไกลแคนดังตารางที่ 5</p>	[11]

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบต่างๆ ของโปรตีนโกลแคนจากกระดูกอ่อนส่วนจมูกของปลาแซลมอน [11]

ชนิดของกรดอะมิโน	ปริมาณ (คิดจาก 1 ส่วนใน 1,000 ส่วน)	
	สกัดด้วย guanidinium chloride ความเข้มข้น 4 โมลาร์	สกัดด้วย CH ₃ COOH ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
Asp,Asn	95	77
Thr	57	54
Ser	109	134
Glu, Gln	110	103
Gly	161	175
Ala	51	62
Cys	35	21
Val	62	56
Met	16	8
Ile	47	34
Leu	94	71
Tyr	28	23
Phe	24	30
Lys	13	53
His	15	17
Arg	29	28
Pro	54	54
องค์ประกอบที่ได้	น้ำหนักโมเลกุล	
โปรตีนโกลแคน	360,000 – 6,600,000	130,000 – 3,300,000
โปรตีนแกนกลาง	25,000 – 290,000	11,000 – 500,000
ไกลโคซามิโนไกลแคนส์	49,000 – 920,000	34,000 – 66,000
Glycosaminoglycan	ปริมาณ	
จำนวนน้ำตาลโมเลกุลคู่	121.7 – 2313.7	83.9 – 1659.4

จำนวนของสาย	1.9 – 35.9	0.9 – 20.7
ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว	ปริมาณ (คิดเป็นน้ำตาล 1 nmol ต่อกรดยูโรนิก 1,000 nmol)	
Galactosamine, GalN	469.0 ± 40.5	415.1 ± 34.4
Glucosamine, GlcN	7.7 ± 2.1	5.3 ± 1.7
Galactose, Gal	16.2 ± 10.9	12.8 ± 6.7
Xylose, Xyl	5.2 ± 2.1	5.2 ± 2.6
	จำนวนซัลเฟตต่อน้ำตาลโมเลกุลคู่ 1 ยูนิต	
หมู่ซัลเฟต	0.86 ± 0.01	0.85 ± 0.01

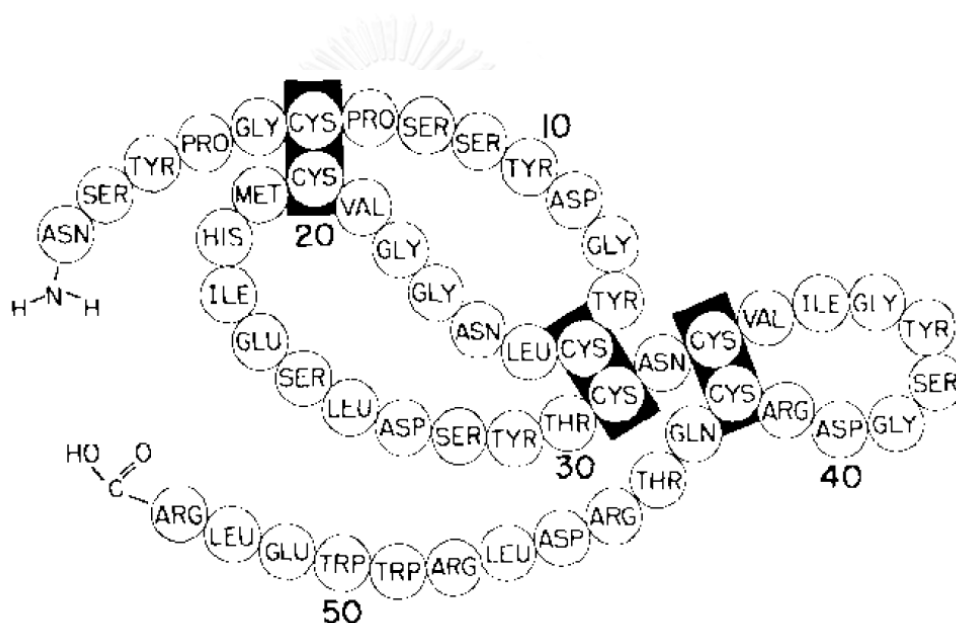
2.5.3 หน้าที่ของโปรตีนโอไกลแคนต่อกระบวนการหายของแผล

โปรตีนโอไกลแคนมีส่วนของโครงสร้างหนึ่งซึ่งมีลักษณะเหมือน epidermal growth factor อยู่ที่ตำแหน่ง G3 domain ของโปรตีนแกนกลางที่เป็นโครงสร้างหลักของโปรตีนโอไกลแคนซึ่งสามารถถูกจับ (recognized) ด้วย anti-mouse EGF [8] จึงอาจจะกล่าวได้ว่าโปรตีนโอไกลแคนอาจจะมีคุณสมบัติหนึ่งที่คล้ายกับ epidermal growth factor ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ (replication), การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (proliferation), การเพิ่มจำนวนเคลลาตินของเนื้อเยื่อผิวหนัง (keratinization) และที่สำคัญคือ ช่วยเร่งกระบวนการหายของแผลได้ (wound healing) [12] นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนโอไกลแคนหลายชนิดที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อดังตารางที่ 2.6

โปรตีนโอไกลแคนสามารถช่วยเร่งกระบวนการหายของแผลใหม่ได้โดยการส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังให้มากขึ้นโดยมีการศึกษาพบว่าโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (motif) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเหมือน epidermal growth factor โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน 40 ตัว มีพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง กรดอะมิโนชนิด cysteine จำนวน 3 พันธะ ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าวนี้เป็นโครงสร้างส่วนหนึ่งของโปรตีนแกนกลางบริเวณตรงส่วน G3 domain ของโปรตีนโอไกลแคนชนิด versican สามารถเร่งการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หรือเซลล์ผิวหนังให้มากขึ้นได้ซึ่งถ้าขาดโครงสร้างในส่วนนี้ไปก็จะส่งผลให้ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังลดลง [13] นอกจากนี้ยังมีการนำส่วนของ G3 domain ของโปรตีนโอไกลแคนชนิด versican มาศึกษาต่อโดยพบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างและการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่ออกทดแทนและกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้โดยเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะ (adhesion), การเพิ่มจำนวน (proliferation) และการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณบาดแผล (migration) ของเซลล์ผิวหนังตลอด

เลือด และยังส่งเสริมให้มีการแสดงออกของ fibronectin และ VEGF ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายของแผลอีกด้วย [14]

โปรตีนไกลแคนสามารถส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ชนิดอื่นได้อีก นอกเหนือจากเซลล์ผิวหนังและเซลล์บุผิวหลอดเลือด เช่น พบว่า NG2 chondroitin sulfate proteoglycan บนพื้นผิวเซลล์ ตั้งต้นของเซลล์โอลิโกเดนโดรไซต์ (oligodendrocyte progenitor cells) ช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์โอลิโกเดนโดรไซต์ในสมองส่วนหลัง (cerebellum) ของหนู [15] และ NG2 chondroitin sulfate proteoglycan ในไตของหนูมีผลทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ mesangial cell และสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix production) เป็นต้น [16]



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ epidermal growth factor ของหนู (โพลีเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 53 ตัว และพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลจำนวน 3 พันธะ)

ตารางที่ 2.6 โพรตีโอไกลแคนชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (Tissue Repair) [17]

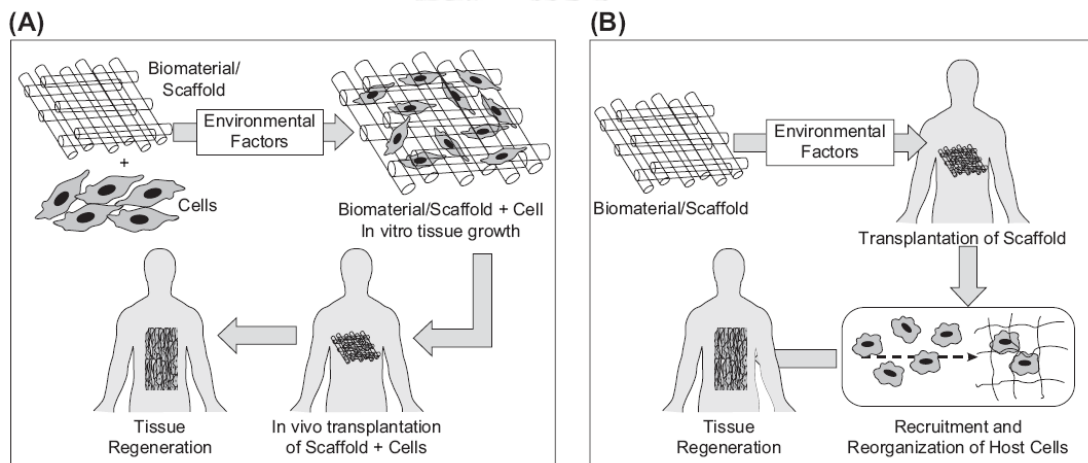
Origin/nomenclature	GAG chains ^a	Putative functions
Extracellular proteoglycans		
Cartilage/aggrecan	>100CS, 20–30 KS	Binds to HA, provides mechanical support
Fibroblasts/versican	12–15 CS	Endothelial regeneration
Endothelial cells	DS	Cell proliferation/migration
Fibroblasts/HA ^b	HA	Bind collagen type I, II
Connective tissues/decorin	1 CS/DS	Modulate collagen fibrillogenesis
Connective tissues/biglycan	2 CS/DS	Regulate cell growth
Connective tissues/fibromodulin	1 KS	Binds to collagen fibrils
Cartilage, vitreous humor/ collagen type IX PG	1 CS	
Basement membranes/ Perlecan	HS	Modulate assembly of basement membranes, provides filtration barrier
Cell surface proteoglycans		
Mammary epithelial cells/ Syndecan	1–2 CS/1–2 HS	Role in morphogenesis; link cytoskeleton to extracellular matrix
Fibroblasts/betaglycan	CS/HS	Cell surface receptor for TGF- β
Endothelial cells/ thrombomodulin	1 CS	Regulate blood coagulation
Hematopoietic cells/ CD44	CS	Mediate cell adhesion, HA receptor
Fibroblasts/transferrin receptor	4–6 HS	Mediate uptake of transferrin
Intracellular/proteoglycans		
Mast cells	Serglycin	Store and modulate activity of granular proteases
Platelets		
Macrophage-like cells		Prevent blood coagulation
Eosinophils		
Chromaffin granules	1–2 CS/DS	

^a Abbreviations: HA = hyaluronan; CS = chondroitin sulfate; DS = dermatan sulfate; HS = heparan sulfate; KS = keratan sulfate.

^b Hyaluronan is a glycosaminoglycan, not strictly speaking a proteoglycan. However, it may be considered in this group as a major extracellular polysaccharide that does not bind to proteoglycan core protein through a noncovalent interaction.

2.4 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นสาขาวิชาที่รวมความรู้จากหลาย ๆ สาขาวิชามาประยุกต์ใช้ร่วมกัน เช่น วิศวกรรมศาสตร์, ชีววิทยา และแพทยศาสตร์ เป็นต้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรักษา ซ่อมแซม ปรับปรุงและฟื้นฟูการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับความเสียหายหรือมีความบกพร่องให้กลับมาทำงานได้ดังปกติหรือใกล้เคียงกับสภาวะปกติมากที่สุด และเพื่อพัฒนาอุปกรณ์หรือสิ่งซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ได้รับความเสียหายหรือสูญเสียไป เช่น การสร้างเนื้อเยื่อเทียมภายนอกร่างกายหรือในห้องปฏิบัติการแล้วนำไปปลูกถ่ายในร่างกายมนุษย์เพื่อทดแทนเนื้อเยื่อบางส่วนที่เสียหายไป หรืออาจจะสร้างชิ้นงานเป็นรูปทรงสามมิติที่เรียกว่าโครงสร้างสคัลโฟลด์ (scaffold) แล้วนำไปปลูกถ่ายในร่างกายมนุษย์ชั่วคราวเพื่อดึงดูดให้เซลล์ภายในร่างกายเข้ามายึดเกาะและเกิดการเจริญเติบโตกลายเป็นเนื้อเยื่อ เป็นต้น [18-20]



รูปที่ 2.6 วิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ : (A) การเลี้ยงเซลล์ในโครงสร้างสคัลโฟลด์ให้เจริญเติบโตกลายเป็นเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการก่อนปลูกถ่ายไปยังร่างกาย; (B) การปลูกถ่ายโครงสร้างสคัลโฟลด์ไปยังร่างกายแล้วปล่อยให้เซลล์ในร่างกายเข้ามาเจริญเติบโตกลายเป็นเนื้อเยื่อภายในโครงสร้างสคัลโฟลด์ที่ฝังอยู่ภายในร่างกาย

วิศวกรรมเนื้อเยื่ออาศัยองค์ประกอบหลัก 3 ประการ ได้แก่

1. เซลล์ แหล่งของเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดก็คือเซลล์ของผู้ป่วยเองหรือผู้ที่รับการปลูกถ่าย (autologous cells) เพราะถ้าเป็นเซลล์ของผู้อื่น (allogeneic cells) หรือเซลล์จากสิ่งมีชีวิตสปีชีส์อื่น (xenogeneic cells) มักจะเกิดปัญหาจากการที่ร่างกายของผู้ป่วยปฏิเสธเซลล์หลังการปลูกถ่าย ชนิดของเซลล์ที่มีการนำมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ stem cells ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิดหลัก ๆ ได้แก่ embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells และ adult stem cells

2. โครงสร้างสแคลโฟลด์หรือโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold)

โครงสร้างสแคลโฟลด์หรือโครงเลี้ยงเซลล์ถูกใช้เป็นแหล่งที่อยู่ชั่วคราวสำหรับให้เซลล์เคลื่อนที่เข้ามา ยึดเกาะ เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเจริญเติบโตเกิดกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทน เนื้อเยื่อที่เสียหายไปโดยลักษณะของโครงสร้างสแคลโฟลด์ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้งานทางด้าน วิศวกรรมเนื้อเยื่อควรมีคุณลักษณะที่สำคัญดังต่อไปนี้ คือ [18, 21, 22]

- 1) มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่ก่อให้เกิดการตอบสนองที่ไม่พึงประสงค์หลังจากการปลูกถ่าย โครงสร้าง สแคลโฟลด์ไปยังร่างกาย เช่น การปฏิเสธสิ่งปลูกถ่ายโดยระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย
- 2) สามารถถูกย่อยสลายและดูดซึมได้ทางชีวภาพแล้วถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยสามารถควบคุม อัตราการย่อยสลายและการดูดซึมให้สัมพันธ์หรือสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อ ที่เกิดขึ้นใหม่ภายในโครงสร้างสแคลโฟลด์ได้
- 3) เป็นโครงสร้างสามมิติที่มีความพรุนสูงโดยประกอบด้วยรูพรุนจำนวนมากที่มีการเชื่อมต่อถึงกันเพื่อ เป็นพื้นที่ว่างให้เซลล์สามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปแล้วเกิดการเจริญเติบโตไปเป็นเนื้อเยื่อและเกิดการ สร้างหลอดเลือดขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นช่องทางสำหรับการไหลผ่านของสารอาหารและของเสีย
- 4) คุณสมบัติทางเคมีของพื้นผิวโครงสร้างสแคลโฟลด์มีความเหมาะสมสำหรับให้เซลล์เข้ามายึดเกาะ เกิดการเคลื่อนที่ เกิดการเพิ่มจำนวน และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะ อย่างได้
- 5) มีคุณสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อในบริเวณที่ทำการปลูกถ่าย
- 6) มีโครงสร้างและหน้าที่ทางชีววิทยาที่คล้ายคลึงกับสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) และสนับสนุนให้เกิดการสร้างสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์

3. สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมซึ่งส่งผลต่อการอยู่รอด การเจริญเติบโต การทำงาน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ ได้แก่ สารอาหาร, ออกซิเจน และสารชีวโมเลกุล หรือสารสื่อต่าง ๆ เช่น cytokine, growth factor และ extracellular matrix เป็นต้น

2.5 วัสดุชีวภาพ

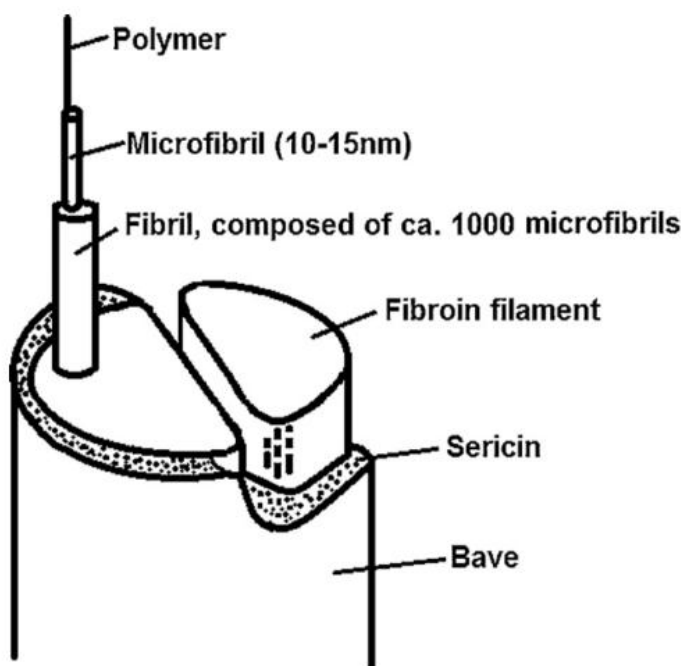
พอลิเมอร์ที่มีแหล่งกำเนิดมาจากธรรมชาติจำพวกโพรตีน เช่น คอลลาเจน, เจลาติน และ ไฟโบรอินจากเส้นใยไหมเป็นวัสดุชีวภาพประเภทหนึ่งที่ถูกนำมาสร้างเป็นโครงสร้างสแคลโฟลด์หรือ โครงเลี้ยงเซลล์สำหรับนำไปปลูกถ่ายในร่างกายมนุษย์เพื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่สูญเสียไปชั่วคราว [18]

2.5.1 ไฟโบรอิน

สมบัติทั่วไปของไฟโบรอิน

ไฟโบรอินเป็นวัสดุทางชีวภาพซึ่งเป็นโพรตีนที่ได้จากไหมซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิต จำพวก arthropod ในระยะ metamorphosis เช่น หนอนไหม แมงมุม และผึ้ง เป็นต้น ไหมมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200-350 กิโลดาลตันหรือสูงกว่านี้ได้ [23] เส้นใยไหม 1 เส้น ประกอบด้วยเส้นใยไฟโบรอิน (fibroin) 2 เส้นซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เนื่องจากมีโครงสร้างของกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) กับอะลานีน (alanine) ในปริมาณ มาก และมีเซรีซิน (sericin) ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ห่อหุ้มเส้นใยไฟโบรอินทั้งสองเส้นไว้ [24] ดังรูปที่ 2.7 เส้นใยไหมจากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะมีสมบัติในการยึดตัว ต่างกันดังตารางที่ 2.7 เส้นใยไฟโบรอินประกอบด้วยสายหนัก (heavy (H) chain) ซึ่งเป็น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 390 กิโลดาลตัน เกิดจากการ เรียงตัวซ้ำ ๆ กันของกรดอะมิโนไกลซีนต่อกับกรดอะมิโนอีก 4 ชนิด คือ อะลานีน (alanine), เซอรีน (serine), ทรีโอนีน (Threonine) และ วาลีน (Valine) สามารถเกิดเป็น โครงสร้างแบบ anti-parallel และ β -sheet ได้ อีกส่วนหนึ่งเป็นสายเบา (light (L) chain) ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ต่อกับสายหนักด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน ทั้งสายหนักและสายเบาจะสร้างพันธะ non-covalent กับไกลโคโพรตีน P25 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน [23, 25] ไฟโบรอิน ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีซัลเฟอร์มากกว่ากรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ [26] ดังตารางที่ 2.8

ไฟโบรอินมีโครงสร้างหลักสองแบบคือ โครงสร้างแบบปฐมภูมิ (primary structure) และแบบทุติยภูมิ (secondary structure) โดยโครงสร้างแบบปฐมภูมิจะ ประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโน glycine, alanine, serine, valine และ tyrosine เรียง ตัวซ้ำ ๆ กัน เช่น Gly-Ala- Gly-Ala-Ser, Gly-Ala- Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Tyr เป็นต้น เมื่อ โครงสร้างแบบปฐมภูมิสร้างพันธะต่อกันในแนวนานที่มีทิศทางสวนกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ก็จะทำให้เกิดเป็นโครงสร้างแบบทุติยภูมิหรือเป็นโครงสร้างแบบ β -sheet ขึ้น [25]



รูปที่ 2.7 ลักษณะโครงสร้างเส้นใยไหมของหนอนไหม [27]

ตารางที่ 2.7 สมบัติการยืดตัว (tensile) ของไหมจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน [23]

Source organisms	Tensile strength (g/den)	Tensile modulus (g/den)	Breaking strain (%)
<i>Bombyx mori</i>	4.3–5.2	84–121	10.0–23.4
<i>Antheraea mylitta</i>	2.5–4.5	66–70	26–39
<i>Philosamia cynthia ricini</i>	1.9–3.5	29–31	28.0–24.0
<i>Coscinocera hercules</i>	5 ± 1.2	87 ± 17	12.1 ± 5.1
<i>Hyalophora euryalus</i>	2.7 ± 0.9	59 ± 18	11.1 ± 5.8
<i>Rothschildia hesperis</i>	3.3 ± 0.8	71 ± 16	9.5 ± 4.4
<i>Eupackardia calleta</i>	2.8 ± 0.7	58 ± 18	11.8 ± 5.5
<i>Rothschildia lebeau</i>	3.1 ± 0.8	54 ± 14	15.5 ± 6.7
<i>Antheraea oclea</i>	3.1 ± 0.8	57 ± 15	14.5 ± 6.6
<i>Hyalophora gloveri</i>	2.8 ± 0.4	48 ± 13	19.3 ± 6.9
<i>Copaxa multifenestrata</i>	0.9 ± 0.2	39 ± 6	4.1 ± 2.7

ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในเส้นใยไฟโบรอิน [26]

กรดอะมิโน	ปริมาณ (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยโมล)	
ชนิดไม่มีขั้ว (nonpolar)	Gly	52.1
	Ala	27.1
	Tyr	3.8
	Val	2.8
	Ile	1.0
	Leu	2.2
	Pro	1.5
	Phe	1.5
ชนิดมีขั้ว (polar)	Ser	5.8
	Glu	0.6
	Arg	0.5
	Thr	0.5
	Asp	0.3
	Lys	0.3

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility)

ไฟโบรอินเป็นวัสดุทางชีวภาพที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จึงถูกนำไปใช้ในทางการแพทย์โดยนำไปขึ้นรูปเป็นรูปทรงต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับการใช้งาน เช่น หลอดเลือดเทียม เป็นต้น โดยได้มีการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro*) เช่น พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากน้ำคร่ำสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวของหลอดเลือดเทียมที่ทำจากไฟโบรอินแล้วสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ (proliferation) [28] นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์บุผิวหลอดเลือดของหนูสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวแผ่นฟิล์มที่ทำจากไฟโบรอินและสามารถเจริญเติบโตได้ [29] และ เซลล์ไฟโบรบลาสต์กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือดของหนูสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ในโครงเลี้ยงเซลล์ หรือแผ่นเนื้อเยื่อที่ทำมาจากไฟโบรอิน [30] เป็นต้น

การย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradation)

ไฟโบรอินสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease เช่น protease XIV จาก *Streptomyces griseus* โดยส่งผลให้มวล, เส้นผ่านศูนย์กลาง และความแข็งแรงของเส้นใย โปรตีนไฟโบรอินลดลงได้ [31]

Wongpanit และคณะ (2009) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำมาจากไฟโบรอินสามารถถูกย่อยสลายตัวได้ในใต้ชั้นผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู [32]

การประยุกต์ใช้ไฟโบรอิน

ไฟโบรอินถูกนำมาใช้ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีสมบัติที่สำคัญ คือ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility), มีการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradation), มีสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม, มี immunogenicity ต่ำ และสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายได้

ตัวอย่างการนำไปใช้ประโยชน์ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น Zeng และคณะ (2014) นำไฟโบรอินมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนสูง (porous scaffold) แล้วนำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ nucleus pulposus เพื่อช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ (attachment), การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) [33] นอกจากนี้ยังมีการนำไฟโบรอินมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี freeze-drying และ salt-leaching แล้วนำไปใช้เพาะเลี้ยง chondrocyte ในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใต้ hydrodynamic force พบว่าการขึ้นรูปด้วยวิธี salt-leaching จะทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดของรูใหญ่กว่าและมีความพรุนมากกว่าส่งผลให้ chondrocyte เพิ่มจำนวน (proliferation) สูงขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) ไปทำหน้าที่เฉพาะ มีการกระจายตัวไปทั่วทั้งโครงเลี้ยงเซลล์เท่า ๆ กัน แต่มีการยึดเกาะของเซลล์ (attachment) น้อยกว่า [34]

2.5.2 เจลาติน

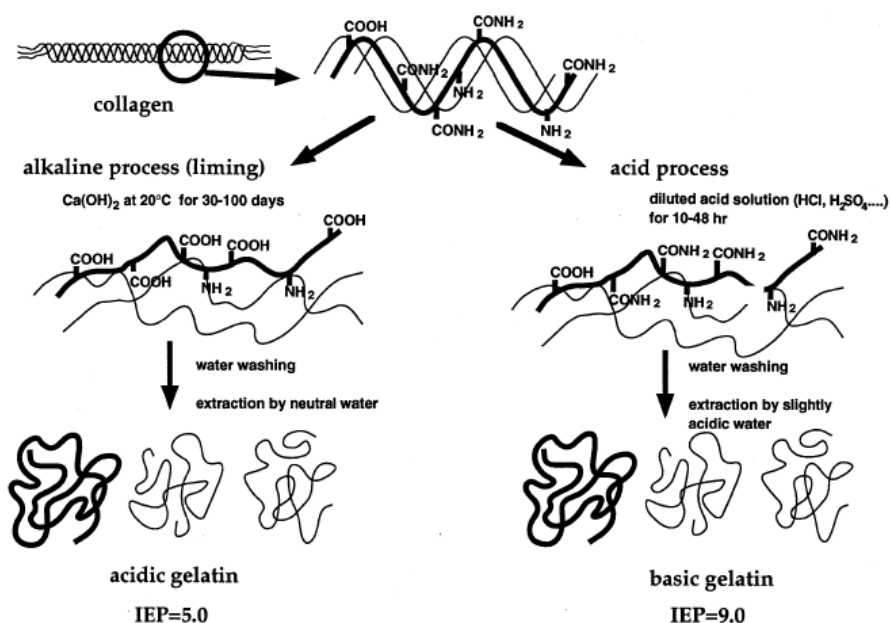
สมบัติทั่วไปของเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่แปลงสภาพมาจากคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่สกัดได้จากกระดูกหรือหนังสัตว์ เช่น หมู, วัว, สัตว์ปีกและปลา เป็นต้น โดยจะนำคอลลาเจนที่สกัดได้นี้มาผ่านกระบวนการ partial hydrolysis เพื่อแปลงสภาพเป็นเจลาติน ถ้าแบ่งชนิดของ

เจลาตินออกตามวิธีการสกัดจะแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ เจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี [35]

เจลาตินชนิดเอ (gelatin A or basic gelatin) ได้จากการนำคอลลาเจนไปผ่านกระบวนการ hydrolysis โดยใช้ตัวทำละลายกรดในการสลายพันธะบางส่วนของคอลลาเจน เป็นระยะเวลาประมาณ 10-48 ชั่วโมง กระบวนการนี้จะเกิดปฏิกิริยากับหมู่เอไมต์ได้น้อย ทำให้มีค่า isoelectric point ประมาณ 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจน เหมาะสำหรับใช้ผลิตเป็นตัวนำส่งยาหรือโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด

เจลาตินชนิดบี (gelatin B or acidic gelatin) ได้จากกระบวนการ hydrolysis ที่หมู่เอไมต์ของคอลลาเจนโดยใช้ตัวทำละลายเบสในการสลายพันธะบางส่วนของคอลลาเจน เป็นระยะเวลาประมาณ 30-100 วัน กระบวนการนี้จะได้เจลาตินที่มีหมู่คาร์บอกซิลในปริมาณสูงซึ่งเป็นผลให้มีประจุเป็นลบและมีค่า isoelectric point ประมาณ 5.0 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าคอลลาเจน เหมาะสำหรับใช้ผลิตเป็นตัวนำส่งยาหรือโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส



รูปที่ 2.8 กระบวนการเตรียมเจลาตินชนิดเอและบีจากคอลลาเจน [35]

สมบัติทางกายภาพและเคมี

เจลาตินเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว มีสีเหลือง มีความเปราะค่อนข้างที่จะไม่มีกลิ่นและรสชาติ มีความชื้นประมาณร้อยละ 8-13 ความหนาแน่นประมาณ

1.3-1.4 จะเกิดการบวมได้เมื่อแช่อยู่ในน้ำ และสามารถละลายเป็นสารละลายได้ในน้ำอุ่น โดยอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของเถ้าถ่าน ขั้นตอนการผลิต ความร้อนและความเข้มข้นมีผลต่อสารละลายเจลาติน เจลาตินละลายได้ในกลีเซอรอล, โพรพิลีนไกลคอล, กรดอะซิติก, ฟอรัมาไมด์, เบนซีน, อะซิโตน, แอลกอฮอล์แบบปฐมภูมิ และ ไตเมทิลฟอรัมาไมด์ เป็นต้น นอกจากนี้เมื่อเจลาตินได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานจะทำให้ความแข็งแรงของเจล (gel strength) และความหนืด (viscosity) ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญที่สุดของเจลาตินค่อย ๆ ลดลง กล่าวคือเจลาตินสามารถละลายน้ำได้ในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เจลาตินเปลี่ยนโครงสร้างเป็นขด (coil conformation) แต่สามารถกลับมาแข็งเป็นเจลได้อีกเมื่อได้รับอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) และจะเปลี่ยนโครงสร้างกลับไปเป็นเกลียว (helix) ความแข็งแรงของเจลจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของสายแอลฟาและเบต้าที่เป็นส่วนประกอบของเจลาติน, ความเข้มข้นของเจล ซึ่งถ้ามีความเข้มข้นมากก็จะเป็นของแข็งมาก, อุณหภูมิ, เวลา, สารที่ผสมเข้าไป (additive) และค่าความเป็นกรดต่าง สำหรับความหนืดของเจลาตินนั้นจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉพาะ degree ของ oligomerisation ของสายแอลฟา, ค่าความเป็นกรดต่าง พบว่าที่ isoelectric point จะมีความหนืดน้อยที่สุด แต่ที่ค่าต่ำหรือสูงกว่า isoelectric point ความหนืดของเจลเจลาตินจะเพิ่มขึ้น เจลาตินมีขนาดมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 15,000 ถึง 400,000 มีองค์ประกอบของแร่ธาตุตามตารางที่ 2.9 และ เจลาตินต่างชนิดกันนั้นจะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2.10 [36]

ตารางที่ 2.9 องค์ประกอบของแร่ธาตุหลักในเจลาติน

แร่ธาตุ	ปริมาณ (ร้อยละ)
คาร์บอน	50.5
ไฮโดรเจน	6.8
ไนโตรเจน	17
ออกซิเจน	25.2

ตารางที่ 2.10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาติน

	Type A (Porkskin)		Type B (Calf Skin)		Type B (Bone)	
Alanine	8.6	10.7	9.3	11.0	10.1	14.2
Arginine	8.3	9.1	8.55	8.8	5.0	9.0
Aspartic Acid	6.2	6.7	6.6	6.9	4.6	6.7
Cystine	0.1		Trace		Trace	
Glutamic Acid	11.3	11.7	11.1	11.4	8.5	11.6
Glycine	26.4	30.5	26.9	27.5	24.5	28.8
Histidine	0.9	1.0	0.74	0.8	0.4	0.7
Hydroxylysine	1.0		0.91	1.2	0.7	0.9
Hydroxyproline	13.5		14.0	14.5	11.9	13.4
Isoleucine	1.4		1.7	1.8	1.3	1.5
Leucine	3.1	3.3	3.1	3.4	2.8	3.5
Lysine	4.1	5.2	4.5	4.6	2.1	4.4
Methionine	0.8	0.9	0.8	0.9	0.0	0.6
Phenylalanine	2.1	2.6	2.2	2.5	1.3	2.5
Proline	16.2	18.0	14.8	16.4	13.5	15.5
Serine	2.9	4.1	3.2	4.2	3.4	3.8
Threonine	2.2		2.2		2.0	2.4
Tyrosine	0.4	0.9	0.2	1.0	0.0	0.2
Valine	2.5	2.8	2.6	3.4	2.4	3.0

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility)

เจลาตินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยส่งผลให้เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ ซึ่งมีการศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ใน retinal pigment epithelial cell พบว่าเจลาตินที่มีค่า bloom ต่ำกว่าจะส่งผลทำให้ retinal pigment epithelial cell เพิ่มจำนวนได้มากกว่าเจลาตินที่มีค่า bloom สูงกว่า และพบว่าเจลาตินที่มีค่า bloom ในช่วง 75-100 ส่งผลให้มีจำนวนของ retinal pigment epithelial cell ที่ยังมีชีวิตอยู่มากกว่าเจลาตินที่มีค่า bloom เท่ากับ 175 และ 300 [37]

การย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradation)

เจลาตินสามารถถูกย่อยสลายได้ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต [38] เนื่องด้วยเจลาตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ได้จากสิ่งมีชีวิตจึงสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ protease เช่น เอนไซม์ collagenase [39, 40] นอกจากนี้ยังสามารถถูกย่อยสลายด้วยจุลชีพ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา เป็นต้น [41, 42]

การประยุกต์ใช้เจลาติน

เจลาตินถูกนำมาใช้ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากมาย โดยมักจะนิยมนำไปใช้ผสมรวมกับวัสดุชีวภาพอื่น ๆ เพื่อสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) เนื่องจากเจลาตินมีลำดับกรดอะมิโน arginine-glycine-aspartic acid (RGD) ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้โดยช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีการยึดเกาะที่ดี (cell attachment) และมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากขึ้น (proliferation) [43]

Chomchalao และคณะ (2013) ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติโดยใช้วิธี freeze-drying โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเจลาตินกับไฟโบรอินมีการยึดเกาะ (attachment) และการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ chondrocyte มากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินเพียงอย่างเดียว [43] และยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเจลาตินกับไฟโบรอินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ (cell growth) [44]

นอกจากนี้ยังมีการนำเจลาตินมาใช้ในงานทางด้านระบบนำส่งยาหรือสารชนิดอื่น ๆ แต่เนื่องจากเจลาตินถูกย่อยสลายได้เร็วและละลายน้ำได้ดี จึงมีการนำไฟโบรอินซึ่งถูกย่อยได้ช้าและมีองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำมาเชื่อมขวางกับเจลาตินเพื่อปรับสมบัติให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ตัวอย่างเช่น Ratanavaraporn และคณะ (2013) ขึ้นรูป microsphere ที่ประกอบด้วยเจลาตินกับไฟโบรอิน โดยใช้วิธี water in oil emulsion และทำการเชื่อมขวางด้วย glutaraldehyde เพื่อใช้เป็นระบบนำส่ง curcumin และ piperine [40]

2.5.3 วัสดุชีวภาพผสม (ไฟโบรอิน/เจลาติน)

การนำไฟโบรอินและเจลาตินมาเป็นวัสดุชีวภาพร่วมในการสร้างหรือผลิตโครงสร้างสแคล์โฟลด์หรือโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อเป็นการรวมลักษณะสมบัติที่สำคัญที่เป็นประโยชน์ของวัสดุชีวภาพทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน สามารถแก้ปัญหาข้อจำกัดของวัสดุชีวภาพแต่ละชนิดได้ ทำให้ได้โครงสร้างสแคล์โฟลด์ที่มีสมบัติตามที่ต้องการทั้งในด้านของความเข้ากันได้ทางชีวภาพทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ดีพร้อมเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นเนื่องจากมีเจลาตินเป็นส่วนประกอบอยู่ในโครงสร้าง การย่อยสลายได้ทางชีวภาพไม่เร็วเหมือนโครงสร้าง สแคล์โฟลด์ที่ประกอบด้วยเจลาตินเพียงชนิดเดียวเนื่องจากไฟโบรอินมีผลทำให้อัตราการย่อยสลายของโครงสร้างสแคล์โฟลด์ช้าลง และทำให้ได้สมบัติเชิงกลที่เหมาะสม ลักษณะสมบัติทั้งหมดนี้รวมทั้งสมบัติทางกายภาพ เช่น ความพรุน และขนาดของรูพรุน เป็นต้น สามารถถูกควบคุมได้โดยการปรับอัตราส่วนของไฟโบรอินและเจลาตินตามที่ต้องการ [45]

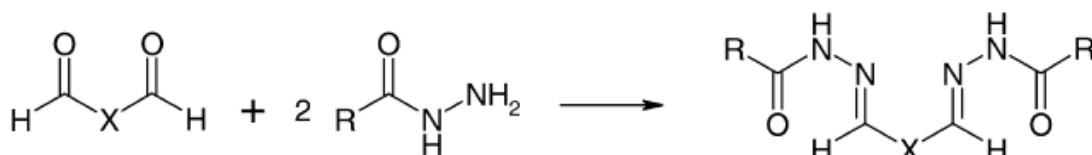
วัสดุชีวภาพผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินถูกนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการรักษาบาดแผลโดยการนำมาพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลหรือแผ่นปิดแผล จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีนักวิจัยได้ทำการศึกษาพัฒนาและผลิตแผ่นปิดแผลจากไฟโบรอินและเจลาตินโดยได้ผสมเซรีซินเพิ่มเติมเข้าไปด้วยเพื่อทำหน้าที่ออกฤทธิ์ช่วยเร่งการหายของแผลให้เร็วขึ้น จากการศึกษาภายนอกร่างกายหรือในห้องปฏิบัติการพบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของไฟโบรอิน/เจลาตินที่ 20/80 โดยมีการเชื่อมขวางด้วยกลูตาแอลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยส่งเสริมให้เซลล์เพาะเลี้ยง L929 (L929 mouse fibroblast) เกิดการยึดเกาะและเพิ่ม

จำนวนเซลล์ได้สูงที่สุด และเมื่อนำมาทดสอบกับแผลลึกระดับที่สาม (full-thickness wound) ในสัตว์ทดลองเทียบกับแผ่นปิดแผลที่ใช้ในทางการแพทย์ (Tegaderm™) พบว่า ส่งเสริมการหายของแผลได้ดีกว่าโดยมีการลดขนาดของแผลมากกว่า เร็วกว่า และยัง ก่อให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่หรือเยื่อขุมผิวปกคลุมแผลรวมทั้งเกิดการสร้างคอลลาเจนขึ้นอีกด้วย [46] นอกจากนี้ยังได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นแผ่นปิดแผลในแผลบาดเจ็บเฉียบพลันที่มี คุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Staphylococcus aureus* ซึ่งพบได้มาก ในแผลที่มีการติดเชื้อได้ดี แผ่นปิดแผลชนิดนี้ถูกผลิตโดยการนำสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร มาขึ้นรูปเป็น microsphere ด้วยเทคนิค water-in-oil emulsion ซึ่งจะถูกรวมด้วยกลูตาแอลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวล และจะถูกทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying แล้วทำการโหลดยา vancomycin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ต่อเจลาตินที่ถูกขึ้นรูปเป็น microsphere 1 มิลลิกรัม จากนั้นนำ microsphere ที่ถูกโหลดยาแล้วปริมาตร 10 มิลลิกรัมมาผสมรวมกับสารละลายไฟโบรอินความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying จากนั้น แขนงในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และทำให้แห้งโดยการ อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สุดท้ายจะได้แผ่นปิดแผลที่มีความพรุนประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดรูอยู่ในช่วง 60 ถึง 80 ไมโครเมตร มีค่าความตึงแรงกด 140 KPa และค่า มอดูลัสแรงกด 468 KPa [47]

2.6 การเชื่อมขวางโปรตีนด้วยกลูตาแอลดีไฮด์

กลูตาแอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ถูกใช้สำหรับเป็นสารเชื่อม ขวางทางเคมีของโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ในการผลิตโครงสร้างสแคลโฟลด์เพื่อทำให้โครงสร้างส แคลโฟลด์ที่ผลิตขึ้นมีสมบัติเชิงกลที่สูงขึ้นและถูกย่อยสลายทางชีวภาพในอัตราเร็วที่ช้าลงหรือใช้ เวลาในการย่อยสลายที่นานกว่าโครงสร้างสแคลโฟลด์ที่ไม่ได้ถูกเชื่อมขวางทางเคมีโดยหมู่แอลดีไฮด์ ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่มีหมู่คาร์บอนิล (-CO-) จับกับไฮโดรเจน 1 อะตอมของกลูตาแอลดีไฮด์ที่ปลายทั้งสอง ข้างของโมเลกุลจะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน (amine group) อิสระหรือหมู่เอมีนชนิดปฐมภูมิ (1° amine) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่เอมีน (-NH₂) ของโปรตีนหรือพอลิแซ็กคาไรด์เกิดเป็นพันธะโควา ลেন্টอิมิน (imine, C=N) ถึงแม้ว่ากลูตาแอลดีไฮด์จะช่วยให้โครงสร้างสแคลโฟลด์มีความมั่นคง ทนทานต่อการถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้มากขึ้นแต่ทำให้ความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่ำลงดังนั้นจึงมี

การใช้กลูตาอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ และมีขั้นตอนในการกำจัดกลูตาอัลดีไฮด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา ซึ่งเหลืออยู่หลังจากการทำเชื่อมขวางโปรตีนหรือพอลิแซ็กคาไรด์ [48-50]



รูปที่ 2.9 กระบวนการเชื่อมขวางโปรตีนด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ (X แทน $(\text{CH}_2)_3$)

2.7 การผลิตโครงสร้างสแคลโฟลด์ด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

เป็นวิธีที่ใช้ผลิตโครงสร้างสแคลโฟลด์ที่มีความพรุนโดยการนำพอลิเมอร์ที่ต้องการนำมาผลิตเป็นโครงสร้างสแคลโฟลด์มาละลายในตัวทำละลายแล้วนำสารละลายที่ได้มาแช่แข็งและทำแห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศส่งผลให้ตัวทำละลายถูกกำจัดออกด้วยวิธีการระเหิดและได้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุนสูงซึ่งสามารถควบคุมขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้โดยการกำหนดอัตราเร็วในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ถ้าใช้อัตราเร็วมากขนาดของรูพรุนที่ได้ก็จะเล็กลงมาก [22]

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- ริงไหมไทยพันธุ์จุล 1/1 (บริษัท จุลไหมไทย จำกัด, ไทย)
- เจลาตินชนิดเอ (pl 9, Niita gelatin, ญี่ปุ่น)
- คอลลาจีเนส (Fluka, สหรัฐอเมริกา)
- กรดแอสติก (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- กลูตาอัลดีไฮด์ (Fluka, Buchs, เยอรมนี)
- กุ้งไคอะไลส์ (MWCO: 12,000-16,000 daltons, Viskase Company Inc., ญี่ปุ่น)
- น้ำปราศจากประจุ (Deionized water)
- ไดมethylซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- Dulbecco' s modified eagle powder medium (Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, สหรัฐฯ)
- ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum (FBS), Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- ไกลซีน (Glycine, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- Penicillin-Streptomycin solution (Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, Bio basic inc., แคนาดา)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- แม่พิมพ์เทฟลอน (Teflon coated-polypropylene plastic mold, ญี่ปุ่น)

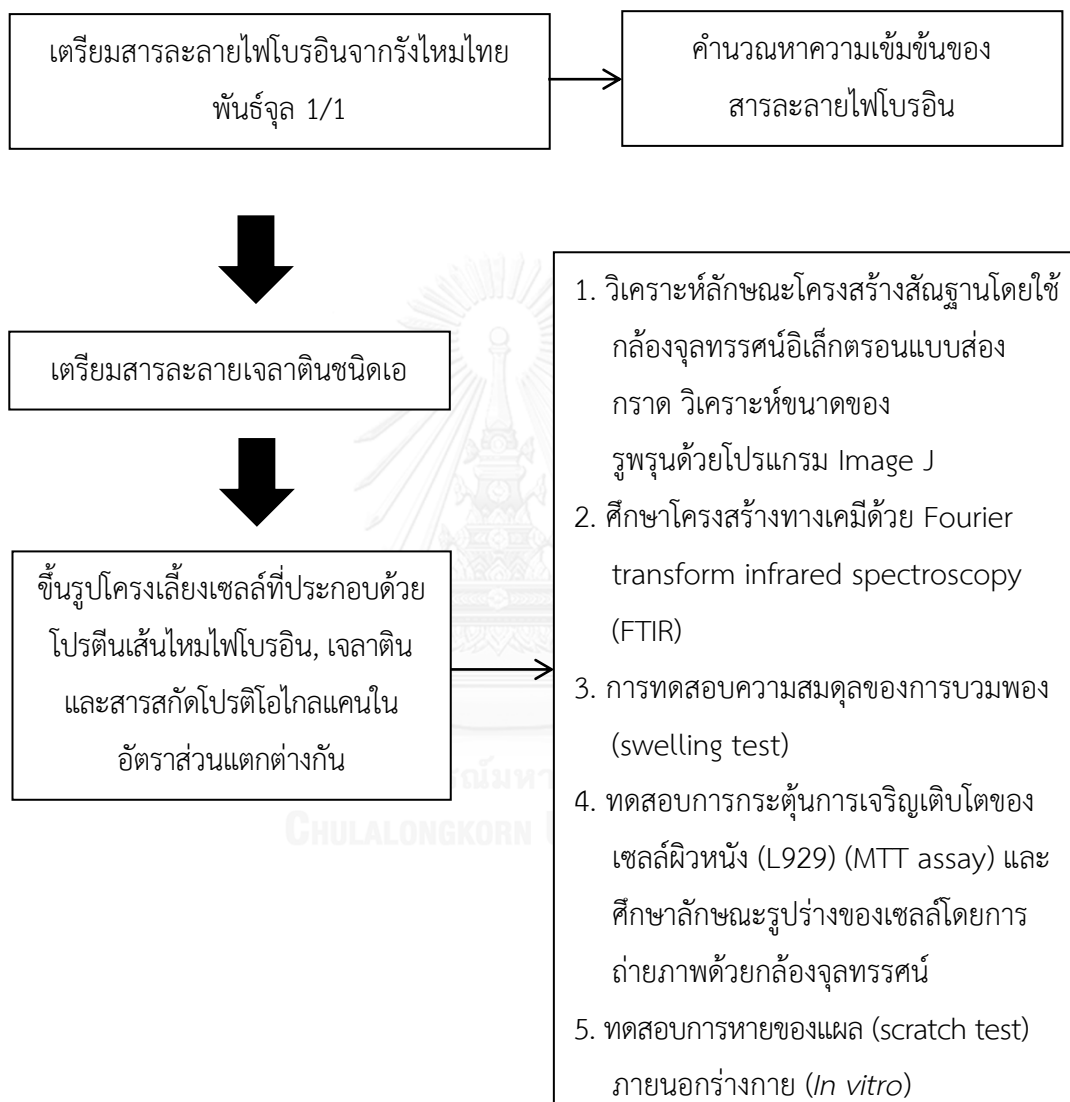
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องชั่งสาร (Analytical balance)
- Autoclave (VD23, Binder, เยอรมนี)
- Autopipette 10-100 μl (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา)
- Autopipette 100-1,000 μl (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา)

- บีกเกอร์ (100, 250, 500, 600, 1,000 มิลลิลิตร)
- ไมโครปิเปตต์ทิป (100, 1,000 ไมโครลิตร)
- แผ่นพาราฟิน (Paraffin film, Bemis, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge, Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)
- เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer)
- ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (Panasonics, ไทย)
- ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิตั้งแต่ -40 องศาเซลเซียส (Haier, จีน)
- เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Freeze dry, CHRIST®, เยอรมัน)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) (Thermo scientefic, สหรัฐอเมริกา)
- ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (Thermo scientefic, สหรัฐอเมริกา)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope (SEM-JSM-5410LV, JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)
- กล้องถ่ายรูป (D5000, Nikon, ญี่ปุ่น)
- 24 well polystyrene tissue culture plate (Corning, สหรัฐอเมริกา)

3.3 วิธีการวิจัย

แผนผังการดำเนินงานวิจัย



3.3.1 สารโปรตีนโกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลา

สารโปรตีนโกลแคนที่ถูกนำมาใช้ในงานการศึกษาครั้งนี้สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

- 1) นำกระดูกปลาส่วนหัวมาแช่ใน 4% acetic acid ที่ 4 องศาเซลเซียส พร้อมคนตลอดเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง
- 2) นำสารละลายที่ได้ในข้อ 1) มาปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วแยกตะกอนออกและเก็บส่วนของสารละลายไว้
- 3) นำเกลือ sodium chloride มาละลายใน ethanol จนอิ่มตัวแล้วนำสารที่ได้จากข้อ 2) มาแช่ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
- 4) สิ่งที่ตกตะกอนหลังการปั่นตกตะกอน คือ สารโปรตีนโกลแคนซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการนำมาละลายใน 4% acetic acid อีกครั้งหนึ่ง
- 5) นำไป dialyze ผ่านถุง dialysis ที่ 1,000 KDa
- 6) นำไปทำให้แห้งด้วยการ freeze-dry จนเป็นผงละเอียด แล้วนำไปแรงเพื่อให้ได้ขนาดตามต้องการ

สารโปรตีนโกลแคนที่สกัดได้จะถูกนำมาวัดค่าการละลายและค่าความเป็นกรดต่างโดยนำผงที่ได้จากกระบวนการสกัดมาใส่ในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง ทำการแช่ใน water bath อย่างสม่ำเสมอและใส่ผงที่สกัดได้จนกว่าสารละลายอิ่มตัว โดยสังเกตได้จากการไม่ละลายเพิ่ม หลังจากนั้นนำมากรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA Assay kit

ผลจากการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของสารโปรตีนโกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิล ได้ผลดังนี้

- ค่าการละลายในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง = 0.86 ± 0.12 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
- ค่าความเป็นกรดต่าง = 6.55 ± 0.44

(อ้างอิงข้อมูลวิธีการสกัดโปรตีนโกลแคนตาม M. Majima และคณะได้รายงานไว้เกี่ยวกับวิธีการสกัดโปรตีนโกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลาแซลมอนในงานวิจัยเรื่อง Effect of proteoglycan on experimental colitis)

3.3.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากรังไหมไทยพันธุ์จูล 1/1

ก. การกำจัดเซรีซิน [51]

- 1) ชั่งรังไหมสายพันธุ์จูล 1/1 หนัก 40 กรัม (บันทึกน้ำหนักไหมแห้งก่อนการกำจัดเซรีซินจากไหม)
- 2) ต้มรังไหมด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (อัตราส่วนระหว่างรังไหมต่อสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเท่ากับ 1 : 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จำนวน 2 รอบเพื่อละลายเซรีซินหรือกาวไหมออก แต่ละรอบล้างด้วยน้ำปราศจากประจุหลาย ๆ ครั้ง
- 3) นำเส้นใยไหมที่ถูกกำจัดเซรีซินออกไปตากจนแห้งที่อุณหภูมิห้อง

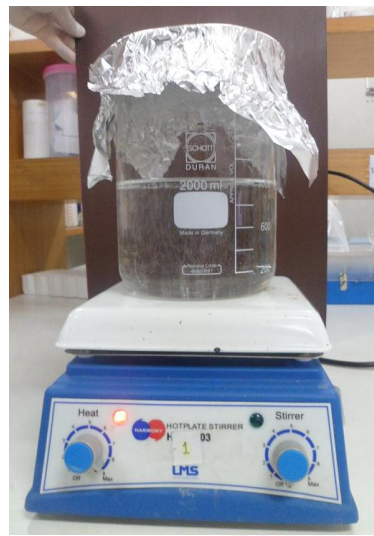




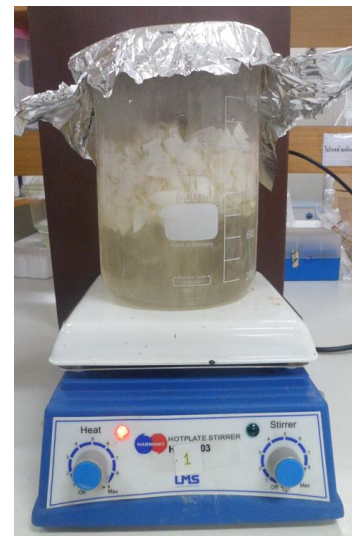
1) เตรียมไหมพ่นจูล 1/1



2) ตัดไหมเป็นชิ้นเล็ก ๆ



3) ต้มสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.02



4) นำไหมจากข้อ 2) มาต้มในสารละลาย

โมลาร์จันเตือด โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.02

CHULALONGKORN UNIVERSITY

โมลาร์นาน 20 นาที



5) ล้างไหมด้วยน้ำ DI จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำซ้ำในข้อ 3), 4) และ 5) อีกครั้ง แล้วผึ่งไหมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง



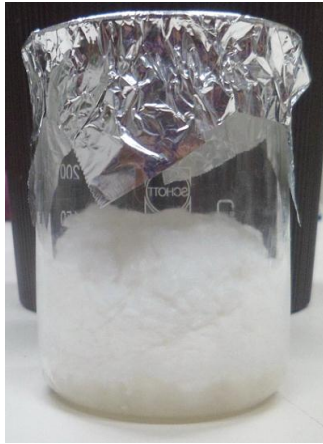
6) ผึ่งไหมจนฟูเพื่อเตรียม dialyze

รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการกำจัดเซรีซินจากไหม (Degumming)

ข. การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

- 1) นำเส้นใยไหมที่ได้มาดึงให้เป็นเส้นเล็ก ๆ ออกจากกันจนมีลักษณะฟู ซึ่งน้ำหนัก 8 กรัม แล้วไปละลายด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ 24 กรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- 2) นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไป dialyze (MWCO 12,000-1,6000, Viskase Companies, Inc., Japan) ด้วยน้ำปราศจากประจุ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน โดยในวันแรกทำการเปลี่ยนน้ำที่เวลา 15 นาที 20 นาที และ 20 นาที ตามลำดับ จากนั้นเปลี่ยนน้ำ 3 ครั้งต่อวันเพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ออก เก็บสารละลายไฟโบรอินในวันที่สาม
- 3) นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงแยกอนุภาคที่ไม่ต้องการที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย ทำโดยการอบแห้งสารละลายไฟโบรอินที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วัตต์น้ำหนัก ของสารละลายก่อนอบ และน้ำหนักไฟโบรอินแห้งหลังอบ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอิน

$$\% \text{ ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอิน} = \frac{\text{น้ำหนักของสารละลายไฟโบรอินหลังอบ}}{\text{น้ำหนักของสารละลายไฟโบรอินก่อนอบ}} \times 100$$



1)ไหมไฟโบรอิน8กรัม ผสมกับลิเทียมโบรไมด์24
กรัม



2) อบในตู้อบ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น
เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง



3)สารละลายไฟโบรอินในตัวทำละลายลิเทียมโบร
ไมด์



4) สารละลายไฟโบรอินในถุง dialysis



5) แช่ในน้ำปราศจากประจุที่ปั่นกวอยู่
ตลอดเวลา และเปลี่ยนน้ำเป็นเวลา 3 วัน



6) สารละลายไฟโบรอินในน้ำปราศจากประจุ

รูปที่ 3.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน (Dialysis of silk fibroin solution)

3.3.3 การเตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ

เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอมาละลายในน้ำปราศจากประจุ ให้น้ำมีความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก แช่ให้เจลาตินบวมน้ำ 15 นาทีจากนั้นปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้ได้สารละลายเจลาตินใส

3.3.4 การขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน และเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกัน โดยมีและไม่มีสารโปรตีนโกลแคนเป็นองค์ประกอบ

1. ผสมสารละลายไฟโบรอิน, เจลาติน และสารโปรตีนโกลแคน ให้น้ำมีความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก โดยมีอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้
 - 1) SF25G75 คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก
 - 2) SF50G50 คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก
 - 3) SF75G25 คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาตินร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก
 - 4) SF25G75E คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 75 และสารโปรตีนโกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก
 - 5) SF50G50E คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 เจลาตินร้อยละ 48.75 และสารโปรตีนโกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก
 - 6) SF75G25E คือ มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 เจลาตินร้อยละ 23.75 และสารโปรตีนโกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก
2. ปั่นกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ในที่มีดเป็นเวลา 15 นาที
3. เทสารละลายตัวอย่างที่ได้ใส่แม่พิมพ์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ห่อฟอยด์ตัวอย่าง นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำฟอยด์ออกจากตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างที่เจลอย่างดีแล้วไปล้างเพื่อกำจัดกลูตาอัลดีไฮด์ออก โดยนำไปแช่ในไกลซีนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำปราศจากประจุโดยการแช่ตัวอย่างในน้ำปราศจากประจุ 3 รอบ รอบละ 1 ชั่วโมง

5. นำตัวอย่างไปห่อฟอยด์ที่เจาะเป็นรูเล็ก ๆ บนพื้นผิวฟอยด์ นำเข้าแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการ freeze dry ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.3.5 การวัดขนาดรูพรุนและลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาตินและสารสกัดโปรตีนโอไกลแคนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM-JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan) ทำโดยการตัดชิ้นงานเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางบนฐานเตรียมตัวอย่าง และนำตัวอย่างที่ได้ไปเคลือบทองคำก่อน จากนั้นทำการถ่ายภาพที่กำลังขยาย 35 เท่า นำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดของรูพรุนโดยการสุ่มวัด 100 รูในแนวราบ และแนวตัดขวางด้วยโปรแกรม Image J ค่าของขนาดรูพรุนที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.6 ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาตินและสารสกัดโปรตีนโอไกลแคนด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR)

วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน เจลาตินและสารสกัดโปรตีนโอไกลแคนด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงคลื่นประมาณ $2,000-1,000 \text{ cm}^{-1}$ เพื่อวิเคราะห์พีคของเอไมด์ (amide) ประกอบด้วยย่านเลขคลื่นระหว่าง $1,700-1,600 \text{ cm}^{-1}$ (amide I), $1,600-1,500 \text{ cm}^{-1}$ (amide II) และ $1,300-1,200 \text{ cm}^{-1}$ (amide III) [52-56] และพีคของหมู่น้ำตาล (sugar) ย่านเลขคลื่นระหว่าง $1,200-1,000 \text{ cm}^{-1}$ [53, 56] ทำการเก็บข้อมูลโดยใช้ resolution 4 cm^{-1} กับ 128 coaddition scans [55]

3.3.7 การทดสอบความสมดุลของการบวมพอง (swelling test)

นำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกทำให้แห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักบันทึกเป็นน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำปราศจากประจุ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้งบันทึกเป็นน้ำหนักเปียก คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการบวมพองในน้ำ [57]

$$\text{ร้อยละของการบวมพองในน้ำ} = (W_w - W_d)/W_d \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

เมื่อ $W_w =$ น้ำหนักเปียก

และ $W_d =$ น้ำหนักแห้ง

3.3.8 การทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929)

เพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ลงบนจานเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนเซลล์ 2.5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ใน 48 well-plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (DMEM) ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS, 50 U/mL penicillin streptomycin ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะเดียวกัน นำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นงานออกแยกส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ มากรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเปลี่ยนแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์เดิม เลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay หรือ (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออก และเติมตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในการชะผลึกออกมาจะได้สารละลายสีม่วงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณผลึก formazan ที่ถูกละลายออกมามีค่าแปรผันโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ [58] โดยนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม (control) คำนวณตามสมการที่ (2)

$$\% \text{ Relative cell number} = (A_t \div A_c) \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ $A_t =$ Mean absorbance test

และ $A_c =$ Mean absorbance control

ศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ของเซลล์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon eclipse TS100, USA) ของเซลล์หลังจากที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผ่านการแช่ชิ้นงานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และลักษณะการย้อมติดสีของ MTT หลังจากการทำ MTT assay [57]

3.3.9 การทดสอบการหายของแผล (scratch test) ภายนอกร่างกาย (*in vitro*)

เพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ลงบนจานเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนเซลล์ 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม ใน 24 well-plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (DMEM) ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS, 50 U/mL penicillin streptomycin ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเกิดเป็น monolayer ที่ก้นหลุม ในขณะเดียวกัน นำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ ขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปลายทิวปิเปตที่ปราศจากเชื้อขีดข่วนที่ก้นหลุมในลักษณะเป็นเส้นตรงแล้วล้างเศษเซลล์ออกด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่โครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ (DMEM) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (n=4) ถ่ายภาพด้วยกำลังขยาย 10 เท่า ก่อนนำไปบ่มในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายภาพอีกเมื่อครบเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำภาพที่ได้ก่อนการบ่มและหลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาพื้นที่ที่ไม่มีเซลล์ L929 มาวัดเกาะด้วยโปรแกรม Image J และหาค่าของร้อยละของการปิดของบาดแผล (n=4) [59, 60]

$$\% \text{ Wound closure} = \left(\frac{H_b - H_a}{H_b} \right) \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

เมื่อ H_b = พื้นที่ว่างก่อนบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

และ H_a = พื้นที่ว่างหลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.10 การทดสอบการย่อยสลายในทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro*)

นำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 7.4 ในสารละลายปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ collagenase 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ sodium azide 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 9 ช่วง คือ 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง, 1 วัน, 3 วัน, 5 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ เปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 2 วัน เมื่อครบเวลาในแต่ละช่วงให้นำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ออกมาจากสารละลายแล้วล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze-drying) ซึ่งน้ำหนัก คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เหลืออยู่ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=4) [45]

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือ} = \left(\frac{W_{re}}{W_{int}} \right) \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

เมื่อ W_{int} = น้ำหนักก่อนถูกย่อยสลาย

และ W_{re} = น้ำหนักหลังถูกย่อยสลาย

3.3.11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากผลการทดสอบที่คำนวณได้ระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน, เจลาติน และสารโปรติโอไกลแคนในอัตราส่วนที่แตกต่างกันของแต่ละสูตรด้วยสถิติ One-Way ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ($P\text{-value} < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 17.0



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน และเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกัน โดยมีและไม่มีสารโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบพบว่า สามารถขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ครบทุกสูตร ยกเว้นสูตรที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 เจลาตินร้อยละ 23.75 และมีอัตราส่วนผสมของสารโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก ซึ่งไม่สามารถถูกขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้สำเร็จ เนื่องจากตัวอย่างไม่เกิดการเจลอย่างสมบูรณ์ในระหว่างขั้นตอนการขึ้นรูป ดังนั้นจึงได้ตัดสูตรที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 เจลาตินร้อยละ 23.75 และมีอัตราส่วนผสมของสารโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก กับสูตรที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาตินร้อยละ 25 โดยน้ำหนักออกจากการทดลอง

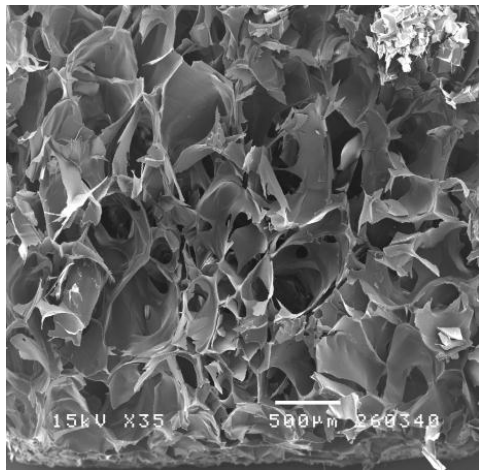
4.2 ผลการวัดขนาดรูพรุนและลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาตินและสารสกัดโปรติโอไกลแคนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดซึ่งได้ผลดังรูปที่ 4.1 โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 4.1

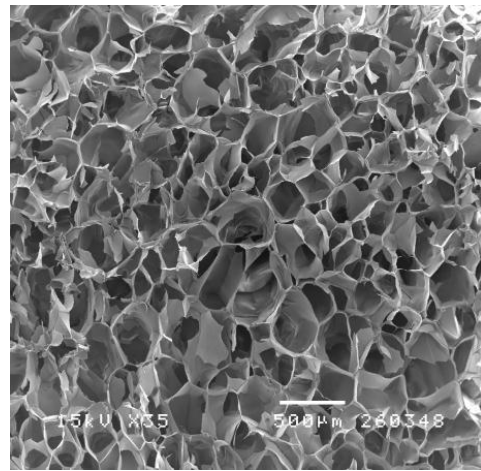
ตารางที่ 4.1 สรุปขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินใน

อัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ

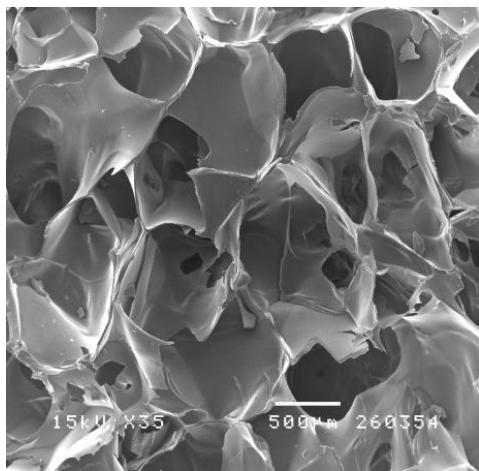
ลักษณะสมบัติ	โครงเลี้ยงเซลล์			
	SF25G75	SF25G75E	SF50G50	SF50G50E
ขนาดรูพรุนเฉลี่ย ± SD (ไมครอน)	366.36 ± 89.13	665.46 ± 149.71	266.15 ± 67.92	231.86 ± 92.38



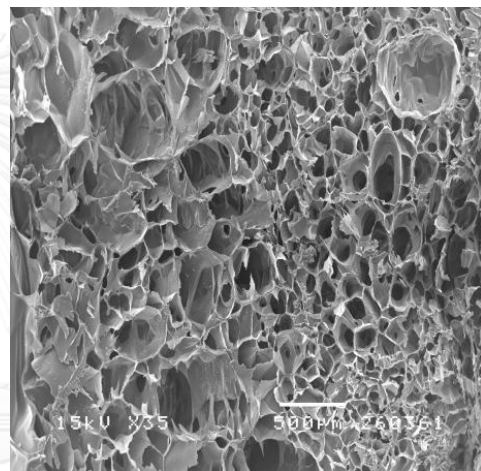
SF25G75



SF50G50



SF25G75E

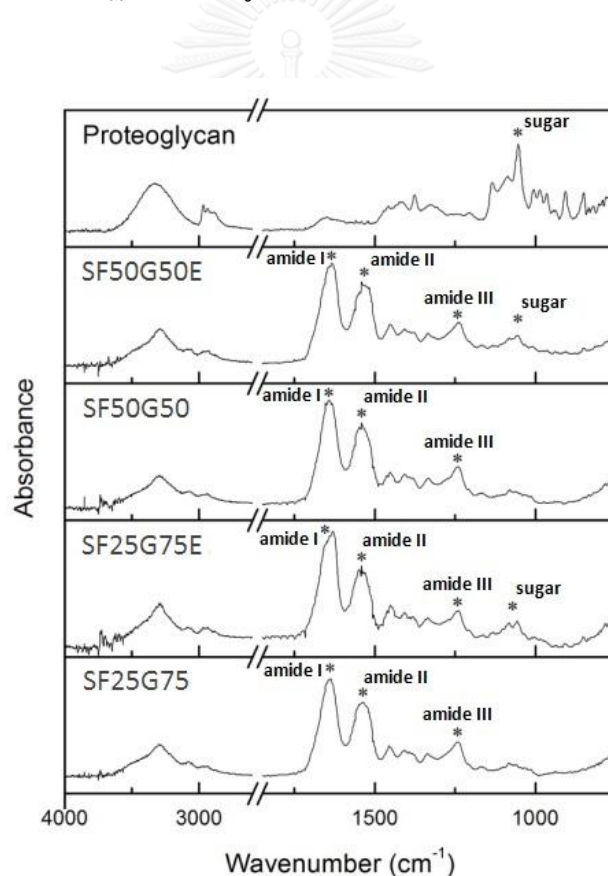


SF50G50E

รูปที่ 4.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน และเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีนไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ

4.3 ผลการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาตินและสารสกัดโปรตีนโกลแคนด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR)

ลักษณะคุณสมบัติทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังรูปที่ 4.2 จะสังเกตเห็นพีคของเอไมด์ (amide) ในช่วง $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ (amide I), $1600-1500 \text{ cm}^{-1}$ (amide II) และ $1300-1200 \text{ cm}^{-1}$ (amide III) ปรากฏขึ้นอย่างชัดเจนกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไฟโบรอินและเจลาตินเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนผสมต่าง ๆ [รูปที่ 4.2 (SF25G75, SF25G75E, SF50G50, SF50G50E)] นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินและเจลาตินที่มีสารสกัดโปรตีนโกลแคนเป็นองค์ประกอบ [รูปที่ 4.2 (SF50G50E และ SF25G75E)] จะเกิดพีคปรากฏที่แถบการดูดกลืนแสงที่ 1100 cm^{-1}



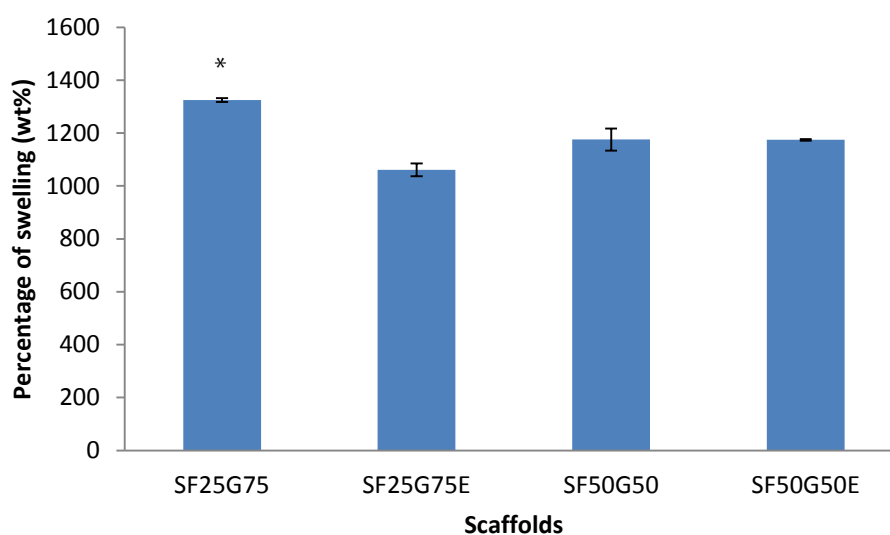
รูปที่ 4.2 ลักษณะของอินฟราเรดสเปกตรัมที่วิเคราะห์ได้จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีสารสกัดโปรตีนโกลแคนเป็นองค์ประกอบ

4.4 ผลการทดสอบความสมดุลของการบวมพอง (swelling test)

ผลจากการทดสอบความสมดุลของการบวมพองของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะเห็นได้ว่าร้อยละของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินและเจลาตินทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดโปรตีนไอโกลแคนเป็นองค์ประกอบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 สมดุลของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีนไอโกลแคนเป็นองค์ประกอบ

ลักษณะสมบัติ	โครงเลี้ยงเซลล์			
	SF25G75	SF25G75E	SF50G50	SF50G50E
การบวมพองในน้ำ ± SD (%wt)	1324.563 ± 6.797315	1060.718 ± 24.46178	1175.3 ± 41.30021	1174.341 ± 2.873373



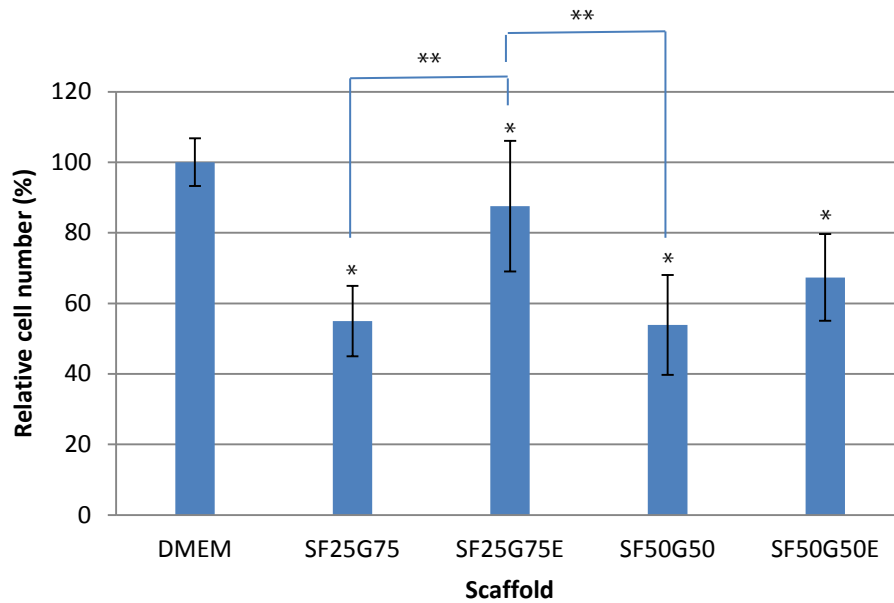
รูปที่ 4.3 สมดุลของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีนไอโกลแคนเป็นองค์ประกอบ (* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างอื่นทั้งหมด)

4.5 ผลการทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929)

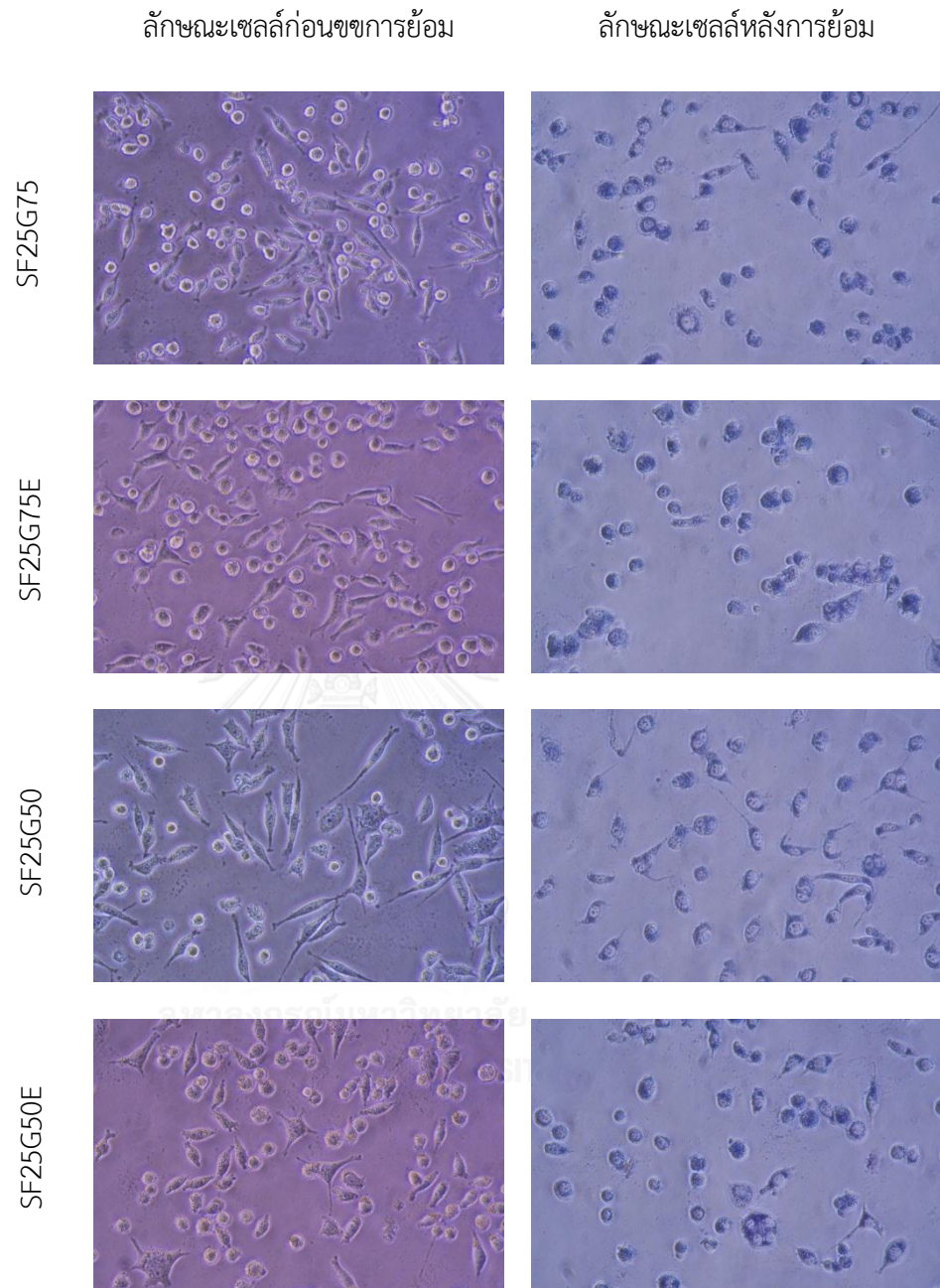
ผลการทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929) หลังจากใส่สารสกัดที่ได้จากการแช่โครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่างๆ ที่ผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่า เมื่อเทียบผลของร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มตัวอย่างต่างๆ กับกลุ่มควบคุม จะเห็นได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มตัวอย่างต่างๆ มีร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น กลุ่มตัวอย่างของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก และเมื่อเทียบผลของร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มตัวอย่างต่างๆ ด้วยกันพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก มีร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 ส่วนผลของการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ จะเห็นลักษณะการย้อมติดสีของ MTT ดังรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ

ลักษณะสมบัติ	โครงเลี้ยงเซลล์			
	SF25G75	SF25G75E	SF50G50	SF50G50E
ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต \pm SD	52.41 \pm 10.56	86.84 \pm 19.54	51.23 \pm 14.95	65.47 \pm 12.98



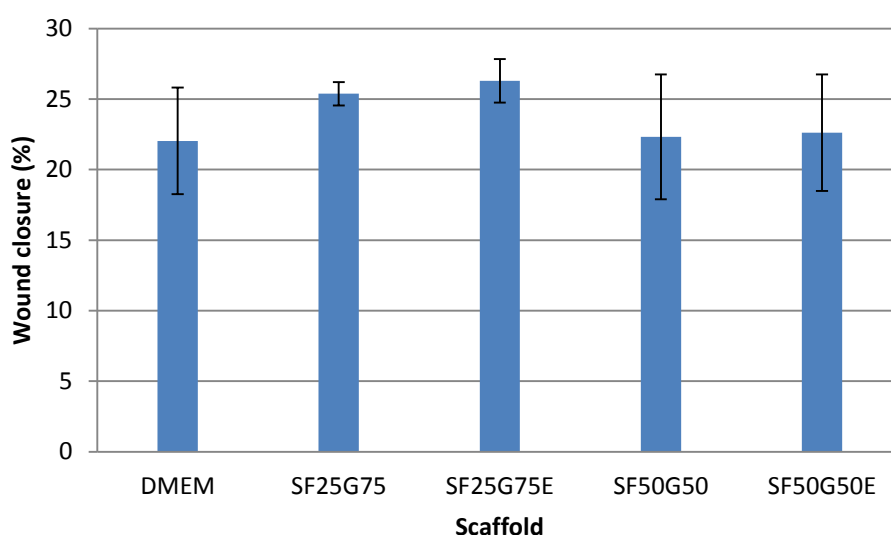
รูปที่ 4.4 ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีนไฮโดรไลซิสเป็นองค์ประกอบ (* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (DMEM) ณ เวลาเดียวกัน (24 ชั่วโมง), ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง SF25G75 และ SF50G50 ณ เวลาเดียวกัน (24 ชั่วโมง)



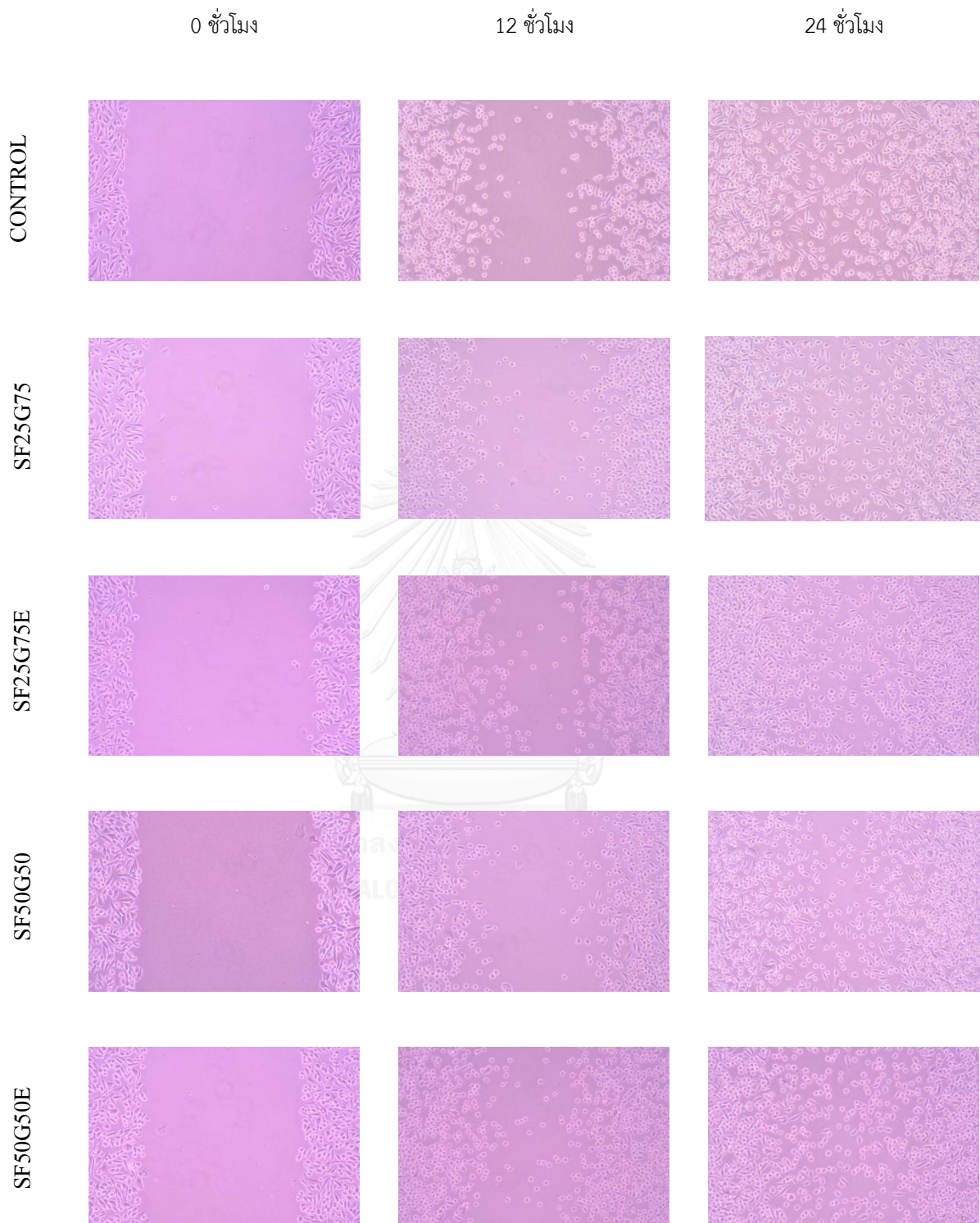
รูปที่ 4.5 ลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์หลังจากที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผ่านการแช่ขึ้นงานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และลักษณะการย้อมติดสีของ MTT หลังจากการทำ MTT assay

4.6 ผลการทดสอบการหายของแผล (scratch test) ภายนอกร่างกาย (*in vitro*)

หลังจากใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่โครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ พบว่า เซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสูตรที่มีและไม่มีสารโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบเป็นระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จะสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณพื้นที่ว่างหรือรอยข่วนที่สร้างขึ้นมาได้ ส่งผลให้ช่องว่างนั้นหดแคบลง โดยเซลล์จะเคลื่อนที่เข้าไปมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สังเกตได้จากภาพถ่ายที่นำมาวิเคราะห์ จะเห็นได้ว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.7 โดยร้อยละของการปิดของแผลในแต่ละกลุ่มตัวอย่างจะไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ (รูปที่ 4.6)



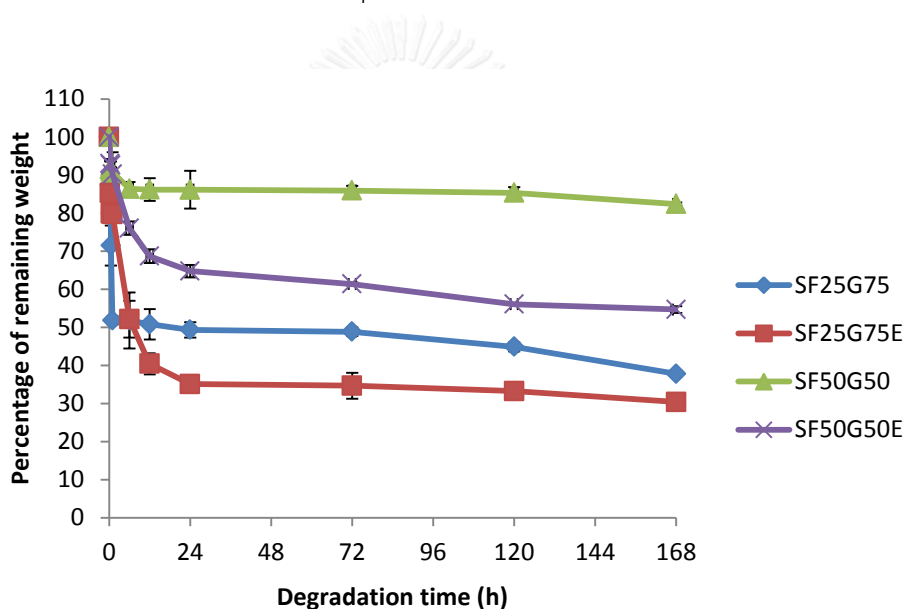
รูปที่ 4.6 ร้อยละของการปิดของแผลของเซลล์หลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 4.7 ภาพแสดงลักษณะการตายของแผลภายนอกร่างกายหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรตีนไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

4.7 ผลการทดสอบการย่อยสลายในทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro*)

ผลการทดสอบการย่อยสลายในทางชีวภาพภายนอกร่างกายโดยแซ่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์ collagenase 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ sodium azide 0.01 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 7.4 เป็นเวลา 168 ชั่วโมง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบจะมีอัตราการย่อยสลายมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนของไฟโบรอินและเจลาตินใกล้เคียงกัน และยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินในอัตราส่วนที่สูงกว่าจะมีอัตราการย่อยสลายได้มากกว่า ดังรูปที่ 4.8 โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินในอัตราส่วนที่สูงกว่าและมีสารโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบจะมีอัตราการย่อยสลายมากที่สุด



รูปที่ 4.8 อัตราการย่อยสลายภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ sodium azide 0.01 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 7.4 เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

กระดูก่อนบริเวณส่วนหัวของปลานิลมีสารโปรติโอไกลแคนชนิดแอกกรีแคน (aggrecan) เป็นองค์ประกอบหลัก [61] โดยโปรติโอไกลแคนชนิดนี้จะมีโครงสร้างหลักหนึ่งเป็นโปรตีน ในส่วนของโครงสร้างโปรตีนนี้จะมีโครงสร้างย่อยหนึ่งที่มีลักษณะเหมือนสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังซึ่งเรียกว่า G3 domain ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีต่อสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนัง (anti-mouse EGF) [8] จึงอาจจะกล่าวได้ว่าโปรติโอไกลแคนอาจจะมีคุณสมบัติหนึ่งที่คล้ายกับสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ (replication), การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (proliferation) และช่วยเร่งกระบวนการหายของแผลได้ [12] นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างหลักอีกหนึ่งชนิด คือ คาร์โบไฮเดรตซึ่งยึดเกาะอยู่กับโครงสร้างที่เป็นโปรตีนของโปรติโอไกลแคนด้วยพันธะโคเวเลนต์ เรียกว่า ไกลโคซามิโนไกลแคนส์ (glycosaminoglycan, GAGs) โดยชนิดของไกลโคซามิโนไกลแคนส์ที่พบเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ chondroitin sulfate [11] ซึ่งมีการศึกษาพบว่าโครงสร้างดังกล่าวนี้มีส่วนช่วยในกระบวนการหายของแผลได้ด้วยเช่นเดียวกัน โดยไกลโคซามิโนไกลแคนส์ของโปรติโอไกลแคนจะสามารถไปจับกับตัวรับชนิดหนึ่งที่เรียกว่า CD44 ซึ่งปรากฏอยู่บริเวณบนพื้นผิวของเซลล์ผิวหนังได้ เป็นผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ [62]

โครงสร้างสแคลโฟลด์หรือโครงเลี้ยงเซลล์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยใช้เป็นโครงสร้างชั่วคราวสำหรับให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าไปยึดเกาะ เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเจริญเติบโตเกิดกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทนเนื้อเยื่อที่เสียหายไป การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีโครงสร้างและหน้าที่ทางชีววิทยาที่คล้ายคลึงกับสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) คือ คุณสมบัติสำคัญที่ต้องการนอกเหนือไปจากเรื่องของความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ [18, 22, 63] การนำสารโปรติโอไกลแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของสารที่เป็นองค์ประกอบภายนอกเซลล์ตามธรรมชาติ [5] มาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอินและเจลาตินนั้น นอกจากจะช่วยในเรื่องของการเร่งการหายของแผลแล้วยังทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับสารที่เป็นองค์ประกอบภายนอกเซลล์มากยิ่งขึ้นอีกด้วย จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโปรติโอไกลแคนที่สกัดได้จากกระดูก่อนของปลาในการส่งเสริมกระบวนการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ผ่านมาพบว่าความเข้มข้นของสารละลายโปรติโอไกลแคนที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จะให้ประสิทธิภาพต่ำในช่วง 100 ถึง 1,000 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร [62] ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายโปรติโอไกลแคนประมาณ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอินและเจลาตินโดยคาดว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้นี้จะค่อยๆสลายและปลดปล่อยโปรติโอไกลแคนออกมาด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการเร่งกระบวนการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารโปรติโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิลสามารถถูกนำมาผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอินและเจลาตินได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เจลาตินชนิดเอนีเนื่องจากสารโปรติโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิลมีคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งเหมาะที่จะเลือกใช้เจลาตินชนิดเอนีมาเป็นโปรตีนร่วมในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ [35] จากการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 สูตร พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 เจลาตินร้อยละ 23.75 และโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 เกิดเป็นเจลไม่สมบูรณ์ในระหว่างขั้นตอนการผลิต แต่ไม่เกิดปัญหานี้ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินที่ใกล้เคียงกัน (มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาตินร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก) โดยอาจจะอธิบายได้ว่าโปรติโอไกลแคนอาจมีผลในการเกิดเจลของเจลาตินโดยไปมีผลทำให้ความแข็งแรงของเจล (gel strength) ลดลง ด้วยเหตุนี้จึงเลือกศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์เพียง 4 สูตรที่เหลือเท่านั้น ซึ่งหลังจากขึ้นรูปพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีความคงตัวดีและมีรูพรุนสม่ำเสมอ ไม่ใหญ่จนเกินไปจนทำให้ชิ้นงานเปราะบาง รวมทั้งมีขนาดเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ [64, 65] จากการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและ

เจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยสูงที่สุดคือมีขนาดเท่ากับ 665.46 ± 149.71 และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยใหญ่รองลงมาคือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และ เจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก ซึ่งมีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 366.36 ± 89.13 เมื่อเปรียบเทียบขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองสูตรนี้ พบว่าโปรติโอไกลแคนมีผลทำให้ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ไม่มีผลทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 เจลาตินร้อยละ 48.75 และโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยสูงขึ้นทั้งที่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบโดยจะพบว่าขนาดรูพรุนเฉลี่ยใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 เจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าโปรติโอไกลแคนจะมีผลทำให้ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์สูงขึ้นอย่างมากเมื่อใช้

อัตราส่วนผสมของไฟโบรอินน้อย (ร้อยละ 25) และใช้อัตราส่วนผสมของเจลาตินมาก (ร้อยละ 73.75) นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อผสมไฟโบรอินลงไปน้อยลงและเพิ่มอัตราส่วนผสมของเจลาตินให้มากขึ้น กล่าวคือโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก จะมีขนาดรูเฉลี่ยใหญ่กว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรตีนโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก จะมีขนาดรูเฉลี่ยใหญ่กว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 เจลาตินร้อยละ 48.75 และโปรตีนโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก ซึ่งผลที่ได้ตรงกับการศึกษาของ J. He และคณะ (2012) และ W. Anuchiracheewa และคณะ (2012) ที่พบว่าปริมาณของไฟโบรอินแปรผกผันกับขนาดของรูพรุน และปริมาณของเจลาตินแปรผันตรงกับขนาดของรูพรุน กล่าวคือ ถ้าผสมปริมาณของไฟโบรอินมากขึ้น จะทำให้ชิ้นงานมีขนาดของรูพรุนที่เล็กลง และถ้าผสมปริมาณของเจลาตินมากขึ้น จะทำให้ชิ้นงานมีขนาดของรูพรุนที่ใหญ่ขึ้น [66, 67]

จากการทดสอบสมดุของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งที่มีและไม่มีโปรตีนโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก มีร้อยละของการบวมพองในน้ำสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรตีนโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก มีร้อยละของการบวมพองในน้ำน้อยที่สุด ซึ่งมีค่าน้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์สูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบผลของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองซึ่งมีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินใกล้เคียงกันจะบ่งบอกได้ว่าโปรตีนโอไกลแคนมีผลทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ดูดซึมน้ำได้น้อยลง แต่เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก และโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 เจลาตินร้อยละ 48.75 และโปรตีนโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก พบว่าโปรตีนโอไกลแคนไม่มีผลต่อการดูดซึมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เมื่อเทียบผลระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้โดยโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองซึ่งมีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินใกล้เคียงกันมีค่าร้อยละของการบวมพองในน้ำใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการทดสอบทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยใกล้เคียงกัน จึงทำให้มีความสามารถในการดูดซึมน้ำไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตรา

ส่วนผสมของเจลาตินที่มากกว่าจะมีค่าร้อยละของการบวมพองในน้ำสูงกว่า นั่นคือ โคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก จะมีร้อยละของการบวมพองในน้ำสูงกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก และโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรตีนโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก จะมีร้อยละของการบวมพองในน้ำสูงกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 เจลาตินร้อยละ 48.75 และโปรตีนโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก

จากการศึกษาลักษณะคุณสมบัติทางเคมีของโคร่งเลี้ยงเซลล์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี พบว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีไฟโบรอินและเจลาตินเป็นองค์ประกอบ จะเกิดพีคของเอไมด์ทั้ง 3 ชนิด คือ เอไมด์ปฐมภูมิ เอไมด์ทุติยภูมิและเอไมด์ตติยภูมิ กล่าวคือจะเกิดการสั่นของโมเลกุลแบบยืด-หดของพันธะ C=O ในเอไมด์ปฐมภูมิ เกิดการสั่นของโมเลกุลแบบยืด-หดของพันธะ C-N และเกิดการสั่นของโมเลกุลแบบงอของพันธะ N-H ในเอไมด์ทุติยภูมิ และเกิดการสั่นของโมเลกุลแบบยืด-หดของพันธะ C-N กับ C-C และเกิดการสั่นของโมเลกุลแบบงอของพันธะ N-H ในเอไมด์ตติยภูมิ นอกจากนี้ยังพบว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีนโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ จะเกิดพีคของหมู่ฟังก์ชันที่มีอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลน้ำตาล นั่นคือ พีคที่ได้เกิดจากการสั่นของโมเลกุลภายในโครงสร้างที่เป็นวงแหวนของน้ำตาลโดยจะเกิดการสั่นของพันธะ C-O-C, C-OH และ C-C กล่าวโดยสรุปจะได้ว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีไฟโบรอินและเจลาตินเป็นองค์ประกอบจะมีหมู่ฟังก์ชันที่พบอยู่ในโปรตีน และโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่มีไฟโบรอิน เจลาตินและโปรตีนโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบจะมีหมู่ฟังก์ชันที่พบอยู่ในโปรตีนและน้ำตาล แม้ว่าโปรตีนโอไกลแคนที่นำมาใช้สามารถกวดหาปริมาณโปรตีนด้วย BCA Assay kit ในการหาค่าการละลายของโปรตีนของโปรตีนโอไกลแคนในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้องได้ แต่เมื่อถูกนำมาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันภายในสารสกัดโปรตีนโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิลพบเพียงหมู่ฟังก์ชันที่แสดงถึงการมีโครงสร้างของหมู่น้ำตาลอยู่ในสารสกัด แต่ไม่พบหมู่ฟังก์ชันที่พบอยู่ในโปรตีนทั้งที่โปรตีนโอไกลแคนประกอบด้วยโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนและน้ำตาล ทั้งนี้ได้มีรายงานในการหาหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของลูกวัวด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีโดยใช้ resolution 4 ซม⁻¹ เหมือนกันกับงานวิจัยนี้ แต่ใช้ coaddition ต่างกัน คือใช้ 256 coaddition scans แต่ในงานวิจัยนี้ใช้ 128

coaddition scans [53] ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าการใช้โปรติโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนในสัตว์ต่างชนิดกันจะให้ผลการวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแตกต่างกัน หรือการใช้ coaddition ที่ต่างกันนี้อาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันในสารสกัดดังกล่าวด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

ในด้านคุณสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์กลุ่มตัวอย่างต่างๆ มาทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนังพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีแต่ไฟโบรอินและเจลาตินเป็นองค์ประกอบเท่านั้น สอดคล้องกับผลการศึกษาของ A. Passi และคณะ (1997) [68] ที่แสดงให้เห็นว่าโปรติโอไกลแคนสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารเจลาตินเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้สูงกว่า สอดคล้องกับผลการทดลองที่มีมาก่อนซึ่งแสดงให้เห็นว่าเจลาตินสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้เช่นเดียวกัน [69]

จากการทดสอบเกี่ยวกับกระบวนการหายของแผลภายนอกในร่างกายระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดโปรติโอไกลแคนเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารสกัดโปรติโอไกลแคนพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบมีอัตราการหายของแผลสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีส่วนประกอบของโปรติโอไกลแคนในโครงเลี้ยงเซลล์ในความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นทั้งหมดมีค่าร้อยละของการปิดของแผลมากกว่ากลุ่มควบคุม (22.035 ± 3.776228) โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก มีค่าร้อยละของการปิดของแผลมากที่สุด (26.2875 ± 1.54847) แต่ผลที่ได้นี้ก็ไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน

ไฟโบรอิน เจลาตินและโปรติโอไกลแคนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ถูกนิยมนำมาใช้ผลิตเป็นวัสดุปิดแผลใหม่เพราะสามารถเข้ากันได้ทั้งในทางชีวภาพ ถูกย่อยสลายได้ในทางชีวภาพ และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายมนุษย์ [70] A. Schneider และคณะได้ผลิตแผ่นเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากไฟโบรอินในเส้นไหมโดยมีสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังเป็นองค์ประกอบเพื่อใช้เป็นวัสดุปิดแผลโดยได้นำไปทดสอบการหายของแผลในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblasts) ภายนอกในร่างกายโดยพบว่าวัสดุปิดแผลดังกล่าวสามารถเร่งการหายของแผลได้ [71] H.W. Ju และคณะได้ผลิตไฮโดรเจลจากไฟโบรอินร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนทและคาร์บอกซีเมทิล-เซลลูโลสโดยพบว่าไฮโดรเจลที่ผลิตขึ้นสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ตัวอ่อนหนู (NIH 3T3 fibroblasts) และช่วยสร้างเซลล์ใหม่มาทดแทนเซลล์เก่าในแผลไหม้ระดับที่สองของหนูทดลองได้

[72] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยนำเอาไฟโบรอินกับเจลาตินมาใช้ร่วมกันในการผลิตเป็นวัสดุปิดแผลที่สามารถส่งเสริมการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929) และส่งเสริมการหายของแผลลึกในหนูทดลองได้ รวมทั้งยังมีความปลอดภัยและมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้รักษาหรือคืนสภาพผิวหนังของผู้บริจาคผิวหนังให้สร้างขึ้นใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [46, 73]

เทคนิคการเชื่อมขวางทางเคมีของโปรตีนถูกใช้เพื่อทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ถูกย่อยสลายทางชีวภาพในอัตราเร็วที่ช้าลง แต่มีการศึกษาพบว่า ถ้าผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากเจลาตินเพียงชนิดเดียวถึงแม้จะผ่านการเชื่อมขวางโปรตีนแล้วก็ยังมีอัตราการย่อยสลายเร็วโดยถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสไปร้อยละ 90 โดยน้ำหนักตั้งแต่ 15 นาทีแรกและย่อยสลายหมดหลังจากเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมงเท่านั้น ดังนั้นจึงมีการใช้ไฟโบรอินซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบในธรรมชาติมาผสมร่วมกับเจลาตินสำหรับการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์โดยผ่านการเชื่อมขวางโปรตีนเพื่อควบคุมให้อัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ช้าลง [45] จากการทดสอบการย่อยสลายในทางชีวภาพภายนอกร่างกายพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีนโกลบูลินเป็นองค์ประกอบจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสได้เร็วขึ้นเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนของไฟโบรอินและเจลาตินใกล้เคียงกันและไม่มีโปรตีนโกลบูลินเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบสูงกว่าจะมีอัตราการย่อยสลายที่สูงกว่า สอดคล้องกับผลการศึกษาของ P. Jetbumpenkul และคณะ (2011) [45] และ W. Anuchiracheewa และคณะ (2012) ที่พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์หรือตัวนำส่งยาที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินที่น้อยกว่าและมีอัตราส่วนผสมของเจลาตินที่มากกว่าจะมีอัตราการย่อยสลายในทางชีวภาพภายนอก่างกายมากกว่า [67] ทั้งนี้เพราะเอนไซม์คอลลาจีเนสมีความจำเพาะในการย่อยสลายเจลาตินที่ได้มาจากการแปรสภาพของคอลลาเจน แต่ไม่มีความจำเพาะในการย่อยสลายไฟโบรอิน จึงส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินที่น้อยกว่าและมีเจลาตินที่มากกว่ามีอัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินที่มากกว่าและมีเจลาตินที่น้อยกว่า

เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและเจลาตินที่มีสารโปรตีนโกลบูลินเป็นองค์ประกอบสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้ จึงน่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้ในการรักษาบาดแผลทางคลินิก ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

โปรติโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลาสามารถนำมาผสมในการขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 เจลาตินร้อยละ 73.75 และโปรติโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก มีขนาดของรูพรุนใหญ่ที่สุด แต่มีความสามารถในการดูดซับน้ำต่ำที่สุด ซึ่งผลจากการวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด-สเปกโทรสโกปีแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบมีหมู่ฟังก์ชันเอไมด์และน้ำตาลอยู่ในโครงสร้าง

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรติโอไกลแคนส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบอย่างมีนัยสำคัญ แต่รูปแบบการหายของแผลภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์ทุกกลุ่มตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรติโอไกลแคนมีผลในการเพิ่มอัตราการย่อยสลายภาพทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ให้เร็วขึ้น

สรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบมีแนวโน้มในการนำไปใช้ประโยชน์ในการช่วยส่งเสริมการหายของแผลโดยการเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนัง โดยอัตราส่วนของไฟโบรอิน : เจลาติน : สารสกัดโปรติโอไกลแคนที่เหมาะสมที่สุด คือ 25 : 73.75 : 1.25

6.2 ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยครั้งถัดไป ควรจะมีการใช้โปรติโอไกลแคนให้มีความเข้มข้นมากขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อจะได้นำมาเปรียบเทียบกัน และเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำมาใช้ผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกความเข้มข้นเพียงหนึ่งความเข้มข้นโดยอาศัยข้อมูลที่มีผู้ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารละลายโปรติโอไกลแคนในหลายๆความเข้มข้นมาปรับใช้กับการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารจำพวกโปรตีน

เนื่องจากโปรติโอไกลแคนมีส่วนของโครงสร้างหลักที่เป็นโปรตีนเป็นองค์ประกอบ และสารที่นำมาใช้ร่วมกันในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ก็เป็นโปรตีนเช่นกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้วิธีการวัดโปรตีนเพื่อดูรูปแบบในการปลดปล่อยโปรติโอไกลแคนในช่วงเวลาต่างๆได้ ซึ่งถ้าสามารถหาวิธีการวัดโปรติโอไกลแคนอย่างจำเพาะได้ก็ควรทำการทดลองเกี่ยวกับการปลดปล่อยโปรติโอไกลแคนเพิ่มเติม โดยในงานวิจัยนี้จะดูผลโดยอ้อมโดยใช้ผลการทดลองจากเซลล์มาวิเคราะห์ ซึ่งถ้ามีการใช้วัสดุอื่นที่ไม่ใช่

โปรตีนมาขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ร่วมกับโปรตีนโอไกลแคนก็อาจจะสามารถวัดการปลดปล่อยของโปรตีนโอไกลแคนได้โดยการวัดโปรตีน

ในการศึกษาครั้งถัดไป อาจจะต้องตัดส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนของโปรตีนโอไกลแคนออก เพื่อจะได้ศึกษาเฉพาะส่วนที่เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้าย epidermal growth factor ของโปรตีนโอไกลแคน เท่านั้นว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ เพราะไกลโคซามิโนไกลแคนส์ซึ่งเป็นอีกองค์ประกอบหลักของโปรตีนโอไกลแคนนั้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เช่นเดียวกัน

ในการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากจะศึกษาเซลล์ในชั้นหนังแท้แล้ว อาจจะต้องศึกษาเซลล์ในชั้นหนังกำพร้าเพิ่มเติม เช่น keratinocytes และ epidermal cells เป็นต้น



รายการอ้างอิง

- [1] Kane JB, Tompkins RG, Yarmush ML, et al. Burn dressings. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al, editors. Biomaterials science an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press; 1996; p.360-370.
- [2] Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Basic science. 2007; 31-37.
- [3] Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. Basic science. 2011; 475-479.
- [4] Beldon P. Basic science of wound healing. Basic science. 2010; 409-412.
- [5] Handley CJ, Samiric T, Ilic MZ. Structure, metabolism, and tissue roles of chondroitin sulfate proteoglycans. Adv Pharmacol 2006; 53: 219-232.
- [6] Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. Microsc Res Tech 1994; 28: 385-397.
- [7] Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins. Physiol Rev 2000; 80: 1267-1290.
- [8] Stanescu V, Chaminade F, Stanescu R. The epidermal growth factor-like domain of the large proteoglycans from articular cartilage (aggrecans). Estimate of content at different ages and in osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 1993; 1: 179-184.
- [9] Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. Seminars in cell & developmental biology 2001; 12: 69-78.
- [10] Majima M, Takagaki K, Sudo Si, et al. Effect of proteoglycan on experimental colitis. International Congress Series 2001; 1223: 221-224.
- [11] Kakizaki I, Mineta T, Sasaki M, et al. Biochemical and atomic force microscopic characterization of Salmon nasal cartilage proteoglycan 2014; 103: 538-549.
- [12] Yang CH, Huang YB, Wu PC, et al. The evaluation of stability of recombinant human epidermal growth factor in burn-injured pigs. Process Biochem 2005; 40: 1661-1665.
- [13] Zhang Y, Cao L, Yang BL, et al. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. J Biol Chem 1998; 273: 21342-21351.

- [14] Zheng PS, Wen J, Ang LC, et al. Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *FASEB J* 2004; 18: 754-756.
- [15] Kucharova K, Stallcup WB. The Ng2 Proteoglycan Promotes Oligodendrocyte Progenitor Proliferation and Developmental Myelination. *Neuroscience* 2010; 166: 185-194.
- [16] Xiong J, Wang Y, Zhu ZH, et al. NG2 proteoglycan increases mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 960-967.
- [17] Bertolami CN, Messadi DV. The role of proteoglycans in hard and soft-tissue repair. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5: 311-337.
- [18] Sarkar D, Zhao W, Schaefer S, et al. Overview of tissue engineering concepts and applications. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al, editors. *Biomaterials science an introduction to materials in medicine*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2013; p.1122-1137.
- [19] Nerem RM. *Tissue Engineering : From Basic Biology to Cell-Based Applications*. Tissue Engineering and Stem Cells. 1-11.
- [20] Hwang YS, Chung BG, Chung AM, et al. Microengineering the Embryonic Stem Cell Environment. *Stem Cell Bioengineering and Tissue Engineering Microenvironment*. 3-31.
- [21] Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives. *J Biomat Sci-Polym E* 2001; 12: 107-124.
- [22] Subia B, Kundu J, Kundu SC. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. In: Eberli D, editor. *Tissue engineering*. Rijeka: Intech; 2010; p.141-157.
- [23] Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliver Rev* 2013; 65: 457-470.
- [24] Ko JS, Yoon K, Ki CS, et al. Effect of degumming condition on the solution properties and electrospinnability of regenerated silk solution. *Int J Biol Macromol* 2013; 55: 161-168.

- [25] Pritchard EM, Kaplan DL. Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery. *Expert Opin Drug Del* 2011; 8: 797-811.
- [26] Lee KY, Kong SJ, Park WH, et al. Effect of surface properties on the antithrombogenicity of silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *J Biomat Sci-Polym E* 1998; 9: 905-914.
- [27] Shang SM, Zhu L, Fan JT. Intermolecular interactions between natural polysaccharides and silk fibroin protein. *Carbohydrate polymers* 2013; 93: 561-573.
- [28] Liu SS, Dong CF, Lu GZ, et al. Bilayered vascular grafts based on silk proteins. *Acta Biomater* 2013; 9: 8991-9003.
- [29] Ma XL, Cao CB, Zhu HS. The biocompatibility of silk fibroin films containing sulfonated silk fibroin. *J Biomed Mater Res Part B-Appl Biomater* 2006; 78: 89-96.
- [30] Lu Q, Hu K, Feng QL, et al. Growth of fibroblast and vascular smooth muscle cells in fibroin/collagen scaffold. *Mater Sci Eng C* 2009; 29: 2239-2245.
- [31] Horan RL, Antle K, Collette AL, et al. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials* 2005; 26: 3385-3393.
- [32] Wongpanit P, Ueda H, Tabata Y, et al. In vitro and in vivo release of basic fibroblast growth factor using a silk fibroin scaffold as delivery carrier. *J Biomater Sci Polym Ed* 2010; 21: 1403-1419.
- [33] Zeng C, Yang Q, Zhu M, et al. Silk fibroin porous scaffolds for nucleus pulposus tissue engineering 2014; 37: 232-240.
- [34] Wang Y, Bella E, Lee CSD, et al. The synergistic effects of 3-D porous silk fibroin matrix scaffold properties and hydrodynamic environment in cartilage tissue regeneration. *Biomaterials* 2010; 31: 4672-4681.
- [35] Tabata Y, Ikada Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliver Rev* 1998; 31: 287-301.
- [36] GMIA. *Gelatin Handbook*, Gelatin Manufacturers Institute of America, Inc., New York, NY. 2012 .
- [37] Lai JY. The role of bloom index of gelatin on the interaction with retinal pigment epithelial cells. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 3442-3456.

- [38] Huss FRM, Nyman E, Bolin JSC, et al. Use of macroporous gelatine spheres as a biodegradable scaffold for guided tissue regeneration of healthy dermis in humans: an in vivo study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63: 848-857.
- [39] Chandra R, Rustgi R. Biodegradable Polymers. *Prog Polym Sci* 1998; 23: 1273-1335.
- [40] Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Damrongsakkul S. The Development of Injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25: 401-410.
- [41] Kenawy ER, Cinelli P, Corti A, et al. Biodegradable composite films based on waste gelatin. *Macromol Symp* 1999; 144: 351-364.
- [42] Kandil S, Kenawy ER, El-Maghraby A, et al. Recycling of pharmaceutical waste gelatin for controlled release applications II: a tri-fluralin based system. *Polym Plast Technol Eng* 2004; 43: 1695-1709.
- [43] Chomchalao P, Pongcharoen S, Sutheerawattananonda M, et al. Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture. *Biomedical engineering online* 2013; 12: 28.
- [44] Wang SD, Zhang YZ, Wang HW, et al. Fabrication and Properties of the Electrospun Polylactide/Silk Fibroin-Gelatin Composite Tubular Scaffold. *Biomacromolecules* 2009; 10: 2240-2244.
- [45] Jetbumpenkul P, Amornsudthiwat P, Kanokpanont S, et al. Balanced electrostatic blending approach - An alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold. *Int J Biol Macromol* 2012; 50: 7-13.
- [46] Kanokpanont S, Damrongsakkul S, Ratanavaraporn J, et al. An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing. *International journal of pharmaceutics* 2012; 436: 141-153.
- [47] Lan Y, Li WC, Guo R, et al. Preparation and characterisation of vancomycin-impregnated gelatin microspheres/silk fibroin scaffold. *J Biomat Sci-Polym E* 2014; 25: 75-87.
- [48] Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, et al. In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Materials Science and Engineering C* 2013; 33: 1219-1227.

- [49] Goncalves VL, Laranjeira MCM, Favere VT, et al. Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium. *Polimeros* 2005; 15: 6-12.
- [50] Torres MA, Vieira RS, Beppu MM, et al. Production of Chemically Modified Chitosan Microspheres by a Spraying and Coagulation Method. *Materials Research* 2007; 10: 347-352.
- [51] Kim UJ, Park J, Kim HJ, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* 2005; 26: 2775-2785.
- [52] Bondar B, Fuchs S, Motta A, et al. Functionality of endothelial cells on silk fibroin nets: comparative study of micro- and nanometric fibre size. *Biomaterials* 2008; 29: 561-572.
- [53] Camacho NP, West P, Torzilli PA, et al. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers* 2001; 62: 1-8.
- [54] Motta A, Maniglio D, Migliaresi C, et al. Silk fibroin processing and thrombogenic responses. *J Biomater Sci Polymer Edn* 2009; 20: 1875-1897.
- [55] Aramwit P, Ratanavaraporn J, Ekgasit S, et al. A green salt-leaching technique to produce sericin/PVA/glycerin scaffolds with distinguished characteristics for wound-dressing applications. *Biomedical Materials Research B* 2014; 00B: 1-10.
- [56] Potter K, Kidder LH, Levin IW, et al. Imaging of collagen and proteoglycan in cartilage sections using Fourier transform infrared spectral imaging. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 846-855.
- [57] Siritienthong T, Ratanavaraporn J, Aramwit P. Development of ethyl alcohol-precipitated silk sericin/polyvinyl alcohol scaffolds for accelerated healing of full-thickness wounds. *Int J Pharm* 2012; 439: 175-186.
- [58] Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications* 1991; 3: 207-212.
- [59] Siritientong T, Angspatt A, Ratanavaraporn J, Aramwit P. Clinical Potential of a Silk Sericin-Releasing Bioactive Wound Dressing for the Treatment of Split-Thickness Skin Graft Donor Sites. *Pharm Res-Dordr.* 2014;31:104-16.

- [60] Shahverdi S, Hajimiri M, Esfandiari MA, Larijani B, Atyabi F, Rajabiani A, et al. Fabrication and structure analysis of poly(lactide-co-glycolic acid)/silk fibroin hybrid scaffold for wound dressing applications. *International journal of pharmaceutics*. 2014; 473: 345-355.
- [61] Kakizaki I, Tataru Y, Majima M, et al. Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage. *Arch Biochem Biophys* 2011; 506: 58-65.
- [62] Ito G, Kobayashi T, Takeda Y, et al. Proteoglycan from salmon nasal cartilage promotes in vitro wound healing of fibroblast monolayers via the CD44 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 456: 792-798.
- [63] Huttmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polymer Edn* 2001; 12: 107-124.
- [64] Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 141-150.
- [65] Liao CJ, Chen CF, Chen JH, et al. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 676-681.
- [66] He JK, Liu YX, Hao X, et al. Bottom-up generation of 3D silk fibroin-gelatin microfluidic scaffolds with improved structural and biological properties. *Mater Lett* 2012; 78: 102-105.
- [67] Anuchiracheewa W, Pavasant P, Kanokpanont S. Gelatin/Fibroin Hydrogel for Controlled Release of Human Dentin Matrix Extract. *Advanced Material Research* 2012; 506: 505-508.
- [68] Passi A, Albertini R, Campagnari F, et al. Modifications of proteoglycans extracted from monolayer cultures of young and senescent human skin fibroblasts. *Febs Lett* 1997; 420: 175-178.
- [69] Wissemann KW, Jacobson BS. Pure gelatin microcarriers: synthesis and use in cell attachment and growth of fibroblast and endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1985; 21: 391-401.
- [70] Mogosanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International journal of pharmaceutics*. 2014; 463: 127-136.

- [71] Schneider A, Wang XY, Kaplan DL, et al. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. 2009; 5: 2570-2578.
- [72] Ju HW, Lee OJ, Moon BM, et al. Silk fibroin based hydrogel for regeneration of burn induced wounds. Tissue Eng Regen Med. 2014; 11: 203-210.
- [73] Hasatsri S, Angspatt A, Aramwit P. Randomized Clinical Trial of the Innovative Bilayered Wound Dressing Made of Silk and Gelatin: Safety and Efficacy Tests Using a Split-Thickness Skin Graft Model. Evid-Based Compl Alt. 2015: 1-8.



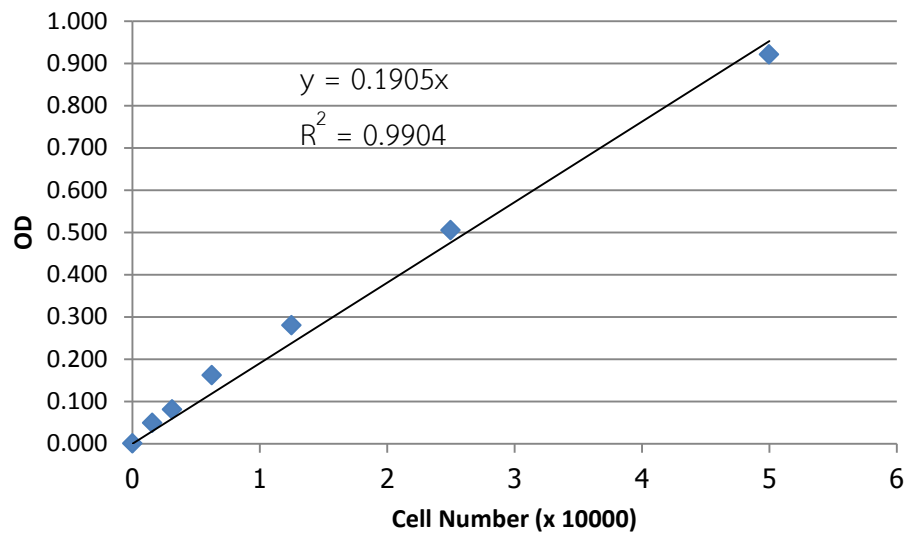


ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ L929 ด้วยวิธี MTT Assay



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ L929 ด้วยวิธี MTT Assay



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปัญญา วีรวัฒน์พงศ์ เกิดที่จังหวัดเชียงใหม่ ในวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2532 สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในปี พ.ศ.2552 จากโรงเรียนชลบุรี “สุขบท” สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) สาขาวิชา เทคนิคการแพทย์ วิชาเอกเทคนิคการแพทย์ วิชาโทเภสัชชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 จากนั้นได้เข้ารับการ studia ต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

- ปัญญา วีรวัฒน์พงศ์, พรอนงค์ อรั่มวิทย์. การประยุกต์ใช้สารโปรตีนไอโกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลานิลในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและเจลาตินเพื่อเร่งการหายของบาดแผลในระดับห้องปฏิบัติการ. สงขลานครินทร์เวชสาร 2558: 5: 247-258.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY