

การวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดจากผิวหนังก : วัตถุติบชนิดใหม่สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ



นายเกษม ธีรฤตยากร

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF DERMAL EXTRACTS : THE NEW RAW MATERIAL FOR  
TISSUE ENGINEERING



Mr. Kasem Theerakittayakorn

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Sciences

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดจากมิวนัง :  
วัตถุดิบชนิดใหม่สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

โดย

นายเกษม อีรกฤตยากร

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

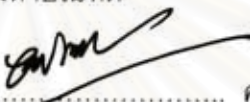
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ถนอม บรรณประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

นายแพทย์อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์

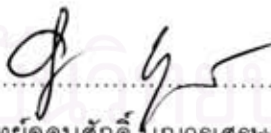
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักศึกษานี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


  
..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ถนอม บรรณประเสริฐ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(นายแพทย์อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร.ขวัญชนก พสุวัต)

เกษม ธีรฤกษ์ยากร : การวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดจากผิวหนัง :

วัตถุดิบชนิดใหม่สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ. (CHARACTERIZATION OF DERMAL EXTRACTS : THE NEW RAW MATERIAL FOR TISSUE ENGINEERING ) อ.ที่

ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : นพ.อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์, 130 หน้า.

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีปริมาณมากในร่างกายและประกอบด้วย Extracellular matrix เป็นปริมาณมาก จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ (Scaffold) สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมสารสกัดจากผิวหนังแล้ววิเคราะห์องค์ประกอบ เตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติและการตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิด

งานวิจัยนี้เตรียมสารสกัดจากผิวหนัง (Dermal extracts) เป็น 3 สูตร กำหนดชื่อเป็น DE-1, DE-2 และ DE-3 ประกอบด้วยคอลลาเจน 92.23, 79.07 และ 161.68 ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และประกอบด้วย Sulfated GAGs ปริมาณ  $3.09 \pm 0.51$ ,  $1.36 \pm 0.39$  และ  $6.91 \pm 0.87$  ตามลำดับ สารสกัดจากผิวหนังนำมาเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้ววิเคราะห์คุณสมบัติเปรียบเทียบกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I Collagen) จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp. คอลลาเจนชนิดที่ 1 มีรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ที่สุด คือ  $188.84 \pm 35.41$  ไมโครเมตร โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2, DE-3 และคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $145.68 \pm 46.86$ ,  $142.54 \pm 45.39$ ,  $97.81 \pm 21.99$  และ  $188.84 \pm 35.41$  ไมโครเมตร, มีค่า Compressive modulus เป็น  $145.68 \pm 46.86$ ,  $142.54 \pm 45.39$ ,  $97.81 \pm 21.99$  และ  $188.84 \pm 35.41$  กิโลปาสคาล และมีระยะเวลาในการย่อยสลายจนมีน้ำหนักเหลือร้อยละ 50 จากน้ำหนักเริ่มต้น เป็น 3.30, 3.30, 6.30 และ 2.57 ชั่วโมง ตามลำดับ

การทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมนุษย์ (human B-MSCs) เมื่อทดสอบกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2, DE-3 และคอลลาเจนชนิดที่ 1 พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะร้อยละ  $73.15 \pm 6.72$ ,  $73.15 \pm 4.55$ ,  $72.01 \pm 7.31$  และ  $89.79 \pm 6.57$  ตามลำดับจากการนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ เมื่อทดสอบการเกิด Osteogenic differentiation พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงปกติเซลล์ต้นกำเนิดสามารถเกิด Osteogenic differentiation ได้ แสดงว่าวัตถุดิบทุกชนิดที่ทดสอบสามารถเหนี่ยวนำการเกิด Osteogenic differentiation ได้ นอกจากนี้แม้ไม่มีเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่พบการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้ซึ่งเกิดจากวัตถุดิบที่ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับแคลเซียมได้เอง

งานวิจัยนี้ยืนยันให้เห็นว่าสารสกัดจากผิวหนังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบชนิดใหม่สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์.....  
ปีการศึกษา..... 2551.....

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่ออ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

## 5074755830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : DERMAL EXTRACT / SCAFFOLD / TISSUE ENGINEERING

KASEM THEERAKITTAYAKORN : CHARACTERIZATION OF DERMAL EXTRACTS : THE NEW RAW MATERIAL FOR TISSUE ENGINEERING.

ADVISOR : ASST.PROF.TANOM BUNPRASERT, CO-ADVISOR : UDOMSAK BUNWORASATE, M.D., 130 pp.

Skin, the large volume organ in human body with abundant of extracellular matrix, has potential to be used as raw material for scaffold preparation in Tissue engineering. This research aim to characterize extracellular matrix components in dermal extracts, characterize fundamental property and assess the stem cell responses in dermal extract-derived scaffold.

Cadaveric human skin was prepared to be 3 fractions of dermal extracts, defined as DE-1, DE-2 and DE-3. These dermal extracts, DE-1, DE-2 and DE-3, respectively contained collagen 92.23, 79.07 and 161.68 µg/mg dry weight and contained sulfated glycosaminoglycans 3.09±0.51, 1.36±0.39 and 6.91±0.87 µg/mg dry weight. Scaffolds were prepared and were characterized properties comparing with scaffold from type I collagen, commercially provided by Sigma-Aldrich corporation. For DE-1, DE-2, DE-3 and type I collagen scaffolds, average pore diameter were 145.68±46.86, 142.54±45.39, 97.81 ±21.99 and 188.84±35.41 µm, respectively, degradation time for 50 percent weight loss were 3.30, 3.30, 6.30 and 2.57 hours, respectively.

Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (h B-MSCs) were isolated and were characterized for assessing the stem cell response to dermal extract-derived scaffold. Cell attachment, measured after 1 day of seeding, of DE-1, DE-2, DE-3 and type I collagen scaffolds were 73.15±6.72, 73.15±4.55, 72.01±7.31 and 89.79±6.57 percent, respectively. Osteogenic differentiation of h B-MSCs in each type of scaffolds was assayed. The results of Alkaline phosphatase activity indicated that, even though in normal culture medium, h B-MSCs were differentiated. The results confirmed osteoinductive property of all type of scaffold materials. Surprisingly, scaffolds without h B-MSCs showed increasing calcium deposit. All type of scaffold materials deposit calcium by themselves.

This research insisted the potential of dermal extracts to be use as new raw material for tissue engineering.

Field of Study : MEDICAL SCIENCE  
Academic Year : 2551

Student's Signature   
Advisor's Signature   
Co-Advisor's Signature 

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ถนอม บรรณประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษา, นายแพทย์อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมทั้งประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ และอาจารย์คณะกรรมการทุกท่านซึ่งได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ศิริพรชัย ศุภนคร และ ดร.ขวัญชนก พสุวัต เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือต่างๆ ในงานวิจัย

ขอบพระคุณผู้บริจาคไขกระดูกที่มีจิตใจเมตตา เอื้อเพื่อบริจาคไขกระดูกมาเพื่อใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งขอบพระคุณอาจารย์ใหญ่ผู้บริจาคร่างกายแก่โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์เพื่อเป็นประโยชน์ทางการศึกษาวิจัยของนิสิตนักศึกษา

ขอขอบคุณพี่เจ้าหน้าที่และพี่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทดลองที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย ช่วยติดต่อประสานงานในกิจกรรมต่างๆ

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะสังเคราะห์ ที่ได้ให้คำแนะนำ การช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคน ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนมาโดยตลอด จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.1.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ.....	4
2.1.2 Extracellular matrix.....	9
2.1.3 Extracellular matrix ในผิวหนัง.....	14
2.1.4 กระบวนการเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	19
2.1.5 คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ต่อการตอบสนองของเซลล์.....	22
2.1.6 เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells).....	28
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	32
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	37
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	38
3.3 วิธีการทดลอง.....	39
3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนังและการวิเคราะห์องค์ประกอบ.....	39
3.3.1.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง.....	39
3.3.1.1.1 การเตรียมผิวหนังชั้นหนังแท้ (Dermis).....	39
3.3.1.1.2 การเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้.....	41
3.3.1.1.3 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง.....	42

3.3.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ ECM ในสารสกัดจาก	
ผิวหนังแต่ละสูตร.....	43
3.3.1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน.....	43
3.3.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated GAGs.....	45
3.3.2 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และการวิเคราะห์คุณสมบัติ.....	48
3.3.2.1 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	48
3.3.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	51
3.3.2.2.1 การวิเคราะห์รูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์...	51
3.3.2.2.2 การวิเคราะห์ความต้านทานแรงกด.....	51
3.3.2.2.3 การวิเคราะห์การย่อยสลายของโครงเนื้อเยื่อ	51
สังเคราะห์โดยเอนไซม์.....	51
3.3.3 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและการวิเคราะห์	
คุณสมบัติของเซลล์.....	52
3.3.3.1 การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก.....	53
3.3.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก..	57
3.3.3.2.1 การวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์โดยวิธี	
Flow cytometry.....	57
3.3.3.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต.....	57
3.3.3.2.3 การวิเคราะห์จำนวนเซลล์โดยวิธี MTT assay...	58
3.3.3.2.4 การทดสอบการเกิด Osteogenic	
differentiation.....	61
3.3.3.2.5 การทดสอบการเกิด Adipogenic	
differentiation.....	68
3.3.4 การวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิดในโครงเนื้อเยื่อ	
สังเคราะห์.....	69
3.3.4.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดภายใน	
โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	69
3.3.4.2 การวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ใน	
โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	70



บทที่	หน้า
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	71
4.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนังและการวิเคราะห์องค์ประกอบ.....	71
4.1.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง.....	71
4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ ECM ในสารสกัดจากผิวหนัง แต่ละสูตร.....	72
4.1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน.....	72
4.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated Glycosaminoglycans....	73
4.2 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และการวิเคราะห์คุณสมบัติ.....	76
4.2.1 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	76
4.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	76
4.2.2.1 การวิเคราะห์รูปพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	76
4.2.2.2 การวิเคราะห์ความต้านทานแรงกด.....	78
4.2.2.3 การวิเคราะห์การย่อยสลายของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ โดยเอนไซม์.....	79
4.3 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและการวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์	82
4.3.1 การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก.....	82
4.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก.....	82
4.3.2.1 การวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์โดยวิธี Flow cytometry.	82
4.3.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต.....	84
4.3.2.3 การทดสอบการเกิด Osteogenic differentiation.....	86
4.3.2.4 การทดสอบการเกิด Adipogenic differentiation.....	91
4.4 การวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิดในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	93
4.4.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครง เนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	93
4.4.2 การวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ของเซลล์ใน โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	101
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	121
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	121
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	123

บทที่	หน้า
5.3 งานวิจัยต่อไปในอนาคต.....	124
รายการอ้างอิง.....	125
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	130



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

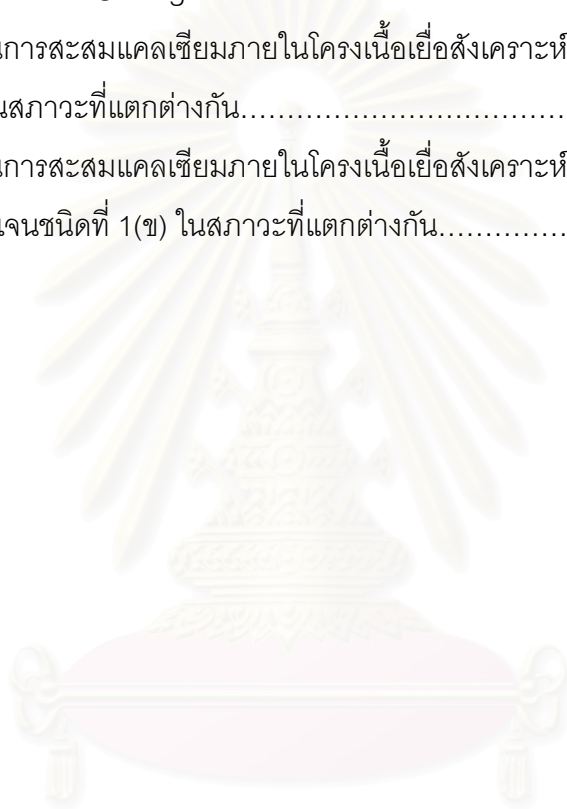
ภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนโดยทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ.....	4
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในร่างกาย.....	5
2.3	วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่มีองค์ประกอบเดียวในการใช้บำบัดรักษา.....	7
2.4	วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่มีองค์ประกอบมากกว่า 1 อย่างในการใช้บำบัดรักษา.....	8
2.5	ความสัมพันธ์ระหว่าง Extracellular matrix กับเซลล์ในเนื้อเยื่อของร่างกาย.....	9
2.6	ลักษณะของ Extracellular matrix แต่ละชนิดซึ่งเชื่อมต่อกับโครงสร้างของ เซลล์.....	10
2.7	การจัดเรียงตัวของคอลลาเจนตั้งแต่ระดับสายพอลิเปปไทด์จนเป็นมัดเส้นใย คอลลาเจน.....	11
2.8	หน้าที่ของคอลลาเจนในการสะสมผลึกของ Hydroxyapatite ในเนื้อเยื่อกระดูก.	12
2.9	โครงสร้างของผิวหนังมนุษย์.....	14
2.10	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Glycosaminoglycans (วิเคราะห์จากปริมาณ Uronic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก) ในแต่ละช่วงอายุของมนุษย์.....	16
2.11	ECM ที่พบในผิวหนังแสดงให้เห็นจากการย้อมทางเนื้อเยื่อวิทยา.....	18
2.12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความดันต่อการเปลี่ยนสถานะของน้ำ.	19
2.13	ลักษณะรูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนที่เตรียมโดย กระบวนการที่ต่างกัน.....	21
2.14	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของรูพรุนและการยึดเกาะของเซลล์ในโครง เนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนและ Chondroitin-6-sulfate.....	22
2.15	กระบวนการ Mechanotransduction ในการตอบสนองต่อคุณสมบัติทางกล ของวัสดุที่เซลล์สัมผัส.....	24
2.16	Elasticity ที่เหมาะสมต่อเซลล์ต้นกำเนิดในการเปลี่ยนรูปร่างและเกิด Specification เพื่อเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ.....	25
2.17	การรับสัญญาณ ECM ของเซลล์ผ่านทาง Integrins ที่เชื่อมหุ้มเซลล์.....	26
2.18	ลำดับกรดอะมิโนของ ECM ที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณกระตุ้นการตอบสนองของ เซลล์ในรูปแบบต่างๆ.....	27

2.19	ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ในร่างกาย.....	29
2.20	สารที่ใช้ในการเหนี่ยวนำกระบวนการเกิด Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ.....	30
2.21	การแสดงออกของเซลล์ขณะเกิด Osteogenic differentiation.....	31
2.22	เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากวัสดุดิบต่างชนิดกันแล้วชักนำให้เกิด Adipogenic differentiation เซลล์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์ Adipocyte จะย้อมติดสีแดงของ Oil red O.....	33
2.23	การเจริญเติบโตซ้อนกันเป็นชั้นของเซลล์ Esophageal epithelial cells เมื่อเพาะเลี้ยงบน AlloDerm เปรียบเทียบกับ PLGA75.....	34
2.24	ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนที่เตรียมโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียสก่อนการทำแห้งแบบเยือกแล้ว เชื่อมขวาง (L) และ ไม่เชื่อมขวางโมเลกุล (UL) ด้วย Glutaraldehyde เปรียบระหว่างชุดที่มีและไม่มีเซลล์ Osteoblast.....	35
2.25	การสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนแสดงแคลเซียมติดสีน้ำตาลเข้มจากการย้อมโดยวิธี von Kossa stain.....	35
3.1	กระบวนการเตรียมผิวหนังชั้นหนังแท้.....	40
3.2	กระบวนการเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้.....	41
3.3	ลักษณะที่ได้จากกระบวนการเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง.....	42
3.4	สารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา ได้แก่ DE-1, DE-2 และ DE-3 ตามลำดับ และขวาสุด คือ สารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	43
3.5	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของ GAGs และค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์โดยวิธี Dimethylmethylene blue assay.....	47
3.6	การเตรียมสารสกัดจากผิวหนังลงในแม่แบบขึ้นรูป.....	49
3.7	กระบวนการทำแห้งเพื่อขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	50
3.8	โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ลักษณะเป็นวงกลมหนา 2 มม.....	50
3.9	กระบวนการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก.....	54
3.10	เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่จากการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น (Primary culture).....	55
3.11	เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยง Passage ที่ 1.....	56
3.12	การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดโดยวิธี MTT assay.....	60

3.13	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์โดยวิธี MTT assay.....	61
3.14	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย p-Nitrophenol และค่าการดูดกลืนแสง.....	64
3.15	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมและค่าการดูดกลืนแสง.....	67
4.1	กราฟแท่งแสดงปริมาณคอลลาเจนในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร.....	73
4.2	กราฟแท่งแสดงปริมาณ Sulfated GAGs ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร.....	74
4.3	ลักษณะรูพรุนทางด้านข้างของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ จากการวิเคราะห์โดย SEM.....	77
4.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการย่อยโดยเอนไซม์และร้อยละของน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น.....	80
4.5	การวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกโดยวิธี Flow cytometry.....	83
4.6	กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก.....	85
4.7	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบระหว่างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและที่เพาะเลี้ยงอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	87
4.8	กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบระหว่างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและที่เพาะเลี้ยงอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	88
4.9	การสะสมแคลเซียมของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบระหว่างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและที่เพาะเลี้ยงอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	89
4.10	เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Adipogenic differentiation เป็นระยะเวลา 21 วัน ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	92
4.11	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ.....	95

4.12	โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ปราศจากเซลล์ (แถวบนของแต่ละรูป) และที่มีเซลล์ (แถวล่างของแต่ละรูป) เรียงจากซ้ายไปขวา ได้แก่ DE-1, DE-2, DE-3 และคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	96
4.13	โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	97
4.14	โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-2 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	98
4.15	โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-3 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	99
4.16	โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	100
4.17	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ.....	103
4.18	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	104
4.19	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ.....	105
4.20	กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ.....	108
4.21	กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	109
4.22	กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ.....	110
4.23	ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ.....	114

4.24	ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่มีเซลล์ ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	115
4.25	ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่ไม่มีเซลล์ ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ.....	116
4.26	ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่ไม่มีเซลล์ ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	117
4.27	ปริมาณการสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ DE-1 (ก) และ DE- 2 (ข) ในสภาวะที่แตกต่างกัน.....	118
4.28	ปริมาณการสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ DE-3 (ก) และ คอลลาเจนชนิดที่ 1(ข) ในสภาวะที่แตกต่างกัน.....	119



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ข้อมูลคอลลาเจนชนิดต่างๆ แสดงกลุ่มของคอลลาเจนตามหน้าที่การทำงาน โครงสร้างโมเลกุล ยีนกำหนดการสร้าง และ แหล่งของเนื้อเยื่อที่พบ.....	13
2.2	ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบของ ECM ในผิวหนังชั้นหนังแท้ .....	15
2.3	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของแต่ละกระบวนการที่ใช้ในการขึ้นรูปโครง เนื้อเยื่อสังเคราะห์ .....	20
2.4	ผลิตภัณฑ์โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากผิวหนังของมนุษย์และสัตว์.....	36
3.1	ข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Sulfated GAGs ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Dimethylmethylene Blue assay.....	46
3.2	ข้อมูลจากการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่จำนวนต่างๆ โดย วิธี MTT assay.....	59
3.3	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรของสารละลาย p- Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	64
3.4	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรของสารละลายแคลเซียมที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	66
4.1	ความหนาแน่นของสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สุนัข.....	71
4.2	ปริมาณคอลลาเจนในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสุนัข.....	72
4.3	ปริมาณ Sulfated GAGs ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสุนัข.....	73
4.4	ปริมาณองค์ประกอบและสัดส่วนของ Sulfated GAGs และคอลลาเจน ที่พบ ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสุนัข.....	75
4.5	ขนาดรูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละชนิด.....	77
4.6	ค่า Compressive modulus ของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสุนัข.....	78
4.7	การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อย่อยสลายโดยเอนไซม์ Collagenase type I ที่ระยะเวลาต่างๆ.....	79
4.8	ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายจนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีน้ำหนักลดลงจน เหลือร้อยละ 50 ของน้ำหนักเริ่มต้น.....	81
4.9	ร้อยละของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่ปรากฏแอนติเจนต่างๆ.....	84



4.10	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง.....	84
4.11	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	87
4.12	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ Alkaline phosphatase ระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	88
4.13	การสะสมแคลเซียมระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation.....	89
4.14	จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ภายหลังจากกระบวนการนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์.....	93
4.15	จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อทำการวัดจำนวนเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยง.....	94
4.16	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ...	102
4.17	กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ.....	107
4.18	การสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆในกรณีที่มีเซลล์...	112
4.19	การสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆในกรณีที่ไม่มีเซลล์.....	113

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ (Scaffold) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) โดยทำหน้าที่เป็นโครงให้เซลล์เจริญเติบโตเพื่อพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่มีโครงสร้าง 3 มิติได้ คุณสมบัติของวัสดุที่นำมาใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีผลอย่างมากต่อความสำเร็จของการใช้ประโยชน์ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาใช้ในร่างกายของมนุษย์เพื่อการบำบัดรักษา เนื่องจากเซลล์สามารถตอบสนองต่อวัสดุที่เซลล์สัมผัสได้ ดังนั้นวัสดุที่นำมาใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จึงต้องมีคุณสมบัติที่ทำให้เซลล์หรือร่างกายเกิดการตอบสนองในรูปแบบที่ต้องการได้ ในบรรดาวัสดุที่นำมาใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ วัสดุที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ได้เป็นอย่างดี ก็คือ Extracellular matrix (ECM) ซึ่งได้จากร่างกายของสิ่งมีชีวิตเอง

ECM เป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อหลายชนิดของร่างกาย มีความสำคัญต่อการทำงานของเนื้อเยื่อโดยทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น ในด้านคุณสมบัติเชิงกลทำให้เกิดความยืดหยุ่นหรือความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ในร่างกาย มีส่วนช่วยในการทำงานของเซลล์ ทำหน้าที่เป็นสัญญาณ (Signals) ที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ และช่วยส่งเสริมการทำงานของสารตัวอื่นในระบบการทำงานของร่างกายได้หลายชนิด ดังนั้น ECM จึงมีคุณสมบัติหลายประการที่เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้เป็นวัสดุสำหรับทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

ECM สามารถสกัดได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิดโดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มี ECM เป็นองค์ประกอบปริมาณมาก ECM ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลายชนิด เช่น ผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) เอ็นยึดกล้ามเนื้อ (tendon) เอ็นยึดกระดูก (ligament) รก (placenta) เป็นต้น จากสัตว์หลายชนิดได้ถูกสกัดแยกออกมาเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการใช้เป็นวัสดุสำหรับทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์อย่างแพร่หลาย งานวิจัยส่วนมากจะสกัดแยกสารองค์ประกอบของ ECM บางชนิด เช่น Collagen, Hyaluronic acid หรือ Glycosaminoglycans (GAGs) มาเป็นวัสดุสำหรับทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ แต่เนื่องจากสารแต่ละชนิดต่างมีคุณสมบัติและทำหน้าที่ต่างกัน การใช้สารชนิดหนึ่งทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ย่อมทำให้ได้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่คุณสมบัติจากสารที่ใช้เพียงอย่างเดียวเท่านั้น

ขาดคุณสมบัติจากสารองค์ประกอบของ ECM ขึ้นมาร่วม อีกทั้งการสกัดแยกสารองค์ประกอบของ ECM เพียงชนิดเดียวในรูปสารสกัดบริสุทธิ์ยังเป็นการเพิ่มต้นทุนของวัตถุดิบและอาจทำให้เกิดการเสื่อมสภาพสูญเสียคุณสมบัติทางชีวภาพจากกระบวนการที่ซับซ้อนในการสกัด การใช้สารหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบของ ECM ร่วมกันย่อมทำให้ได้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติที่ซับซ้อนมากขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ใช้สารที่เป็นองค์ประกอบของ ECM มากกว่า 1 ชนิดร่วมกันในการใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ โดยการเลือกใช้สารที่ต้องการบางชนิดในรูปสารบริสุทธิ์แล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม วิธีการนี้ถึงแม้ว่าจะทำให้ได้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติที่ดีเพิ่มขึ้นจากองค์ประกอบของ ECM แต่ละชนิดที่ใช้ แต่ก็ยังคงขาดคุณสมบัติบางประการจากสารใน ECM อีกหลายชนิดที่แยกทิ้งไป ดังนั้นการใช้ ECM ในรูปสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ที่ยังคงมีองค์ประกอบของ ECM อยู่ค่อนข้างครบถ้วนย่อมทำให้ได้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติจากองค์ประกอบของ ECM แต่ละชนิดอย่างครบถ้วนด้วยเช่นกัน

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจาก ECM โดยมีสารองค์ประกอบของ ECM ในเนื้อเยื่ออย่างครบถ้วนและสามารถนำมาใช้ได้อย่างประสบความสำเร็จ ก็คือ หนังแท้ปราศจากเซลล์ (Acellular dermis) ซึ่งทำจากผิวหนังชั้นหนังแท้ที่ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเซลล์เพื่อให้เหลือแต่เพียง ECM ที่เป็นองค์ประกอบในผิวหนังชั้นหนังแท้เท่านั้น หนังแท้ปราศจากเซลล์สามารถใช้เป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำหน้าที่เป็นวัสดุทดแทนผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีการผลิตทางการค้าในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการใช้บำบัดรักษาจริงแล้ว อย่างไรก็ตามเนื่องจากหนังแท้ปราศจากเซลล์มี ECM ที่เป็นองค์ประกอบของหนังแท้อย่างครบถ้วนและมีการจัดเรียงโครงสร้างของ ECM ในรูปแบบของหนังแท้ หนังแท้ปราศจากเซลล์จึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนังมากกว่าการใช้เป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับเนื้อเยื่ออื่น ด้วยเหตุนี้เองกระบวนการสกัด ECM จากหนังแท้แล้วนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ใหม่โดยกระบวนการที่ต่างกันเพื่อให้ได้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ตรงตามความต้องการจึงมีความเหมาะสมมากกว่าการนำหนังแท้ปราศจากเซลล์มาใช้เป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับเนื้อเยื่ออื่นโดยตรง

ความสำเร็จของวิศวกรรมเนื้อเยื่อจำเป็นต้องใช้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสม ECM ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการและทำหน้าที่เป็นโครงของเนื้อเยื่อในร่างกายโดยธรรมชาติอยู่แล้ว จึงสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพได้ สำหรับแหล่งของ ECM ที่มีศักยภาพสูงในการสกัดนำมาใช้ก็คือผิวหนังชั้นหนังแท้เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มี ECM เป็นองค์ประกอบปริมาณ

มากและเป็นอวัยวะที่มีปริมาณมากปกคลุมทั่วทั้งร่างกาย การสกัด ECM จากผิวหนังชั้นหนังแท้ แล้วนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ได้ เพื่อพัฒนาสารสกัดจากผิวหนังเป็นวัตถุดิบสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาองค์ประกอบของ Extracellular matrix ในสารสกัดจากผิวหนัง
2. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางชีวภาพ ของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ที่ใช้สารสกัดจากผิวหนังเป็นวัตถุดิบ

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เตรียมสารสกัดจากผิวหนังมาวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนและ Sulfated GAGs นำสารสกัดจากผิวหนังมาขึ้นรูปเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้ววิเคราะห์คุณสมบัติแต่ละด้าน ได้แก่ โครงสร้างรูพรุน ความต้านทานแรงกดและการย่อยสลายโดยเอนไซม์ จากนั้นจึงคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมาวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดด้านต่างๆ เพื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่ได้มาทดสอบกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนัง โดยการทดสอบเพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตและการเกิด Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิดและทฤษฎี

##### 2.1.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) คือ การสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่ขึ้นมา เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น ทดแทนเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เสียหาย เสริมอวัยวะที่บกพร่อง หรือเพื่อการศัลยกรรมความงาม การสร้างเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยวิศวกรรมเนื้อเยื่อจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบหลัก 3 อย่าง คือ เซลล์ โครงสร้างเนื้อเยื่อสังเคราะห์ (Scaffold) และ สารเหนี่ยวนำ (Soluble regulators) ซึ่งการสร้างเนื้อเยื่อทางวิศวกรรมเนื้อเยื่ออาจจำเป็นต้องใช้องค์ประกอบทั้ง 3 อย่างนี้หรืออาจใช้เพียงบางอย่างก็ได้ ทั้งนี้พิจารณาจากความจำเป็นในการสร้างเนื้อเยื่อแต่ละชนิดและการนำไปใช้งาน



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนโดยทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

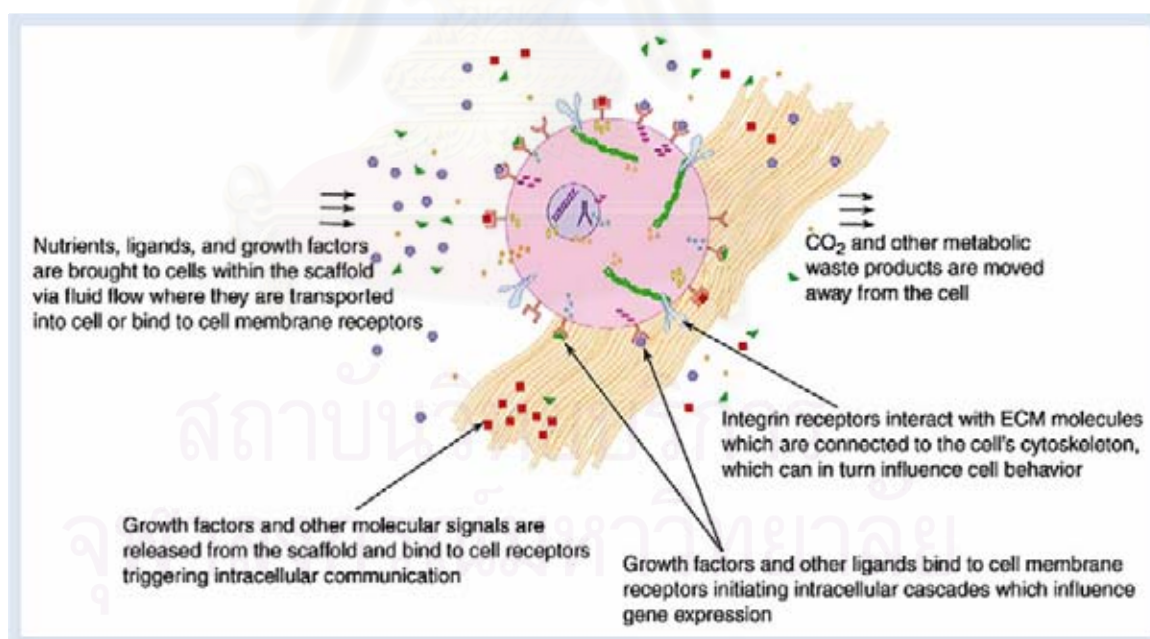
ที่มา

[http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108\\_2007\\_Groups/group12/](http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/)

TEModelLarge.jpg

ขั้นตอนโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับวิศวกรรมเนื้อเยื่อแสดงดังรูปที่ 2.1 โดยเริ่มจากขั้นตอนที่ 1 เป็นการคัดแยกเซลล์ที่ต้องการจากเนื้อเยื่อในร่างกาย แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน (ขั้นตอนที่ 2) เมื่อได้จำนวนเซลล์ที่มากเพียงพอแล้วจึงนำเซลล์ที่ได้เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยอาจเติมสารเหนียวบางชนิดลงไปด้วย (ขั้นตอนที่ 3) จากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ (ขั้นตอนที่ 4) สุดท้ายจึงนำเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่สร้างได้เข้าสู่ร่างกายเพื่อการบำบัดรักษา (ขั้นตอนที่ 5)

กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อสังเคราะห์ขึ้นในห้องปฏิบัติการโดยเทคนิคทางวิศวกรรมเนื้อเยื่ออาศัยการจำลองสภาวะของเนื้อเยื่อในธรรมชาติ เนื้อเยื่อในร่างกายประกอบด้วยเซลล์และ Extracellular matrix (ECM) ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ สัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์และ ECM ในแต่ละเนื้อเยื่อจะมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน ในเนื้อเยื่อกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) มี ECM เป็นองค์ประกอบปริมาณมากในขณะที่เนื้อเยื่อบุผิว (Epithelial tissue) ประกอบด้วยเซลล์เป็นหลัก และมี ECM เป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมาก ในแต่ละเนื้อเยื่อมีชนิดของเซลล์แตกต่างกันเพื่อทำหน้าที่แต่ละด้านของเนื้อเยื่อแต่ละอวัยวะ ในร่างกาย เซลล์ ECM สารต่างๆในร่างกาย รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพแต่ละด้าน มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด แสดงได้ดังรูปที่ 2.2



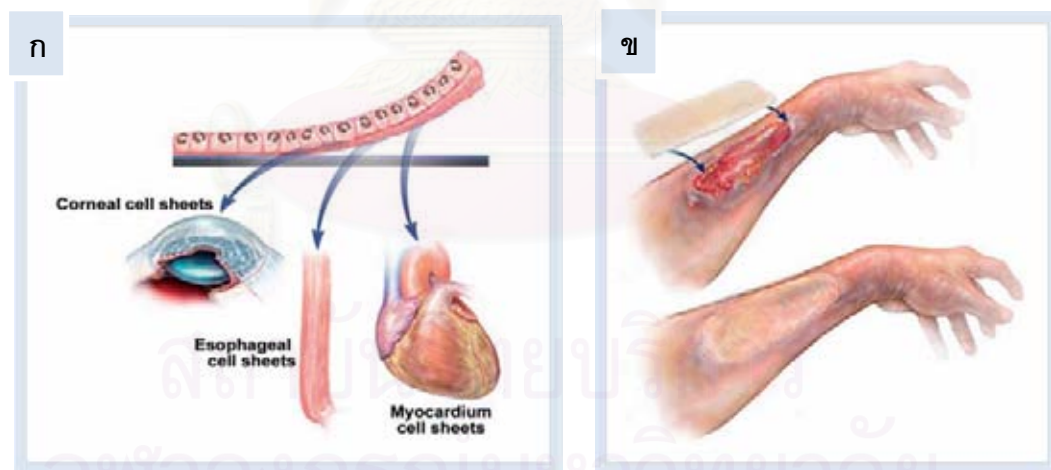
รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในร่างกาย  
ที่มา Nicholas D. Evans และคณะ, 2006

เซลล์มีตัวรับสัญญาณ (Receptor) ซึ่งสามารถจับกับโมเลกุลสัญญาณ (Signaling molecule) และ Ligand ของสารภายในร่างกายได้ ทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ในรูปแบบต่างๆ ECM ทำหน้าที่เป็นโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อในธรรมชาติ เป็นที่ให้เซลล์ยึดเกาะเพื่อเจริญเติบโตและมีบทบาทในการทำงานของอวัยวะ สามารถดูดซับโมเลกุลของสารได้หลายชนิด ทำให้เซลล์สามารถจับกับโมเลกุลของสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารต่างๆในเนื้อเยื่อมีการแลกเปลี่ยนหมุนเวียนตลอดเวลา มีการขนส่งสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ไปยังเซลล์ที่ต้องการและมีการกำจัดของเสียที่เซลล์ไม่ต้องการแล้วทิ้งออกไป

ในการสร้างเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องใช้เซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการได้ เซลล์ที่ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยทั่วไปมักเป็นเซลล์จากร่างกายของผู้ป่วยที่ต้องการบำบัดรักษาโดยวิศวกรรมเนื้อเยื่อเองเพื่อป้องกันปัญหาการต่อต้านเซลล์แปลกปลอม เซลล์ที่ใช้อาจเป็นเซลล์ระยะเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) เซลล์โปรเจเนเตอร์ (Progenitor cells) หรือ Differentiated cells สำหรับ Differentiated cells เป็นเซลล์ที่พัฒนาอย่างสมบูรณ์แล้วและมีหน้าที่จำเพาะ ในร่างกายประกอบด้วยเซลล์ Differentiated cells หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ชนิดของ Differentiated cells จะแตกต่างกันออกไปตามแต่ชนิดของเนื้อเยื่อ สำหรับเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อหลายด้าน เนื่องจากเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนตัวเองได้ สามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ชนิดต่างๆได้หลากหลาย และสามารถหลั่งสารมากระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้ดี รายละเอียดของเซลล์ต้นกำเนิดจะกล่าวถึงในหัวข้อที่ 2.1.6

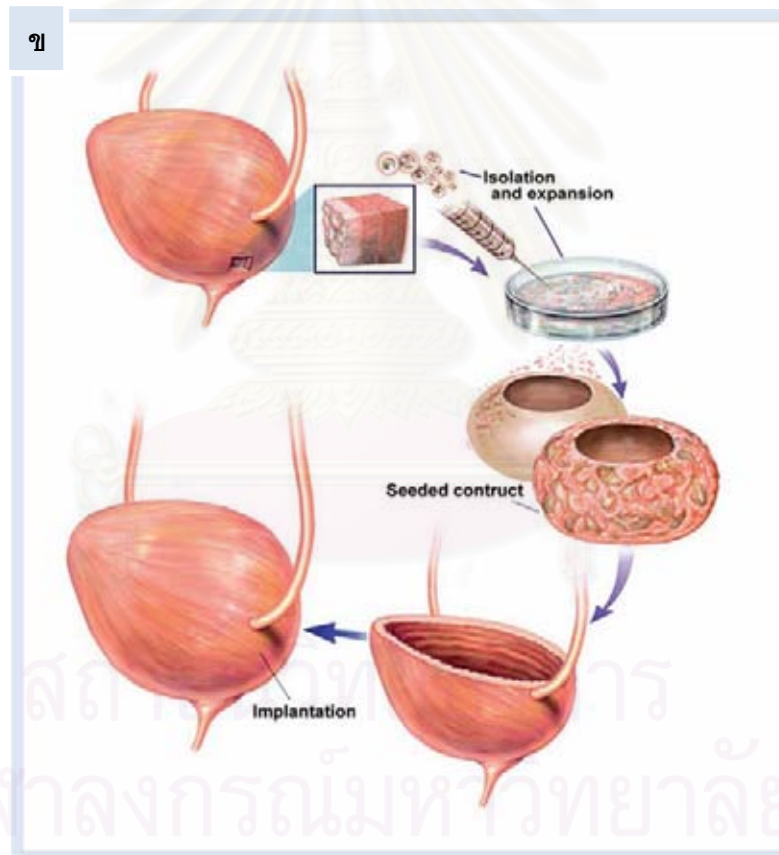
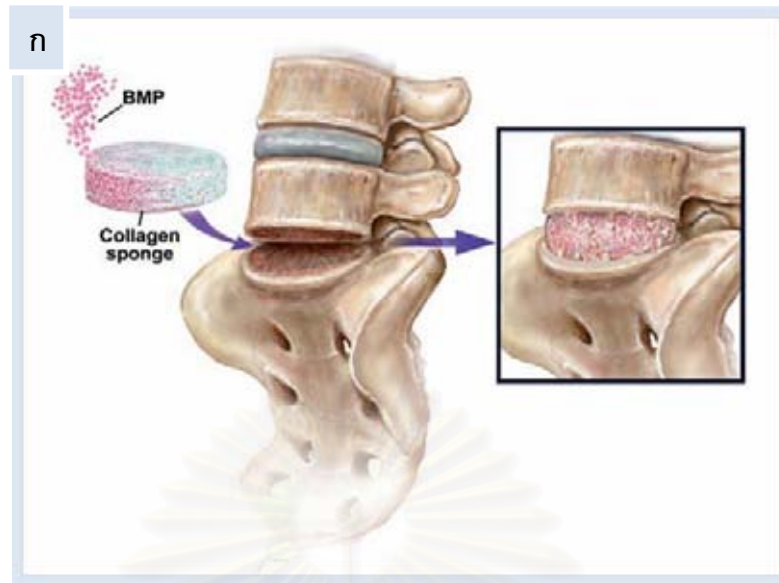
โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ เป็นโครงสร้าง 3 มิติที่มีรูพรุน ทำหน้าที่เป็นโครงร่างเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตแล้วเกิดเป็นโครงสร้างเนื้อเยื่อ 3 มิติได้ โดยในระหว่างที่เกิดกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จะเกิดการย่อยสลายไปด้วยในเวลาเดียวกันเพื่อเกิดเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเหมือนเนื้อเยื่อปกติในธรรมชาติ เนื่องจากโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์การนำไปใช้จำเป็นต้องนำเข้าสู่ร่างกายและเกิดการย่อยสลายเกิดขึ้นดังนั้นวัสดุที่ใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จึงต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) และเมื่อเกิดการย่อยสลายแล้วไม่เกิดสารที่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อร่างกาย วัสดุที่ใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จะมีผลต่อคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ได้ วัสดุหลายชนิดสามารถใช้เตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้ ไม่ว่าจะเป็นสารสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งได้แก่ พอลิเมอร์สังเคราะห์ต่างๆ วัสดุจากธรรมชาติ เช่น อัลจินेट (Alginate) จากสาหร่าย โปรตีนไฟโบรอิน (Fibroin) จากรังไหม หรือแม้แต่ ECM ซึ่งเป็นโครงเนื้อเยื่อในร่างกายโดยธรรมชาติอยู่แล้ว ในบรรดาวัสดุที่ใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ECM เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติที่โดดเด่นกว่าวัสดุชนิดอื่น ซึ่งจะกล่าวถึง ECM ในรายละเอียดต่อไปในหัวข้อที่ 2.1.2

ในการบำบัดรักษาโดยใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อ วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้อาจประกอบด้วยองค์ประกอบหลักครบทั้ง 3 อย่าง (เซลล์ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ และสารเหนียวนา) ก็ได้หรืออาจมีเพียงองค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่งเพียงอย่างเดียว ในเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์เป็นหลัก วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้ส่วนมากประกอบด้วยเซลล์เพียงอย่างเดียว แต่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งมี ECM เป็นองค์ประกอบหลัก ถ้าเนื้อเยื่อที่ต้องการการรักษาเนื้อเยื่อมีความสามารถในการซ่อมแซมตัวเองได้ดี โดยมีเซลล์ในร่างกายที่พร้อมจะเข้ามาซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้อยู่แล้ว วิศวกรรมเนื้อเยื่ออาจใช้เพียงโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ โดยเมื่อนำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เข้าสู่ร่างกายแล้วเซลล์ภายในร่างกายจะเจริญเติบโตเข้ามาภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เพื่อสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาเอง ไม่จำเป็นต้องนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อสร้างเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการก่อนก่อนนำไปใช้ (ตัวอย่างเช่น วิศวกรรมเนื้อเยื่อบุผิว (Epithelial tissue) และวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง แสดงดังรูปที่ 2.3) เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาที่ดียิ่งขึ้นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่นำไปใช้อาจประกอบด้วยองค์ประกอบมากกว่า 1 อย่าง โดยอาจเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยสารเหนียวนาหรือยาบางชนิดหรือเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยเซลล์ หรืออาจมีองค์ประกอบหลักครบทั้ง 3 อย่างก็ได้ (ตัวอย่างเช่น วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกประสาท แสดงดังรูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่มีองค์ประกอบเดียวในการใช้บำบัดรักษา  
 ก วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์เพียงอย่างเดียว  
 ข วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เพียงอย่างเดียว  
 ที่มา ดัดแปลงจาก Alan J. Russell และ Timothy Bertram (2007)





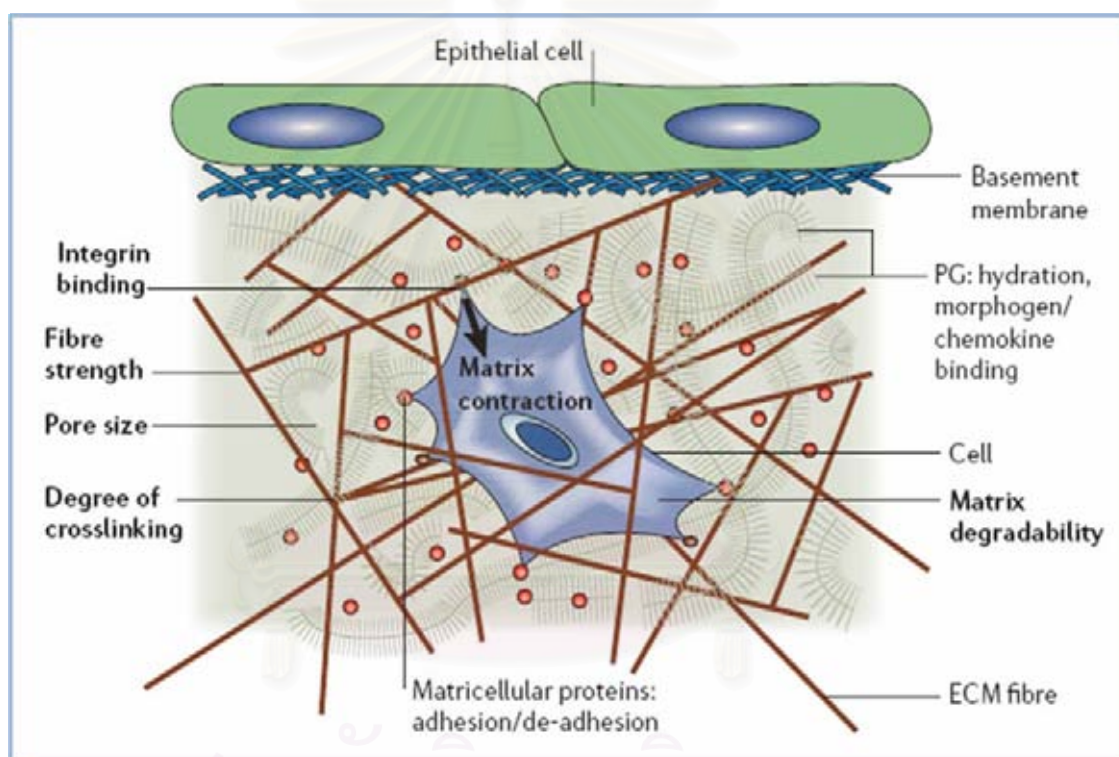
รูปที่ 2.4

วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่มีองค์ประกอบมากกว่า 1 อย่างในการใช้บำบัดรักษา  
 ก วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และสารเหนียวนำ  
 ข วิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และเซลล์  
 ที่มา

ดัดแปลงจาก Alan J. Russell และ Timothy Bertram (2007)

### 2.1.2 Extracellular matrix

Extracellular matrix (ECM) เป็นสารที่เซลล์สร้างขึ้นแล้วปล่อยออกมาจากเซลล์ เซลล์จะหลั่งองค์ประกอบของ ECM ออกมาจากเซลล์ หลังจากนั้นองค์ประกอบเหล่านี้จะถูกดัดแปลงโมเลกุลและจัดเรียงโครงสร้างโดยกระบวนการที่ซับซ้อนหลายขั้นตอนซึ่งขึ้นอยู่กับ ECM แต่ละชนิด ECM ที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาโดยเซลล์เพื่อให้เหมาะสมต่อสภาวะและกิจกรรมทางสรีรวิทยาของเซลล์ และในขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับ ECM ก็มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ด้วยเช่นกัน

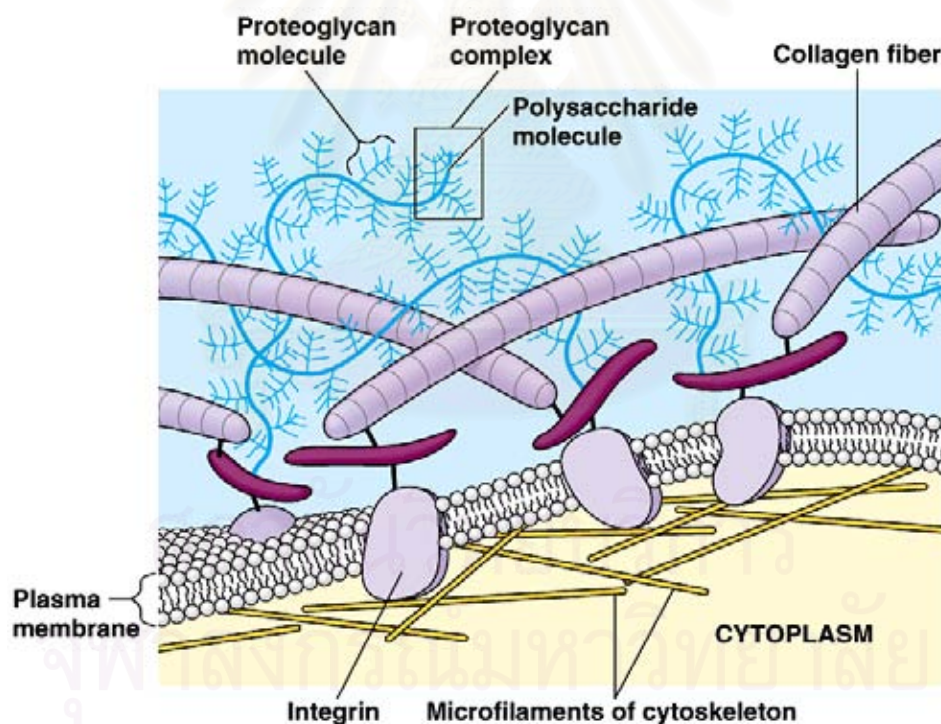


รูปที่ 2.5 ความสัมพันธ์ระหว่าง Extracellular matrix กับเซลล์ในเนื้อเยื่อของร่างกาย  
ที่มา Linda G. Griffith และ Melody A. Swartz (2006)

Extracellular matrix (ECM) มีความสำคัญต่อกลไกการทำงานของร่างกายในหลายด้าน คุณสมบัติทางกายภาพของ ECM มีผลต่อคุณสมบัติเชิงกลของเนื้อเยื่อโดยทำให้เกิดความยืดหยุ่นหรือความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อ เป็นที่ยึดเกาะและช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดในร่างกาย ในด้านคุณสมบัติทางชีวภาพ ECM มีบทบาทต่อการทำงานและการแสดงออกของเซลล์โดยทำหน้าที่เป็นสัญญาณ

(Signals) กระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ รวมทั้งช่วยส่งเสริมการทำงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในระบบการทำงานของร่างกายได้หลายชนิด (Stephen F. Badylak, 2004) นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันอันตรายแก่เซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจากแรงเชิงกลและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสิ่งแวดล้อม (Petreaca M. และ Manuela Martins-Green, 2007)

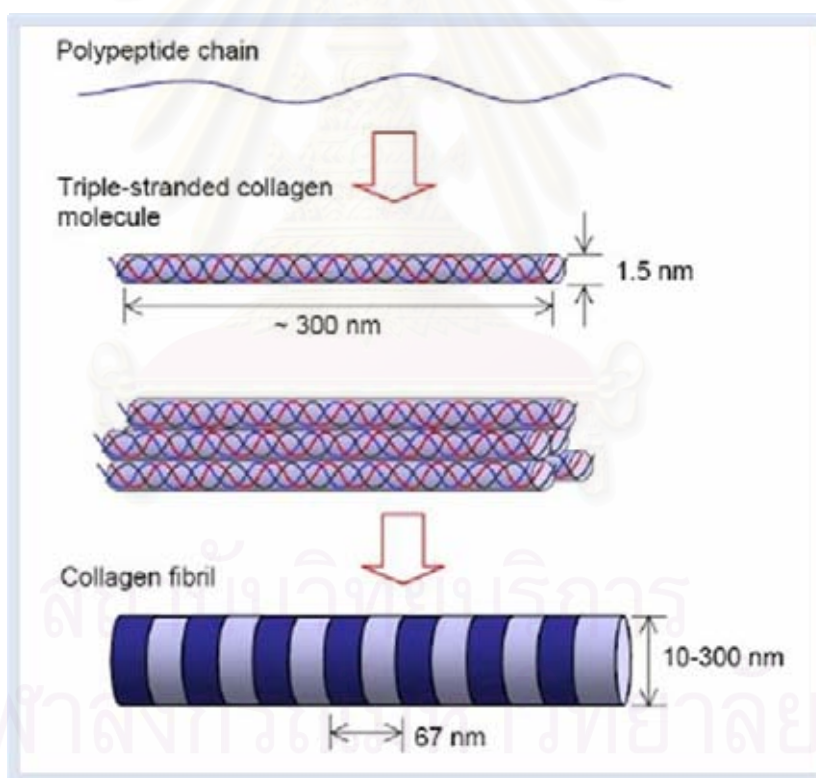
ในร่างกายมนุษย์ประกอบด้วย ECM หลายชนิด สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ ECM ที่เป็นเส้นใย (Fibrous ECM) ECM ออสัญฐาน (Amorphous ECM) และ ของเหลวนอกเซลล์ (Extracellular fluid) ในบรรดา ECM กลุ่มต่างๆเหล่านี้ ECM กลุ่มที่เป็นเส้นใยเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญต่อวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นเส้นใยเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นโครงของเนื้อเยื่อในร่างกายโดยธรรมชาติอยู่แล้ว ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นวัสดุดิบสำหรับเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้โดยตรงหรือสกัดเป็นสารละลายแล้วขึ้นรูปเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ใหม่ได้ สำหรับ ECM ที่มีความสำคัญต่อวิศวกรรมเนื้อเยื่อเนื่องจากการนำมาใช้เป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์หรืออย่างแพร่หลายก็คือ คอลลาเจน (Collagen)



รูปที่ 2.6  
ที่มา

ลักษณะของ Extracellular matrix แต่ละชนิดซึ่งเชื่อมต่อกับโครงสร้างของเซลล์  
<http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/Image122.gif>

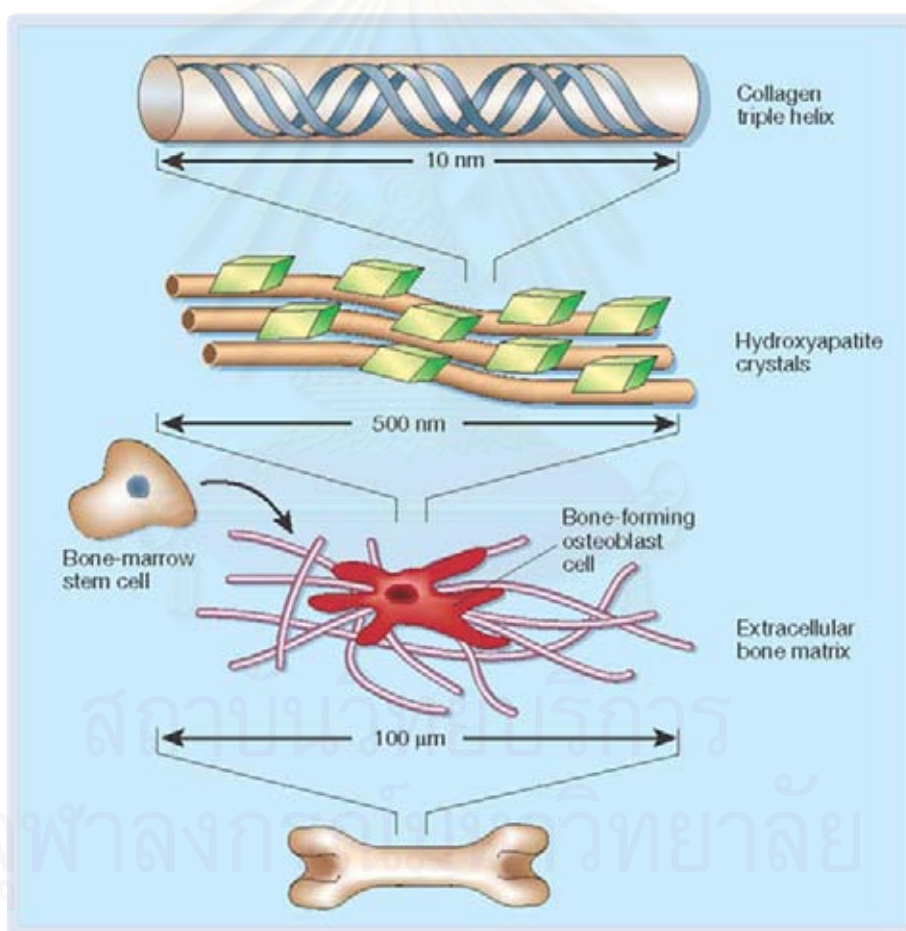
คอลลาเจน (Collagen) เป็น ECM กลุ่มโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดในร่างกาย ECM ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ทุกประเภทต่างมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก โครงสร้างโมเลกุลของคอลลาเจนเป็นพอลิเปปไทด์ (Polypeptide) 3 สายพันกันเป็นเกลียว เรียกว่า Triple helix แต่ละสายพอลิเปปไทด์ที่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 3 ชนิด ต่อซ้ำกันเป็นสายยาว ในลำดับกรดอะมิโน 3 ชนิดที่ต่อกันจะประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน (Glycine) เสมอ สามารถแสดงสูตรลำดับของกรดอะมิโนในสายคอลลาเจนได้ดังนี้คือ  $(\text{Gly-X-Y})_n$  โดยที่ Gly หมายถึงกรดอะมิโนไกลซีน ส่วนกรดอะมิโน X และ Y ในสูตร โดยมากมักเป็นกรดอะมิโนโพรลีน (Proline) และ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน (4-Hydroxyproline) หรืออาจเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นซึ่งขึ้นอยู่กับคอลลาเจนแต่ละชนิด เมื่อสายพอลิเปปไทด์ 3 สายพันกัน กรดอะมิโนไกลซีนในแต่ละสายจะอยู่ภายในของโครงสร้าง Triple helix เสมอ 4-ไฮดรอกซีโพรลีนในสายพอลิเปปไทด์ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ยึดแต่ละสายพอลิเปปไทด์ใน Triple helix (K. Gelse และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.7 การจัดเรียงตัวของคอลลาเจนตั้งแต่ระดับสายพอลิเปปไทด์จนเป็นมัดเส้นใยคอลลาเจน

ที่มา [http://www.azonano.com/images/Article\\_Images/ImageForArticle\\_2267\(2\).jpg](http://www.azonano.com/images/Article_Images/ImageForArticle_2267(2).jpg)

การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างระดับโมเลกุล ทำให้สามารถแบ่งชนิดของคอลลาเจนได้มากกว่า 20 ชนิด รูปแบบการรวมกลุ่มของเส้นใยในคอลลาเจนแต่ละชนิดทำให้เกิดคุณสมบัติที่เหมาะสมในการทำหน้าที่ที่ต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มคอลลาเจนตามหน้าที่ได้ 8 กลุ่ม ดังตารางที่ 2.1 คอลลาเจนกลุ่มที่รวมตัวเป็นเส้นใย (Fibril-forming collagens) เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด โดยพบมากถึงร้อยละ 90 ของคอลลาเจนทั้งหมดในร่างกาย ในแต่ละเนื้อเยื่อจะมีคอลลาเจนกลุ่มที่รวมตัวเป็นเส้นใยต่างชนิดกัน เช่น ในผิวหนังประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 เป็นองค์ประกอบหลัก ในกระดูกประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 5 เป็นองค์ประกอบหลัก และในกระดูกอ่อนชนิด Articular cartilage ประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ 11 เป็นองค์ประกอบหลัก เป็นต้น



รูปที่ 2.8 หน้าที่ของคอลลาเจนในการสะสมผลึกของ Hydroxyapatite ในเนื้อเยื่อกระดูก  
ที่มา Andrew T. Taton (2001)

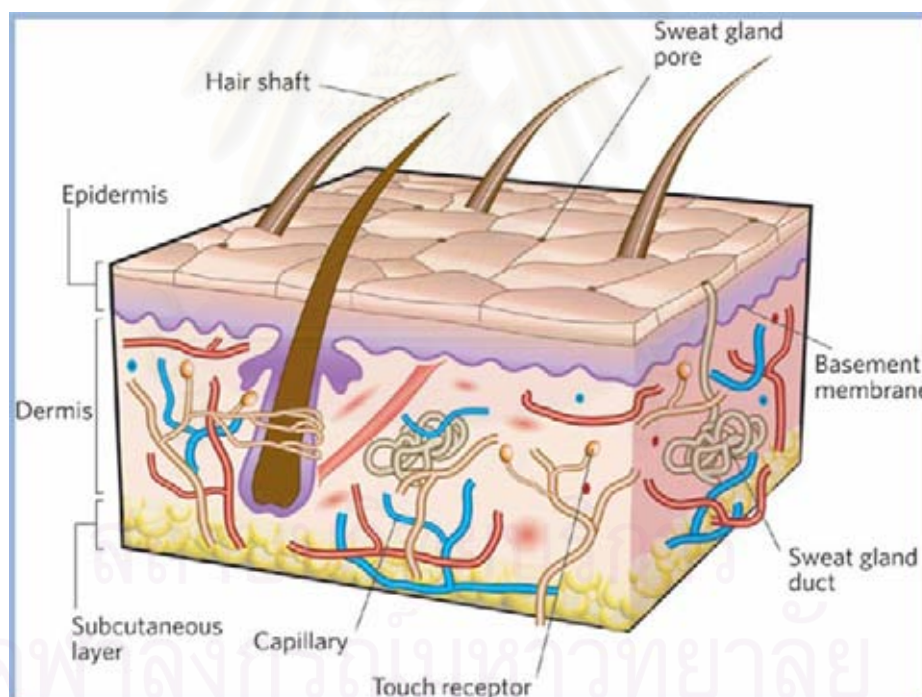
Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
<i>Fibril-forming collagens</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus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

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลคอลลาเจนชนิดต่างๆ แสดงกลุ่มของคอลลาเจนตามหน้าที่การทำงาน โครงสร้างโมเลกุล ยีนกำหนดการสร้าง และ แหล่งของเนื้อเยื่อที่พบ

ที่มา K. Gelse และคณะ, 2003

### 2.1.3 Extracellular matrix ในผิวหนัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ห่อหุ้มร่างกายทั้งหมดเอาไว้ ถือเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากที่สุดในร่างกาย ผิวหนังของมนุษย์ที่เจริญเต็มวัยมีเนื้อที่ประมาณ 3,000 ตารางนิ้ว ผิวหนังบริเวณส่วนต่างๆของร่างกายมีความหนาไม่เท่ากัน โดยมีความหนาประมาณ 1-4 มิลลิเมตร โครงสร้างของผิวหนังแบ่งได้เป็น 2 ชั้น คือ ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) และชั้นหนังแท้ (Dermis) โครงสร้างของผิวหนังแสดงดังรูปที่ 2.9 หนังกำพร้าประกอบไปด้วยเซลล์เรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เซลล์ที่อยู่ชั้นล่างลงไปเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวสร้างเซลล์เพิ่มขึ้นมาด้านบน ด้านบนสุดของหนังกำพร้าปกคลุมด้วยเซลล์ที่ตายซึ่งจะหลุดลอกกลายเป็นขี้ไคลหลุดออกไป หนังแท้เป็นส่วนของผิวหนังที่อยู่ชั้นล่างเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ประกอบด้วย ECM เป็นจำนวนมาก เนื่องจากผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีปริมาณมากที่สุดในร่างกายอีกทั้งยังประกอบด้วย ECM อยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นผิวหนังจึงสามารถใช้เป็นแหล่งของ ECM สำหรับเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 2.9  
ที่มา

โครงสร้างของผิวหนังมนุษย์

<http://www.nature.com/nature/journal/v445/n7130/images/nature05664-f1.2.jpg>

ในผิวหนังชั้นหนังแท้ประกอบด้วยโมเลกุลของสารหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบของ ECM สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ ECM ในหนังแท้ คือ Collagen ชนิดของ Collagen ที่มีมากที่สุดหนังแท้ คือ Type I collagen รองลงมา คือ Type III collagen ส่วน Proteoglycans ที่พบมากในหนังแท้ คือ Decorin และ Versican (David A. Carrino และคณะ, 2003) Glycosaminoglycans (GAGs) ส่วนมาก คือ Hyaluronic acid รองลงมาคือ Dermatan sulfate โดยมี Chondroitin sulfate และ Heparan sulfate เพียงเล็กน้อย (Shingo Tajima และคณะ, 1982) ในหนังแท้แต่ละบริเวณจะมีองค์ประกอบของ ECM ที่คล้ายคลึงกัน แต่จะมีความแตกต่างกันด้านปริมาณขององค์ประกอบบางชนิดในผิวหนังของเพศชายและเพศหญิง และมีการเปลี่ยนแปลงของ ECM ในแต่ละช่วงอายุของมนุษย์ ปริมาณองค์ประกอบของสารแต่ละชนิดในผิวหนังแสดงดังตารางที่ 2.2

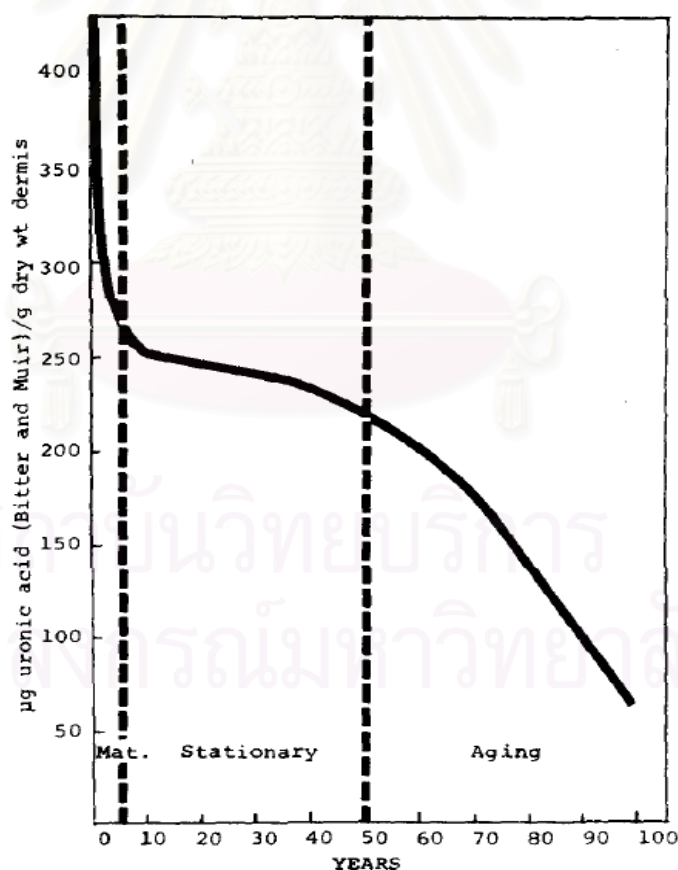
สารองค์ประกอบของ ECM ที่พบในผิวหนังชั้นหนังแท้	ปริมาณ (ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง)
Total protein	857.25
Collagen	598.50
Total GAGs	5.05
Hyaluronic acid	3.02
Dermatan sulfate	2.02
D-Glucose	1.82
D-Glucosamine	2.78
D-Galactose	3.45
D-Galactosamine	0.38
D-Mannose	1.92

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบของ ECM ในผิวหนังชั้นหนังแท้  
ที่มา ดัดแปลงจาก (Shingo Tajima และคณะ, 1982)

ในแต่ละระดับความลึกของผิวหนังชั้นหนังแท้ จะมี ECM ที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันเล็กน้อย หนังแท้ชั้นบนประกอบด้วยเส้นใย Collagen เส้นบางละเอียดกว่าหนังแท้ที่อยู่ชั้นล่างลงไป (Shingo Tajima และคณะ, 1982) สำหรับสัดส่วนของ Type I collagen และ



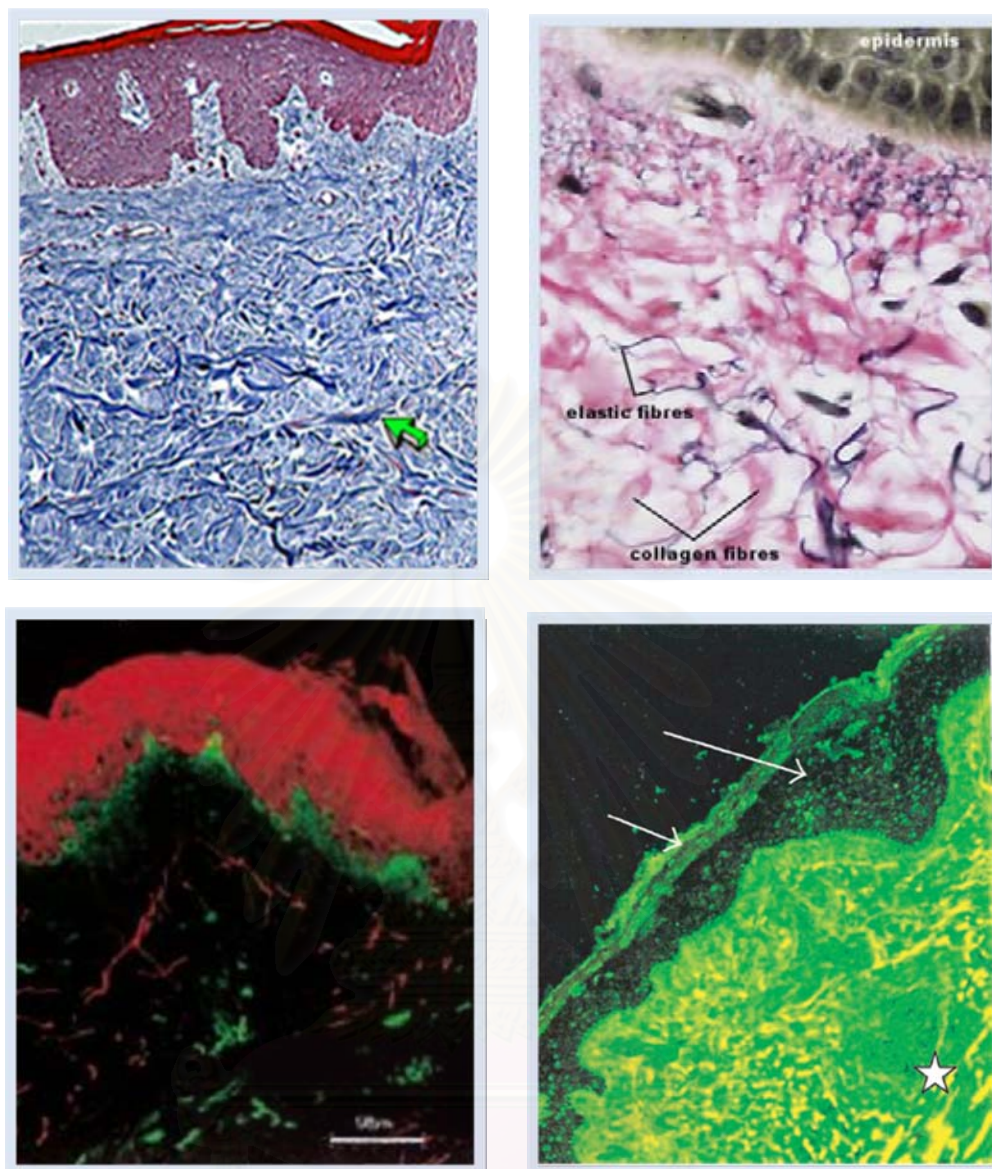
Type III collagen ในแต่ละระดับความลึกของหนังแท้ ได้ถูกศึกษาโดย Ervin H. Epstein และ Neil H. Munderloh (1978) จากตัวอย่างผิวหนังมนุษย์บริเวณหน้าท้องจำนวน 5 คน พบว่าในทุกๆระดับความลึกของหนังแท้มีสัดส่วนของ Type I collagen และ Type III collagen เท่ากัน โดยพบ Type I collagen ร้อยละ 81 ถึง 90 และพบ Type III collagen ร้อยละ 10 ถึง 19 แต่บริเวณหนังแท้ที่ติดกับหนังกำพร้าและบริเวณรอบ Skin appendages มีปริมาณ Type III collagen หนาแน่นกว่าบริเวณอื่น ผลการศึกษาของ Shingo Tajima และคณะ (1982) ก็ยืนยันเช่นกันว่าสัดส่วนของ Type I collagen และ Type III collagen ไม่แตกต่างกันในแต่ละระดับความลึกของหนังแท้ รวมทั้งไม่พบความแตกต่างของปริมาณ Noncollagenous glycoproteins ในแต่ละระดับความลึกของหนังแท้ด้วยเช่นกัน แต่องค์ประกอบของ ECM ที่แตกต่างกันในหนังแท้ชั้นบนกับหนังแท้ที่อยู่ชั้นล่างลงมา คือ ปริมาณ Glycosaminoglycans (GAGs) ซึ่งพบหนาแน่นในหนังแท้ชั้นบนมากกว่า และมีสัดส่วนปริมาณของ Hyaluronic acid ต่อปริมาณของ Dermatan sulfate มากกว่าด้วย



รูปที่ 2.10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Glycosaminoglycans (วิเคราะห์จากปริมาณ Uronic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก) ในแต่ละช่วงอายุของมนุษย์  
ที่มา Raul Fleischmajer และคณะ (1972)

Raul Fleischmajer และคณะ (1972) พบว่า ในมนุษย์ รวมทั้งสัตว์อีกหลายชนิด เช่น สุนัข โค และ ไก่ ต่างมี Glycosaminoglycans (GAGs) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของหนังแท้ เป็น Hyaluronic acid และ Dermatan sulfate สำหรับ Chondroitin-4-sulfate และ Chondroitin-6-sulfate พบในหนังแท้เพียงปริมาณเล็กน้อย ในทารกแรกเกิดชั้นหนังแท้จะมี GAGs เป็นปริมาณมากซึ่งจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวัยเด็ก เมื่อเจริญวัยขึ้นปริมาณ GAGs ในหนังแท้จะมีปริมาณค่อนข้างคงที่จนถึงวัยกลางคน และหลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่วัยชราปริมาณ GAGs จึงลดลงตามอายุที่มากขึ้น การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Glycosaminoglycans (วิเคราะห์จากปริมาณ Uronic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก) ในแต่ละช่วงอายุของมนุษย์ แสดงดังรูปที่ 2.10

สำหรับปริมาณของ Mucopolysaccharide ในผิวหนัง จากการศึกษารายงานของ John Fabianek และคณะ (1965) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณ Mucopolysaccharide ในผิวหนังของมนุษย์ กระต่าย แมว หนู และ หนูตะเภา ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ Uronic acid โดยวิธี Carbazole method พบว่าในผิวหนังของสัตว์ที่ศึกษาทุกชนิดมีปริมาณ Uronic acid อยู่ในช่วง 800 – 1,100 ไมโครกรัม/กรัม ผิวหนังแห้ง และมี Hyaluronic acid ร้อยละ 55 – 65 ของปริมาณ Uronic acid ในผิวหนัง ในสัตว์แต่ละชนิด Uronic acid ทั้งหมดที่พบในผิวหนังมีปริมาณของ Heparin แตกต่างกัน ในผิวหนังหนูมี Heparin ร้อยละ 15 ผิวหนังแมวมีร้อยละ 10 สำหรับในผิวหนังของมนุษย์และกระต่ายพบในปริมาณที่น้อยมาก ในขณะที่ในผิวหนังของหนูตะเภา วิเคราะห์ไม่พบ Heparin ในผิวหนัง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ John Fabianek และคณะ (1965) ที่พบว่าในผิวหนังของมนุษย์มีปริมาณ Uronic acid เท่ากับ  $828 \pm 229$  ไมโครกรัม/กรัม ผิวหนังแห้ง ซึ่งในจำนวนนี้เป็น Hyaluronic acid ร้อยละ 55 Chondroitin ร้อยละ 41 และ Heparin ร้อยละ 3.9



รูปที่ 2.11 ECM ที่พบในผิวหนังแสดงให้เห็นจากการย้อมทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology)

ก คอลลาเจน ตัดสีน้ำเงินจากการย้อมโดยด้วย Masson's Trichrome

ที่มา <http://msjensen.cehd.umn.edu/1135/Worksheets/Histology/CollagenBlueSkin.JPG>

ข Elastic fiber ตัดสีน้ำตาลเข้มจากการย้อมด้วย van Gieson & Elastin stain

ที่มา <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/>

ค Lumican ตัดสีเขียวเรืองแสงจากการย้อมด้วย Immunofluorescent stain

ที่มา Gilles Pauly และคณะ (2008)

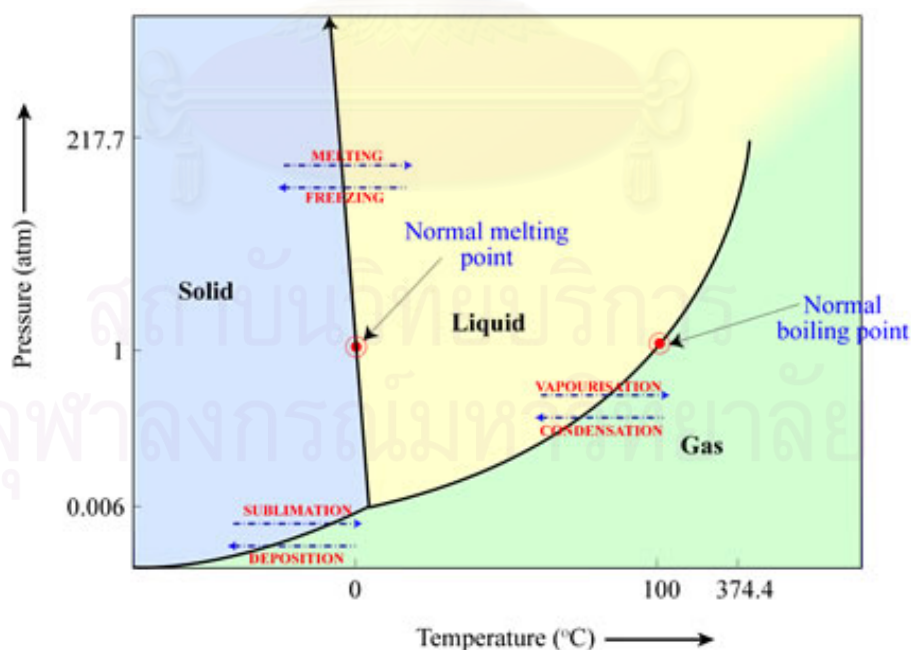
ง Decorin ตัดสีเขียวเรืองแสงจากการย้อมด้วย Immunofluorescent stain

ที่มา Denys N. Wheatley และคณะ (2004)

### 2.1.4 กระบวนการเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สามารถเตรียมจากวัตถุดิบได้หลากหลายชนิด มีสถานะและคุณสมบัติทางกายภาพต่างกัน แต่โดยทั่วไปวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มักอยู่ในรูปของสารละลาย ซึ่งเป็นรูปที่ง่ายต่อการเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีรูปร่างได้หลากหลายตามความต้องการ สำหรับกระบวนการเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.3 วัตถุดิบแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อกระบวนการขึ้นรูปที่ต่างกันซึ่งจำเป็นต้องเลือกใช้ตามความเหมาะสมสำหรับวัตถุดิบซึ่งเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติ โดยเฉพาะพวก ECM วิธีการขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่นิยมใช้ที่สุดคือการขึ้นรูปโดยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งเนื่องจากเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายและไม่ใช้สภาวะที่รุนแรง ทำให้สามารถรักษาคุณสมบัติของ ECM ไว้ได้มาก

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization หรือ Freeze-drying) เป็นกระบวนการทำให้แห้งโดยการระเหิดตัวทำละลายออกจากตัวอย่างในขณะที่ตัวอย่างอยู่ในสภาพเยือกแข็ง ในกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งสารละลายตัวอย่างต้องนำไปแช่แข็งจนแข็งตัวก่อนแล้วจึงทำการระเหิดตัวทำละลายออกไปโดยใช้สภาวะความดันสุญญากาศ โดยใช้หลักการการเปลี่ยนสถานะของสารจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความดันซึ่งมีสัมพันธ์กันดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12  
ที่มา

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความดันต่อการเปลี่ยนสถานะของน้ำ  
<http://astronomy.swin.edu.au/cosmos/S/Sublimation>

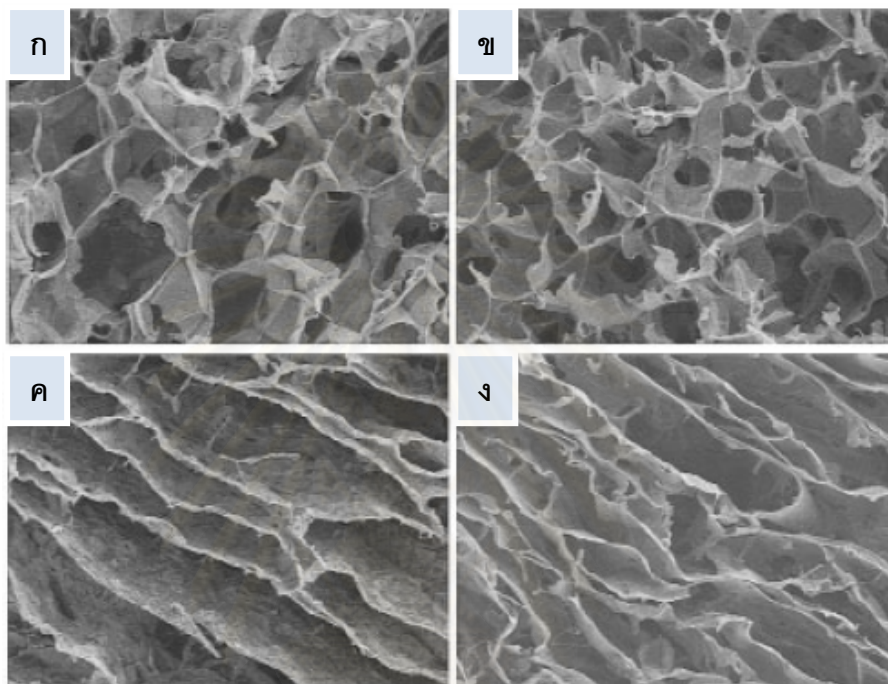
<i>Processing</i>	<i>Advantage</i>	<i>Disadvantages</i>
Fiber felts	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Easy process</li> <li>• High porosity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lack structural stability</li> </ul>
Fiber bonding	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High porosity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limit application to other polymers</li> <li>• Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues</li> </ul>
Phase separation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nondecreased activity of the molecule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvent residue may be harmful</li> <li>• Difficult to control precisely scaffold morphology</li> </ul>
Solvent casting and particulate leaching	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controlled porosity, up to 93%.</li> <li>• Independent control of porosity and pore size</li> <li>• Crystallinity can be tailored</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvent residue may be harmful</li> <li>• Limit to membranes up to 3-mm thick</li> <li>• Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues</li> </ul>
Membrane lamination	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3D matrix</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvent residue may be harmful</li> <li>• Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues</li> </ul>
Melt molding	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Independent control of porosity and pore size</li> <li>• Macro shape control</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvent residue may be harmful</li> <li>• High temperature required for nonamorphous polymer</li> </ul>
Polymer/ceramic fiber composite foam	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Superior compressive strength</li> <li>• Independent control of porosity and pore size</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvent residue may be harmful</li> </ul>
High-pressure processing	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No organic solvents</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mostly a nonporous surface</li> <li>• Closed-pores structure inside the polymer matrix</li> </ul>
Hydrocarbon templating	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No thickness limitation</li> <li>• Enhanced control over pore structure, porosity, etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvent residue may be harmful</li> </ul>

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของแต่ละกระบวนการที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

ที่มา Shoufeng Yang และคณะ (2001)

ทุกขั้นตอนของกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีผลต่อลักษณะของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ได้ตั้งแต่คุณสมบัติที่ใช้ในการแช่แข็งรวมถึงอัตราการลดอุณหภูมิมีผลต่อลักษณะและขนาดผลึกของตัวทำละลายซึ่งจะส่งผลอย่างมากต่อลักษณะของรูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ได้ จากการศึกษาโดย Dai-Chian Chen และคณะ (2006) พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนที่เตรียมโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีรูพรุน

ลักษณะ Polygonal ขนาดประมาณ  $148 \pm 33$  ไมโครเมตร และถ้าแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-80$  องศาเซลเซียสก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง รูปพรุนที่ได้จะมีลักษณะเรียวยาวและมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีขนาดประมาณ  $238 \pm 135$  ไมโครเมตร และมีขนาดรูพรุนไม่สม่ำเสมอมากกว่า (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 ลักษณะรูพรุนของโครงเนื้อเยื่อดังเคราะห์จากคอลลาเจนที่เตรียมโดยกระบวนการที่ต่างกัน

ก และ ข แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส ก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง และไม่เชื่อมขวางโมเลกุล

ข แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส ก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง และ เชื่อมขวางโมเลกุลโดยใช้ Glutaraldehyde

ค แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-80$  องศาเซลเซียส ก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง และไม่เชื่อมขวางโมเลกุล

ง แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-80$  องศาเซลเซียส ก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง และ ไม่เชื่อมขวางโมเลกุลโดยใช้ Glutaraldehyde

ที่มา

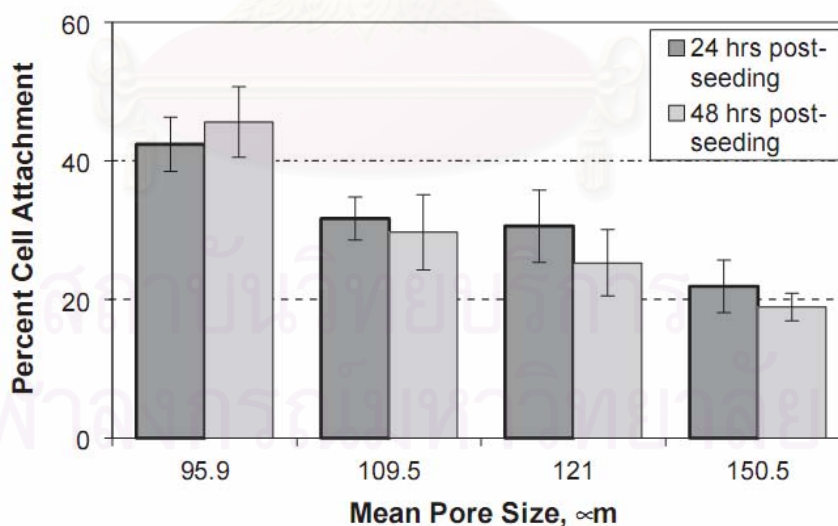
Dai-Chian Chen และคณะ (2006)

### 2.1.5 คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ต่อการตอบสนองของเซลล์

#### โครงสร้างรูพรุน (Pore structure)

ขนาดของรูพรุน (Pore size) ถูกกำหนดจากหลายปัจจัย โดยขนาดของเซลล์เป็นปัจจัยกำหนดขนาดเล็กที่สุดของรูพรุนเพื่อให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้ ขนาดรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดมีการศึกษาจากหลายแหล่ง ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้ สำหรับการเกิดหลอดเลือดใหม่ (Neovascularization) ขนาดรูพรุน 5 ไมโครเมตร, เซลล์ Fibroblast ขนาดรูพรุน 5-15 ไมโครเมตร, เซลล์ Hepatocyte ขนาดรูพรุน 20 ไมโครเมตร, สำหรับการสร้างใหม่ (Regeneration) ของผิวหนัง ขนาดรูพรุน 20-125 ไมโครเมตร, การเกิด Osteoid ขนาดรูพรุน 40-100 ไมโครเมตร และ การเจริญของเนื้อเยื่อ Fibrovascular tissue ขนาดรูพรุนควรใหญ่กว่า 500 ไมโครเมตร เป็นต้น (Shoufeng Yang และคณะ, 2001)

O'Brien F. J. และคณะ (2005) พบว่าขนาดของรูพรุนในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนและ Chondroitin-6-sulfate มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ MC3T3 Osteogenic cells โดยเมื่อขนาดของรูพรุนมีขนาดใหญ่ขึ้นการยึดเกาะของเซลล์จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์หลังนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อแล้วเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง พบว่าในโครงเนื้อเยื่อที่มีขนาดรูพรุนเท่ากันจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่ 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 2.14)



รูปที่ 2.14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของรูพรุนและการยึดเกาะของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนและ Chondroitin-6-sulfate

ที่มา O'Brien F. J. และคณะ (2005)

จากการศึกษาของ Kuboki Y. และคณะ (2001) พบว่าขนาดของรูมีผลต่อรูปแบบกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อได้ด้วย โดยเมื่อใช้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จาก Hydroxyapatite ที่มีโครงสร้างแบบรังผึ้ง (Honeycomb-shaped scaffold) ฝังเข้าไปในกระดูก ในกรณีที่มีขนาดของรูมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก (90-120 ไมโครเมตร) จะเกิดการสร้างกระดูกอ่อนก่อนแล้วจึงเกิดการสร้างกระดูก ส่วนในกรณีที่มีขนาดของรูมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ (ประมาณ 350 ไมโครเมตร) จะเกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกโดยตรงโดยไม่เกิดการสร้างกระดูกอ่อนก่อน

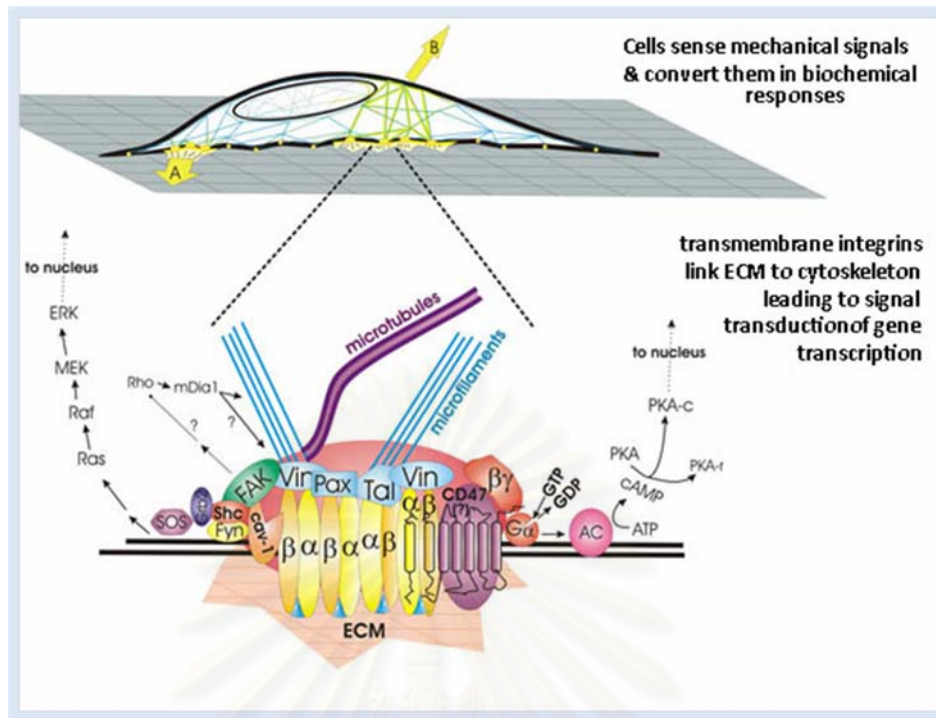
ปริมาณรูพรุน (Porosity) จำนวนมากเพิ่มพื้นที่ผิวในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ สำหรับอวัยวะที่มีกิจกรรมทางเมตาบอลิซึม (Metabolic activity) สูง เช่น ตับ และ ตับอ่อน โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จำเป็นต้องมีปริมาณรูพรุนจำนวนมากเพื่อให้เกิดการถ่ายเทมวลของสารได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้รูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ควรมีความเชื่อมโยงของรูพรุน (Pore interconnection) เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตเข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้อย่างทั่วถึงและเกิดการถ่ายเทมวลสารเข้าออกได้สะดวก (Shoufeng Yang และคณะ, 2001)

#### คุณสมบัติทางกล (Mechanical property)

คุณสมบัติทางกลที่สำคัญของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์คือ ความแข็งแรง โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ต้องมีความแข็งแรงอย่างน้อยพอที่จะคงรูปอยู่ได้จนถึงขั้นตอนการนำเข้าสู่ร่างกาย ในเนื้อเยื่อที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรับแรงปริมาณมาก เช่น กระดูก และ กระดูกอ่อน โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์อาจมีความแข็งแรงที่สูงพอที่จะรับแรงเหล่านี้ได้หรือถ้าไม่สามารถต้านทานต่อแรงที่สูงมากได้ก็จำเป็นต้องอาศัยวัสดุหรืออุปกรณ์อื่นในการรับแรงแทน

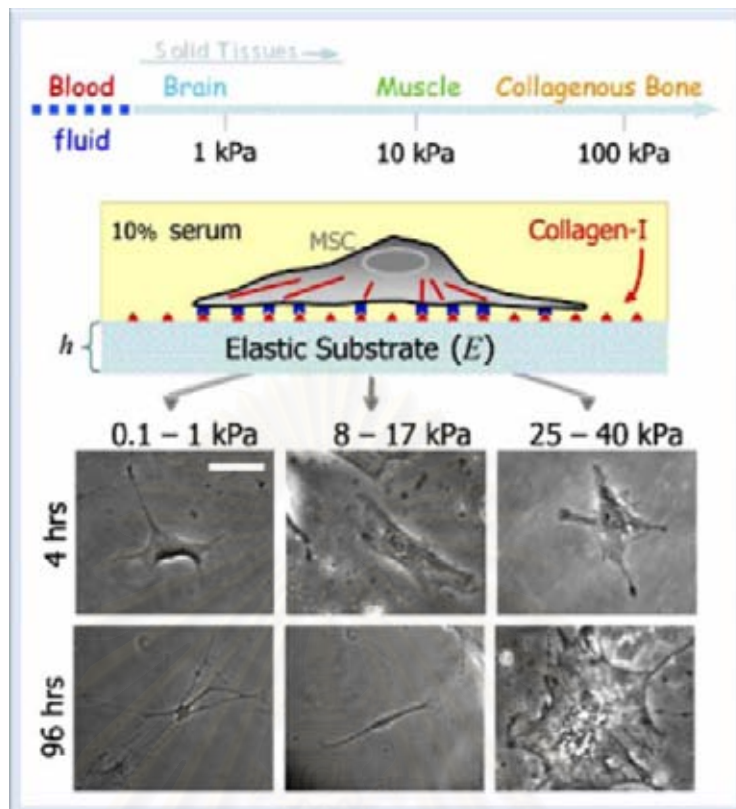
นอกจากคุณสมบัติทางกลของโครงเนื้อเยื่อจะมีความสำคัญต่อการรับต่างๆที่มากระทำแล้ว คุณสมบัติทางกลของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ยังมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ด้วย เนื่องจากเซลล์มีกลไกในการรับรู้ต่อแรงที่กระทำต่อเซลล์รวมทั้งคุณสมบัติทางกลของวัสดุที่เซลล์สัมผัสได้และจะมีการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์เพื่อกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ต่อไป ซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้ เรียกว่า Mechanotransduction ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อตัวรับสัญญาณที่เชื่อมกับเซลล์ได้รับแรงแล้วจะเกิดการส่งผ่านแรงผ่านทาง Cytoskeleton เข้าสู่ภายในเซลล์ หลังจากนั้นจึงเกิดการกระตุ้นการทำงานของโมเลกุลส่งสัญญาณต่อเนื่องเป็นลำดับในรูปแบบของ Signal transduction ภาพแสดงตัวอย่างของ Mechanotransduction ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2.15 (Wayne A. Orr และคณะ, 2006)





รูปที่ 2.15 กระบวนการ Mechanotransduction ในการตอบสนองต่อคุณสมบัติทางกลของวัสดุที่เซลล์สัมผัส  
ที่มา <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/255/255chem/255chemistry.htm>

Adam J. Engler และคณะ (2006) แสดงให้เห็นว่าความแข็งของวัสดุที่เซลล์เจริญเติบโตมีผลต่อรูปร่างและการเกิด Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดได้โดยไม่ต้องอาศัยสารในการเหนี่ยวนำ โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนภาชนะเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วยคอลลาเจน ซึ่งมีค่า Elasticity ประมาณ 0.1 – 1 กิโลปาสคัล ใกล้เคียงกับสมอง พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีการสร้างแขนงของเซลล์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับลักษณะของเซลล์ Neuron เมื่อเพิ่มค่า Elasticity เป็น 8 – 17 กิโลปาสคัล ใกล้เคียงกับกล้ามเนื้อลาย (Striated muscle) จะทำให้เซลล์มีรูปร่างคล้ายกระสวย (Spindle shape) ใกล้เคียงกับลักษณะของเซลล์ Myoblast และเมื่อค่า Elasticity เพิ่มขึ้นเป็น 25 – 40 กิโลปาสคัล ใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่เกิดการเชื่อมขวางโมเลกุล (Crosslinked collagen) ของ Osteoid จะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดมีรูปร่างแบบ Polygonal shape คล้ายลักษณะของเซลล์ Osteoblast จากการตรวจสอบพบว่าเซลล์เกิด Specification เพื่อเป็นเซลล์แต่ละชนิดตามลำดับ แต่ภายในสัปดาห์แรกเซลล์ยังสามารถเกิด Reprogramming ได้ แต่หลังจากนั้นแล้วเซลล์จะเกิด Differentiation และไม่สามารถเกิด Reprogramming ได้



รูปที่ 2.16 Elasticity ที่เหมาะสมต่อเซลล์ต้นกำเนิดในการเปลี่ยนรูปร่างและเกิด Specification เพื่อเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ

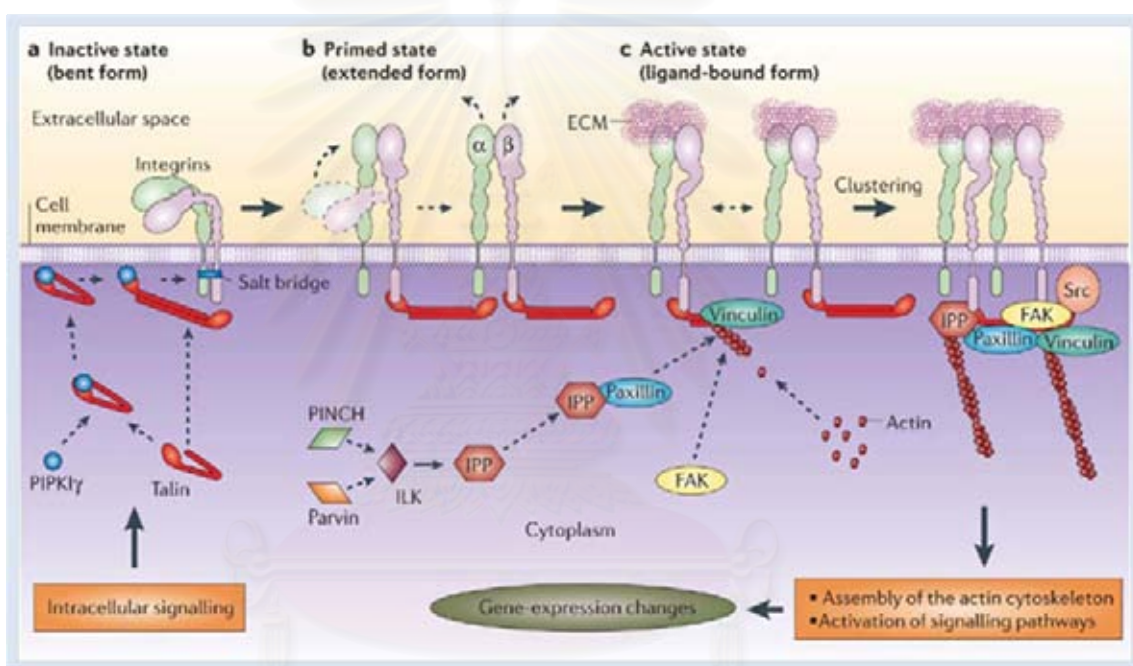
ที่มา Adam J. Engler และคณะ, 2006

#### การตอบสนองทางชีวภาพ

ECM สามารถเกิดอันตรกิริยากับ Receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างจำเพาะ ทำให้เกิดการส่งสัญญาณ (Signal transduction) ไปยังโมเลกุลต่างๆในไซโทพลาสซึม เกิดการส่งสัญญาณผ่านทาง Cytoskeleton ไปยังนิวเคลียส ซึ่งทำให้เกิดการแสดงออกของยีนแล้วทำให้เกิดการแสดงออกของยีนซึ่งจะมีผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ตามแต่ชนิดของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น เช่น กระตุ้นการยึดเกาะ การเคลื่อนที่ การเจริญเติบโต การเกิด Differentiation รวมถึงทำให้เกิด Apoptosis (Petreaca M. และ Manuela Martins-Green, 2007) กลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อ ECM เป็นแบบจำเพาะเจาะจงในลักษณะของ Signaling pathways โดยโมเลกุลของ ECM ทำหน้าที่เป็น Ligand ที่สามารถจับกับ Receptor ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างจำเพาะ Receptor ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Focal adhesion kinase (FAK), Extracellular-signal-regulated kinases (ERKs) และ Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) บางชนิด เป็นต้น การตอบสนองของ

เซลล์ต่อสัญญาณที่มากกระตุ้นทำให้เกิดการตอบสนองได้หลายระดับตั้งแต่ระดับเซลล์จนถึงการแสดงออกในระดับยีน (Nancy J. Boudreau and Peter Lloyd Jones, 1999)

Receptors ที่เชื่อมเซลล์ที่สำคัญที่ทำให้เกิดการตอบสนองต่อ ECM ได้ เช่น Integrins และ Transmembrane proteoglycans การจับกันระหว่าง Integrins และ ECM มีหลายระดับตั้งแต่ระดับที่มีความจำเพาะเจาะจงอย่างมากไปจนถึงการจับกันอย่างไม่จำเพาะเจาะจง Syndecan ซึ่งเป็น Transmembrane proteoglycans สามารถจับกับ ECM ที่โมเลกุลของ Chondroitin sulfate และ Heparan sulfate แล้วกระตุ้นการทำงานของ Rho GTPases (Petreaca M. และ Manuela Martins-Green, 2007)



รูปที่ 2.17 การรับสัญญาณ ECM ของเซลล์ผ่านทาง Integrins ที่เชื่อมหุ้มเซลล์  
ที่มา Kyle R. Legate และคณะ (2006)

ECM มีความสำคัญต่อกระบวนการ differentiation ของเซลล์ในการเกิดเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการพัฒนาเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตในระยะเอมบริโอจนกระทั่งเมื่อร่างกายเจริญเติบโตเต็มที่ ECM ก็มีบทบาทต่อกระบวนการทำงานต่างๆ ของเซลล์ เมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บ ECM ที่สร้างขึ้นในบริเวณเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บนั้นก็มีส่วนช่วยส่งเสริมกระบวนการซ่อมแซมของร่างกาย เช่น ส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่จำเป็นในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และกระตุ้น differentiation ของเซลล์เพื่อให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อกลับคืนดั้งเดิม

ในกระบวนการซ่อมแซมกระดูกที่ได้รับความเสียหาย Osteoblastic cells ที่เคลื่อนที่เข้ามาจะเพิ่มจำนวนตัวเองพร้อมทั้งสร้าง type I Collagen หลังจากที่ถูกสร้างขึ้นแล้วจะเกิดการกระตุ้นให้เซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามาเกิด Osteogenic differentiation เพื่อสร้างเนื้อเยื่อกระดูกที่เสียหาย ความสำคัญของ Collagen ในกระบวนการ Osteogenic differentiation สามารถยืนยันได้จากงานวิจัยของ Yasuhiro Takeuchi และคณะ (1996) ซึ่งพบว่ากระบวนการ Osteogenic differentiation ของเซลล์ Osteoblastic MC3T3-E1 สามารถถูกยับยั้งได้ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารยับยั้งการสังเคราะห์ Collagen

Selected cell-binding domain sequences of extracellular matrix proteins		
Protein	Sequence <sup>a</sup>	Role
Fibronectin	RGDS	Adhesion of most cells, via $\alpha_5\beta_1$
	LDV	Adhesion
	REDV	Adhesion
Vitronectin	RGDV	Adhesion of most cells, via $\alpha_v\beta_3$
Laminin A	LRGDN	Adhesion
	SIKVAV	Neurite extension
Laminin B1	YIGSR	Adhesion of many cells, via 67-kDa laminin receptor
	PDSGR	Adhesion
Laminin B2	RNIAEIIKDI	Neurite extension
Collagen I	RGDT	Adhesion of most cells
	DGEA	Adhesion of platelets, other cells
Thrombospondin	RGD	Adhesion of most cells
	VTXG	Adhesion of platelets

รูปที่ 2.18 ลำดับกรดอะมิโนของ ECM ที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ในรูปแบบต่างๆ  
ที่มา Jeffrey A. Hubbell (2007)

ECM มีบริเวณจำเพาะในโมเลกุลที่ทำหน้าที่ทางชีวภาพได้ เช่น ใน Laminin และ Tenascin-C มีบริเวณ EGF-like repeats ที่สามารถจับและกระตุ้นการทำงานของ EGF receptor (EGFR) ได้ ในขณะที่ Decorin มีบริเวณ Leucine-rich repeats ที่ทำหน้าที่จับและกระตุ้น EGFR (Petreaca M. และ Manuela Martins-Green, 2007)

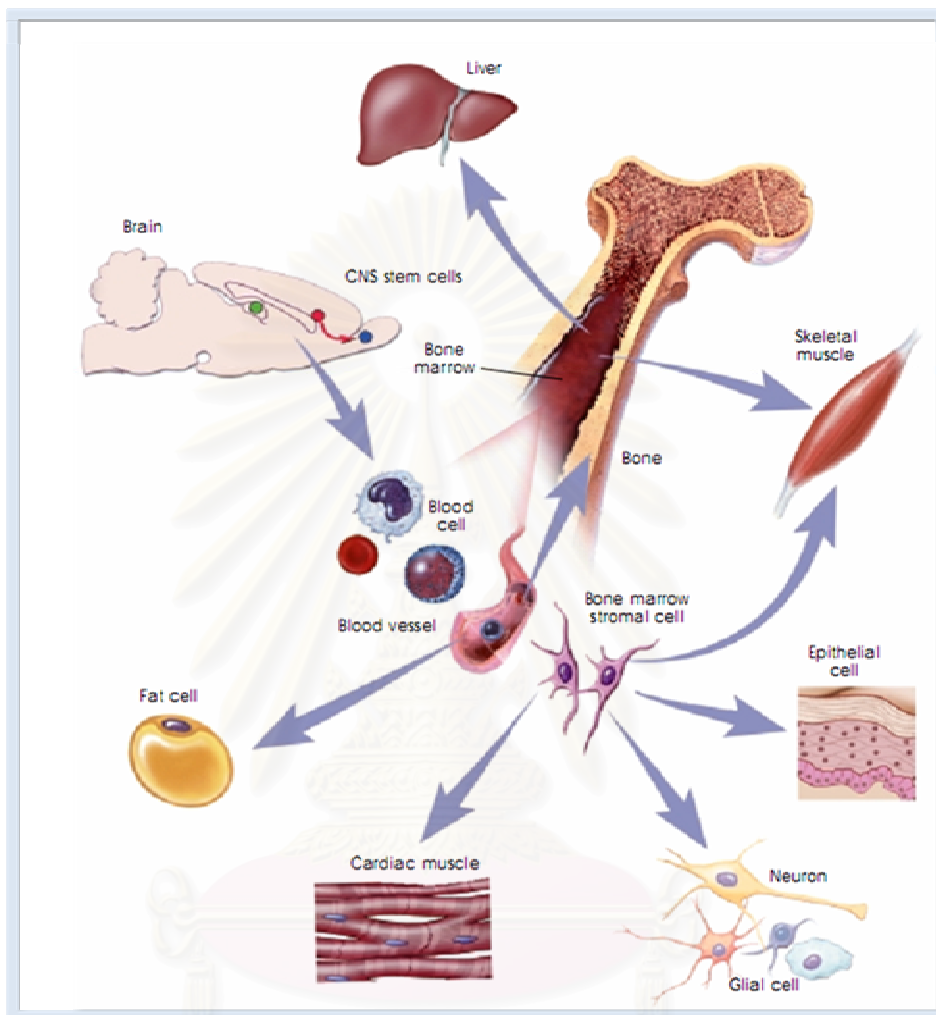
ECM มีคุณสมบัติในการจับกับโมเลกุลสัญญาณ (Signaling molecules) เช่น Growth factors, Cytokines รวมทั้งสารต่างๆ ได้ดี สำหรับในเนื้อเยื่อกระดูก ECM สามารถจับกับผลึกแคลเซียมทำให้เกิดการสะสมแคลเซียมในกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ด้วย ดังนั้น ECM จึงทำหน้าที่เสมือนเป็นแหล่งสะสมของสารสำคัญภายในเนื้อเยื่อต่างๆ ECM บางชนิดสามารถจับกับ Growth factors ได้อย่างจำเพาะ ทำให้ Growth factors สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์ในบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มี ECM ชนิดนั้นเป็นองค์ประกอบได้ เมื่อ Growth factors ถูกจับอยู่ที่ ECM จะทำให้กระบวนการย่อยสลาย Growth factors เกิดขึ้นช้าลง ECM มีส่วนเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Growth factors ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น Growth factors ที่ถูกจับอยู่ที่ ECM จะถูกปลดปล่อยอย่างช้าๆ จากการเปลี่ยนแปลงของ ECM ที่เกิดขึ้นตลอดเวลา ทำให้ Growth factors ที่ถูกปลดปล่อยออกมาสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างต่อเนื่องในอัตราที่เหมาะสมเป็นระยะเวลานานได้ (Stephen F. Badylak, 2004)

### 2.1.6 เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells)

เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ในร่างกายที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะแต่เมื่อมีการเหนี่ยวนำจะสามารถเกิด Differentiation ไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้ โดยเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนตัวเองได้ เซลล์ต้นกำเนิดพบได้ในบางบริเวณของร่างกาย เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการการทำงานของเซลล์บริเวณข้างเคียงที่เซลล์ต้นกำเนิดอาศัยอยู่ เมื่อมีการสูญเสียเซลล์ในบริเวณใกล้เคียงเซลล์ต้นกำเนิดสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดนั้นๆ เพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียไปได้ ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการซ่อมแซมตัวเองของร่างกาย และเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการบำบัดรักษาทางการแพทย์ รวมทั้งมีการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อด้วย (Ruth Kirschstein และ Lana R. Skirboll, 2001)

เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแยกได้จากเอมบริโอ ซึ่งจะเรียกเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ว่า Embryonic stem cell สำหรับเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากร่างกายของมนุษย์ที่เจริญวัยแล้วจะเรียกว่า Adult stem cell ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดสามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อในร่างกายได้หลายแหล่ง เช่น เลือด เนื้อเยื่อไขมัน (Adipose tissue) สายสะดือ (Umbilical cord) และจากไขกระดูก (Bone marrow) เซลล์ต้นกำเนิดที่มีการศึกษามากได้แก่เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากไขกระดูก เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเป็นเซลล์ที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ในด้านต่างๆ เนื่องจากในไขกระดูกมีเซลล์ต้นกำเนิดอยู่เป็นจำนวนมาก สามารถนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกออกมาจากร่างกายได้ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ซับซ้อน อีกทั้งเซลล์ที่ได้ยังมีศักยภาพในการเกิด

Differentiation ไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆในร่างกายได้หลากหลาย ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.19



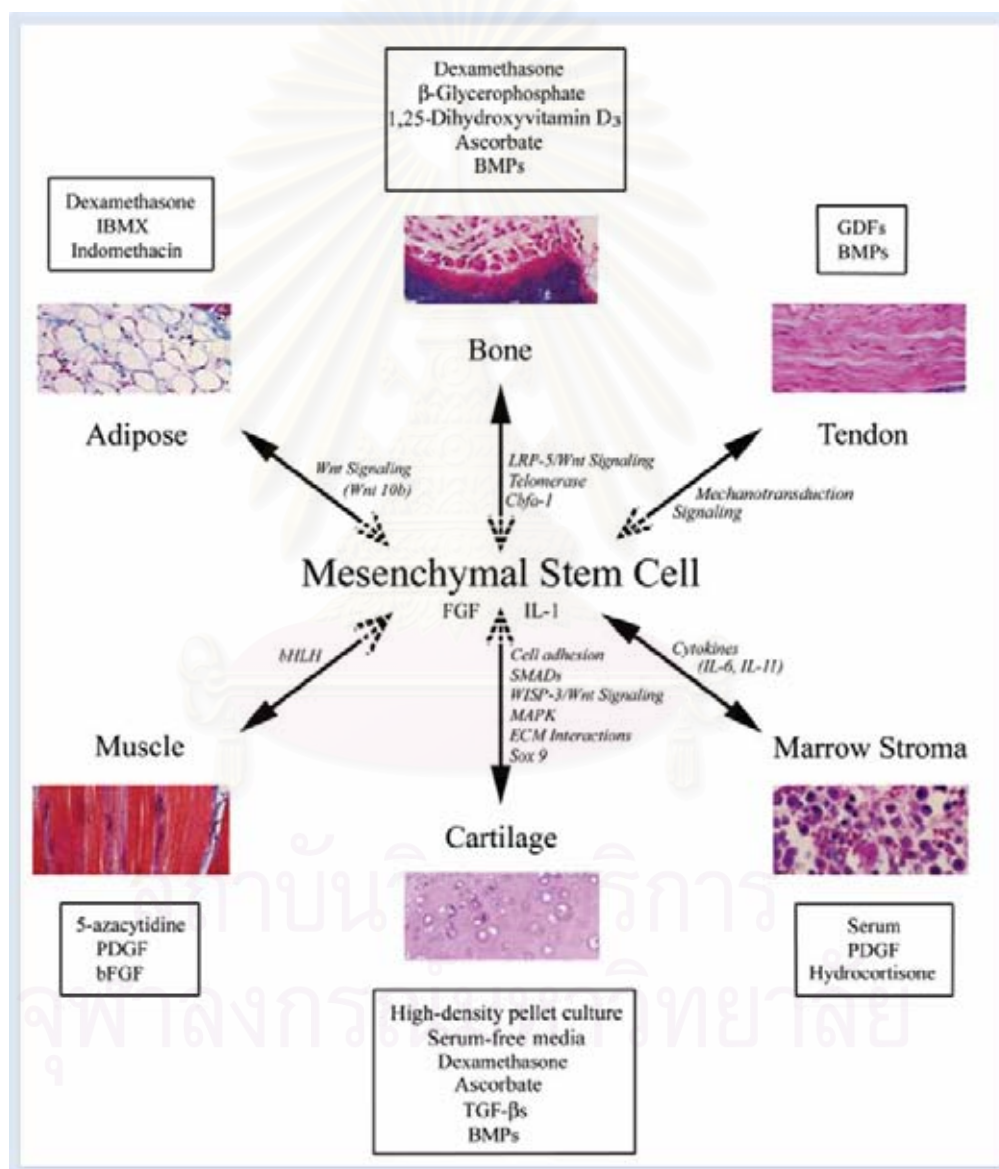
รูปที่ 2.19 ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ในร่างกาย

ที่มา Ruth Kirschstein และ Lana R. Skirboll (2001)

สถาบัน The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy ได้กำหนดเกณฑ์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell (MSC) ไว้ดังนี้ (Dominici M. และคณะ, 2006)

1. เซลล์สามารถเจริญเติบโตเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงพลาสติกภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงมาตรฐานได้

2. เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Flow cytometry ต้องปรากฏเซลล์ที่มีแอนติเจนเหล่านี้มากกว่าร้อยละ 95 ของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ CD73, CD90 และ CD105 และต้องปรากฏเซลล์ที่มีแอนติเจนเหล่านี้น้อยกว่าร้อยละ 2 ของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ CD45, CD34, CD14 หรือ CD11b, CD79a หรือ CD19 และ HLA class II
3. สามารถเกิด Differentiation ไปเป็นเซลล์ Osteoblasts, Adipocytes และ Chondroblasts ได้ ภายใต้สภาวะการชักนำมาตรฐานนอกร่างกายสัตว์ทดลอง

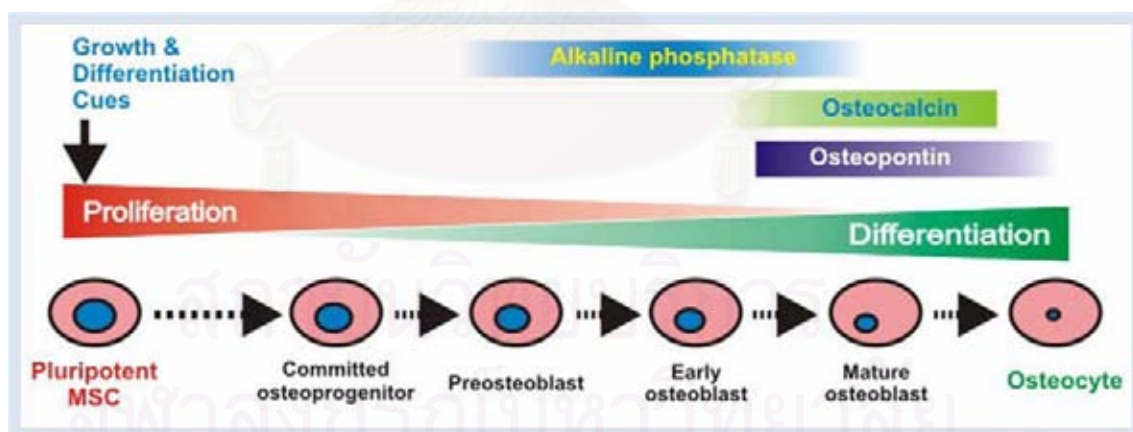


รูปที่ 2.20 สารที่ใช้ในการเหนี่ยวนำกระบวนการเกิด Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ

ที่มา Rocky S Tuan และคณะ, 2002

การชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation นิยมใช้ Dexamethasone, L Ascorbic acid 2 phosphate และ  $\beta$  Glycerophosphate สำหรับ Dexamethasone เป็นสารกลุ่ม Glucocorticoid ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการเกิด Osteogenic differentiation ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ถ้าใช้ที่ความเข้มข้นต่ำจะมีผลกระตุ้นการเกิด Osteogenic differentiation แต่ถ้าใช้ที่ความเข้มข้นสูงจะเกิดการยับยั้งและทำให้เกิด Adipogenic differentiation ขึ้นแทน (Nichoas W. Marion และ Jeremy J. Mao,2006) หมู่ฟอสเฟตอิสระจาก สารชักนำที่ใช้สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนกำหนดการสร้าง Core binding factor alpha 1 (Cbfa1) ซึ่งสำคัญต่อกระบวนการเกิด Osteogenesis โดยที่ Wnt-3a สามารถกระตุ้น กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase โดยไม่มีผลต่อระดับปริมาณของ Cbfa1 สำหรับ Ascorbic acid และ 1,25-dihydroxyvitamin D3 ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และกระตุ้นการสร้าง Osteocalcin (Rocky S. Tuan และคณะ, 2005)

ภายหลังเริ่มชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation จะเกิดการแสดงออกของ เอนไซม์ Alkaline phosphatase ภายใน 7-14 วัน และเมื่อชักนำเป็นเวลานานจะเกิดการแสดงออก ของ Bone sialoprotein, Osteocalcin, Osteonectin และเกิดการสะสมผลึกแคลเซียม (Nichoas W. Marion และ Jeremy J. Mao,2006) การแสดงออกของเซลล์ขณะเกิด Osteogenic differentiation แสดงดังรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.21  
ที่มา

การแสดงออกของเซลล์ขณะเกิด Osteogenic differentiation

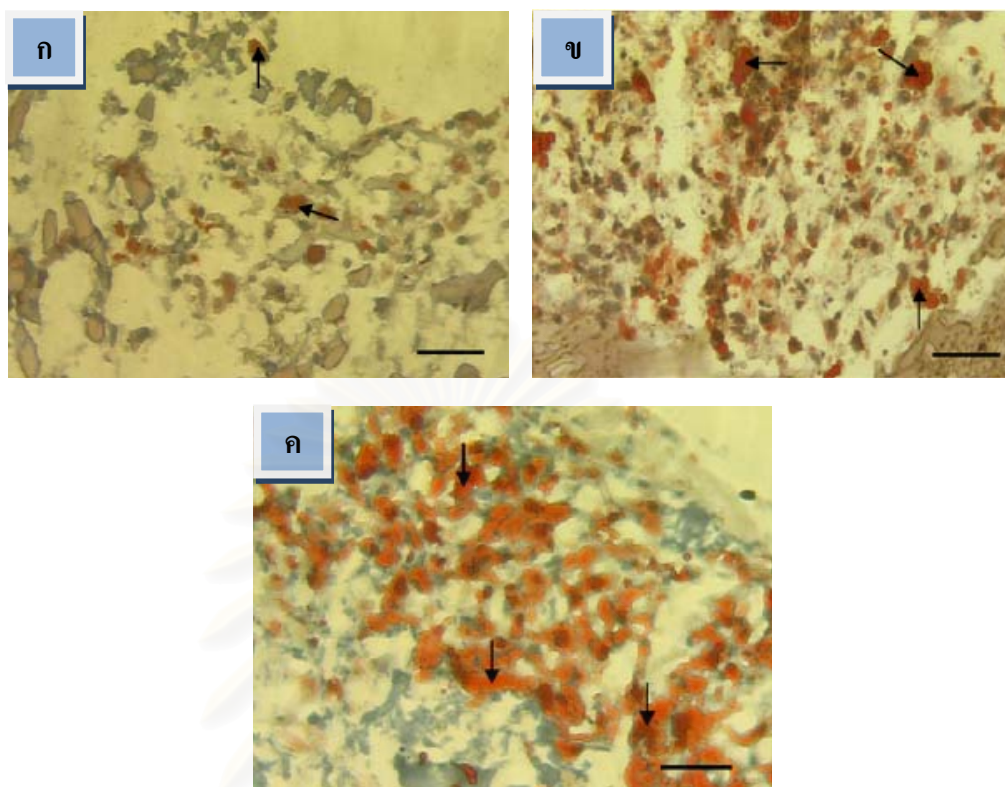
<http://www.boneandcancer.org/Photos%20since%2001-11-2006/multi-stage%20osteogenic%20differentiation.jpg>



## 2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Joanne E. Stewart และคณะ (2001) ได้เตรียมสารสกัดจากผิวหนังมนุษย์ชั้นหนังแท้โดยใช้สารละลาย Citric acid buffer เป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดจากผิวหนังที่ได้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ Fibroblast ของมนุษย์ เมื่อนำสารสกัดจากผิวหนังมนุษย์ที่เตรียมได้มาแยกโดย DEAE-cellulose column ทำให้แยกสารสกัดได้เป็น 4 ตัวอย่าง พบว่าเฉพาะตัวอย่างที่ 1 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ Fibroblast จากการวิเคราะห์พบว่าในตัวอย่างที่ 1 ประกอบด้วย Decorin และ Dermatan sulfate proteoglycan II เป็นองค์ประกอบหลัก ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า Decorin และ Dermatan sulfate proteoglycan II เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากผิวหนังมนุษย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ Fibroblast

เมื่อนำ ECM มาใช้เป็นวัตถุดิบทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ได้จะมีคุณสมบัติส่งเสริมกระบวนการ Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่ต้องการได้ดีกว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจากวัตถุดิบชนิดอื่นอีกหลายชนิดเมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบกัน ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Joshua R. Mauney และคณะ (2007) ที่ศึกษาเปรียบเทียบผลของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจากวัตถุดิบต่างชนิดกันในการส่งเสริมกระบวนการ Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดทั้งจากไขกระดูกและจากเนื้อเยื่อไขมัน ผู้วิจัยได้สกัด Fibroin จากรังไหมแล้วนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ จากนั้นจึงนำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จาก Fibroin ที่ได้มาศึกษาการใช้เป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สำหรับเนื้อเยื่อไขมัน โดยเปรียบเทียบกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จาก type I Collagen และจาก Poly-lactic acid ซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ตามลำดับที่นิยมใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์อย่างแพร่หลายในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ หลังจากนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันเข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทั้ง 3 ชนิดแล้วจึงชักนำให้เกิด Adipogenic differentiation เป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงโดยการย้อมลิพิดแกรนูโลลโดยวิธี Oil red O stain พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 ชนิดสามารถเกิด Adipogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจาก type I Collagen ได้ดีที่สุด รองลงมาคือโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จาก Fibroin สำหรับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จาก Poly-lactic acid ซึ่งเป็นวัสดุสังเคราะห์เกิด Adipogenic differentiation ได้ต่ำที่สุด (รูปที่ 2.22)



รูปที่ 2.22 เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากวัสดุดิบต่างชนิดกันแล้วชักนำให้เกิด Adipogenic differentiation เซลล์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์ Adipocyte จะย้อมติดสีแดงของ Oil red O

ก โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากพอลิเมอร์สังเคราะห์ PLA

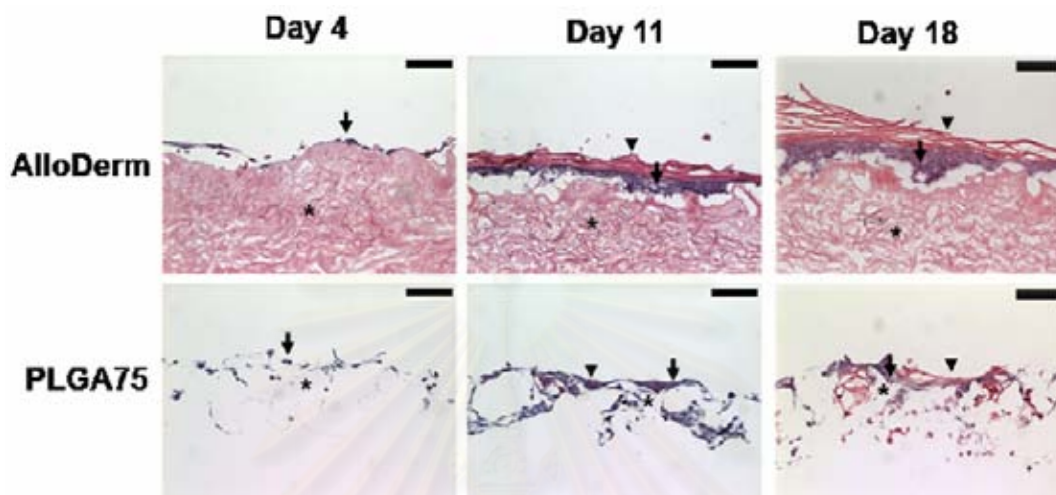
ข โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากโปรตีน Fibroin

ค โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจน

ที่มา Joshua R. Mauney และคณะ (2007)

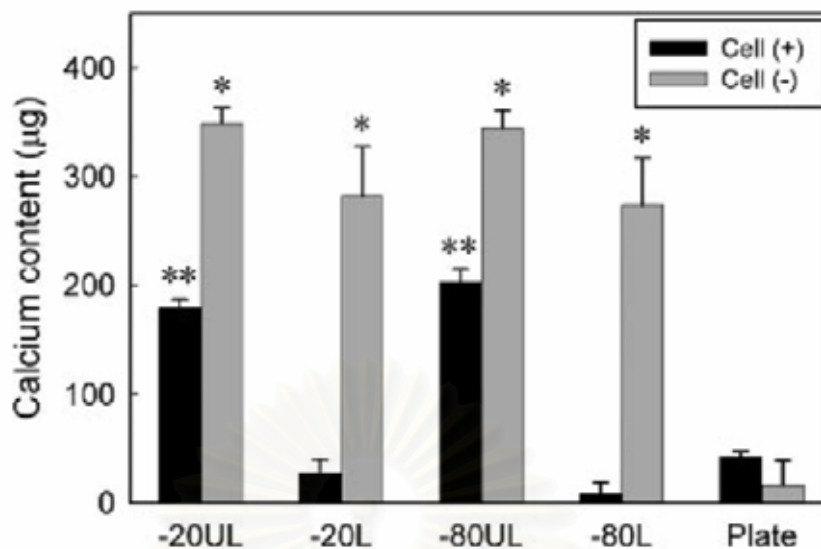
นอกจากโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ทำจาก ECM จะมีคุณสมบัติในการส่งเสริมกระบวนการ Differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จาก ECM ยังมีคุณสมบัติส่งเสริมกระบวนการเกิดเป็นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ของ Differentiated cells ได้ด้วยเช่นกัน จากงานวิจัยของ Benjamin L. Beckstead และคณะ (2005) ที่ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ Esophageal epithelial cells บน AlloDerm ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จำพวกหนังแท้ที่ปราศจากเซลล์ เปรียบเทียบกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากโพลิเมอร์สังเคราะห์ poly(L-lactic acid), poly(lactic-co-glycolic) acid ที่มีสัดส่วนของ Glycolic acid ร้อยละ 25 และ 50 พบว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตบน

AlloDerm เกิด Epithelial stratification สูง 5 – 6 ชั้น และมีชั้น Keratin หนา ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากโพลีเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้เปรียบเทียบ เกิด Epithelial stratification เพียง 2 – 3 ชั้น และมีชั้น Keratin หนาน้อยกว่า (รูปที่ 2.23)



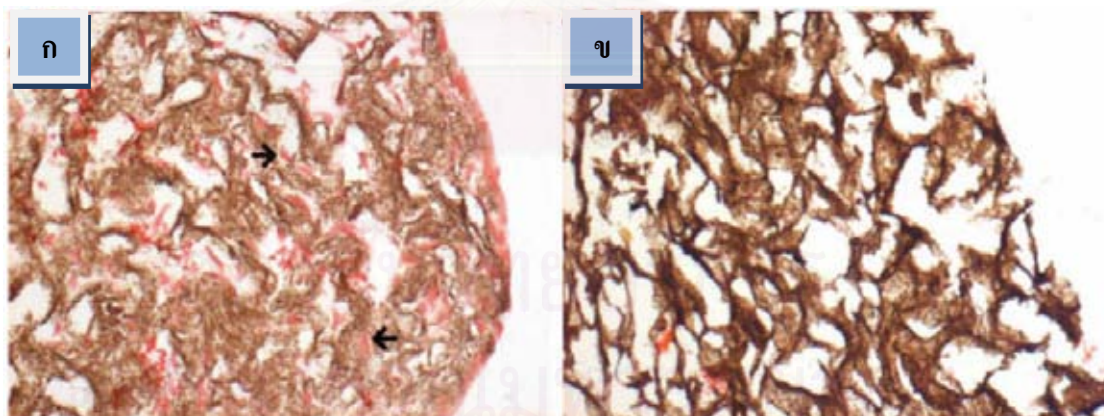
รูปที่ 2.23 การเจริญเติบโตซ้อนกันเป็นชั้นของเซลล์ Esophageal epithelial cells เมื่อเพาะเลี้ยงบน AlloDerm เปรียบเทียบกับ PLGA75  
ที่มา Benjamin L. Beckstead และคณะ (2005)

Dai-Chian Chen และคณะ (2006) ได้ทดสอบการเกิด Osteogenic differentiation ของเซลล์ Osteoblast รหัส MC3T3-E1 ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนที่เตรียมโดยกระบวนการต่างกัน คือ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนการทำแห้งแบบเยือก และ ผ่านหรือไม่ผ่านกระบวนการเชื่อมขวางโมเลกุลโดยใช้ Glutaraldehyde เมื่อวัดการสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนแต่ละสูตรที่เตรียมได้ ได้ผลดังรูปที่ 2.24 พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์มีปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงกว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์ในทุกรูปแบบของโครงเนื้อเยื่อที่ทดสอบ ภาพการสะสมแคลเซียมแสดงโดยการย้อมโดย von Kossa stain แสดงดังรูปที่ 2.25 จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนมีคุณสมบัติในการเกิดการสะสมแคลเซียมได้ดีและเมื่อโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีเซลล์อยู่ภายในจะขัดขวางการสะสมแคลเซียมในโมเลกุลของคอลลาเจน



รูปที่ 2.24 ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนที่เตรียมโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียสก่อนการทำแห้งแบบเยือกแล้วเชื่อมขวาง (L) และ ไม่เชื่อมขวางโมเลกุล (UL) ด้วย Glutaraldehyde เปรียบระหว่างชุดที่มีและไม่มีเซลล์ Osteoblast

ที่มา Dai-Chian Chen และคณะ (2006)



รูปที่ 2.25 การสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนแสดงแคลเซียมติดสีน้ำตาลเข้มจากการย้อมโดยวิธี von Kossa stain

ก โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์

ข โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์

ที่มา Dai-Chian Chen และคณะ (2006)

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ใช้วัสดุเป็นผิวหนังทั้งจากของมนุษย์และสัตว์ แต่ละผลิตภัณฑ์มีการะบวนการเตรียมที่ต่างกัน บางชนิดเป็นผิวหนังที่ปราศจากเซลล์แล้วทำให้แห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง บางชนิดมีการเชื่อมขวางโมเลกุลเพิ่มเติมและจำหน่ายแบบเปียกในของเหลว เป็นต้น ผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกรณีที่แตกต่างกัน ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากผิวหนังของมนุษย์และสัตว์ แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากผิวหนังของมนุษย์และสัตว์  
ที่มา Stephen F. Badylak และคณะ (2009)

Product	Company	Material	Processing	Form
Graft Jacket®	Wright Medical Tech	Human skin	Natural	Dry sheet
AlloDerm	Lifecell	Human skin	Natural	Dry sheet
Axis™ dermis	Mentor	Human dermis	Natural	Dry sheet
Bard® Dermal Allograft	Bard	Cadaveric human dermis	Natural	Dry sheet
Zimmer Collagen Patch®	Tissue Science Laboratories	Porcine dermis	Cross-linked	Hydrated sheet
Pelvicol®	Bard	Porcine dermis	Cross-linked	Hydrated sheet
Permacol™	Tissue Science Laboratories	Porcine skin	Cross-linked	Hydrated sheet
PriMatrix™	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet
SurgiMend™	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet
TissueMend®	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet
Xenform™	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- Acetic acid จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
- Antibiotic/Antimycotic solution จากบริษัท Invitrogen Corp., Auckland, New Zealand
- Ascorbic acid จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Calcium chloride จากบริษัท Riedel-de Haën, German
- Collagenase type I จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Dexamethazone จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Dimethylmethylene blue จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) จากบริษัท Hyclone Corp., U.S.A.
- Fetal bovine serum จากบริษัท PAA Lab., Austria
- Glycerophosphate disodium จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Glycine จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Hank's balance salt solution (HBSS) จากบริษัท Hyclone Corp., U.S.A.
- Hydrochloric acid จากบริษัท APS Finechem, Seven Hills, Australia
- L-Glutamine จากบริษัท Invitrogen Corp., Auckland, New Zealand
- O-Cresolphthalein complexone จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Papain จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Percoll จากบริษัท Hyclone Corp., U.S.A.
- Phosphate buffer saline จากบริษัท PAA Lab., Austria
- p-Nitrophenol จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- p-Nitrophenylphosphate จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Sodium chloride จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Sodiumdodecylsulfate (SDS) จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Sodium hydrogencarbonate จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.
- Trypsin จากบริษัท PAA Lab., Austria
- Type I Collagen จากบริษัท Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, U.S.A.

### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

CO<sub>2</sub> Incubator Model 371 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.)

Centrifuge (Eppendorf AG 22331, Germany)

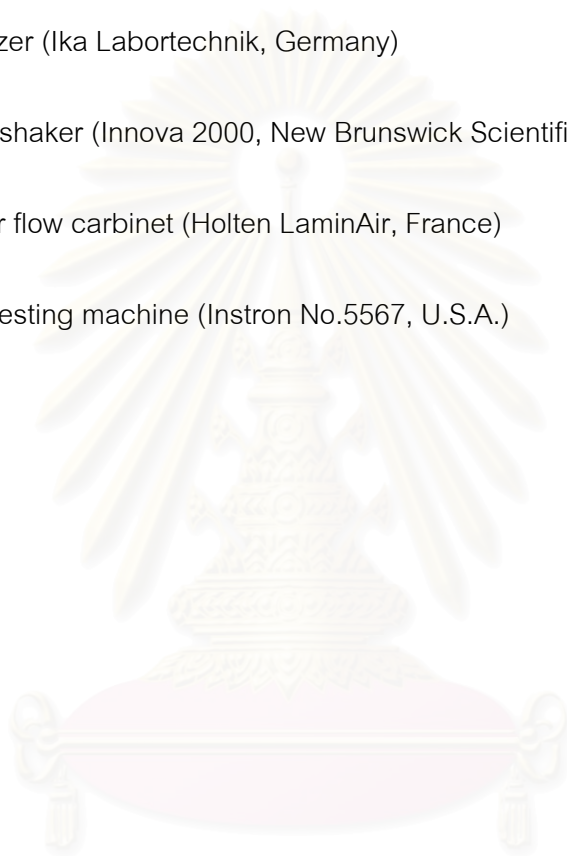
Flow cytometry (Beckman Coulter, Switzerland)

Homogenizer (Ika Labortechnik, Germany)

Horizontal shaker (Innova 2000, New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A.)

Laminar air flow carbinet (Holten LaminAir, France)

Universal testing machine (Instron No.5567, U.S.A.)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนังและการวิเคราะห์องค์ประกอบ

ตัวอย่างผิวหนังได้จากการเตรียมโดยใช้ Dermatome เก็บตัวอย่างผิวหนังหนา 5 มิลลิเมตร จากบริเวณต้นขาด้านใน (Inner thigh) ของศพผู้แสดงความยินยอมบริจาคร่างกาย ภายหลังจากเสียชีวิตแก่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าสู่การวิจัย

1. เป็นศพผู้เสียชีวิตที่ได้แสดงความยินยอมอุทิศร่างกายแก่โรงพยาบาลก่อนเสียชีวิต
2. เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง
3. ไม่เสียชีวิตด้วยโรคติดต่อและมีผิวหนังปกติ

เกณฑ์การคัดเลือกรอกจากการวิจัย

1. เสียชีวิตนานเกิน 24 ชั่วโมง
2. เสียชีวิตด้วยโรคติดต่อ หรือมีความผิดปกติที่ผิวหนัง

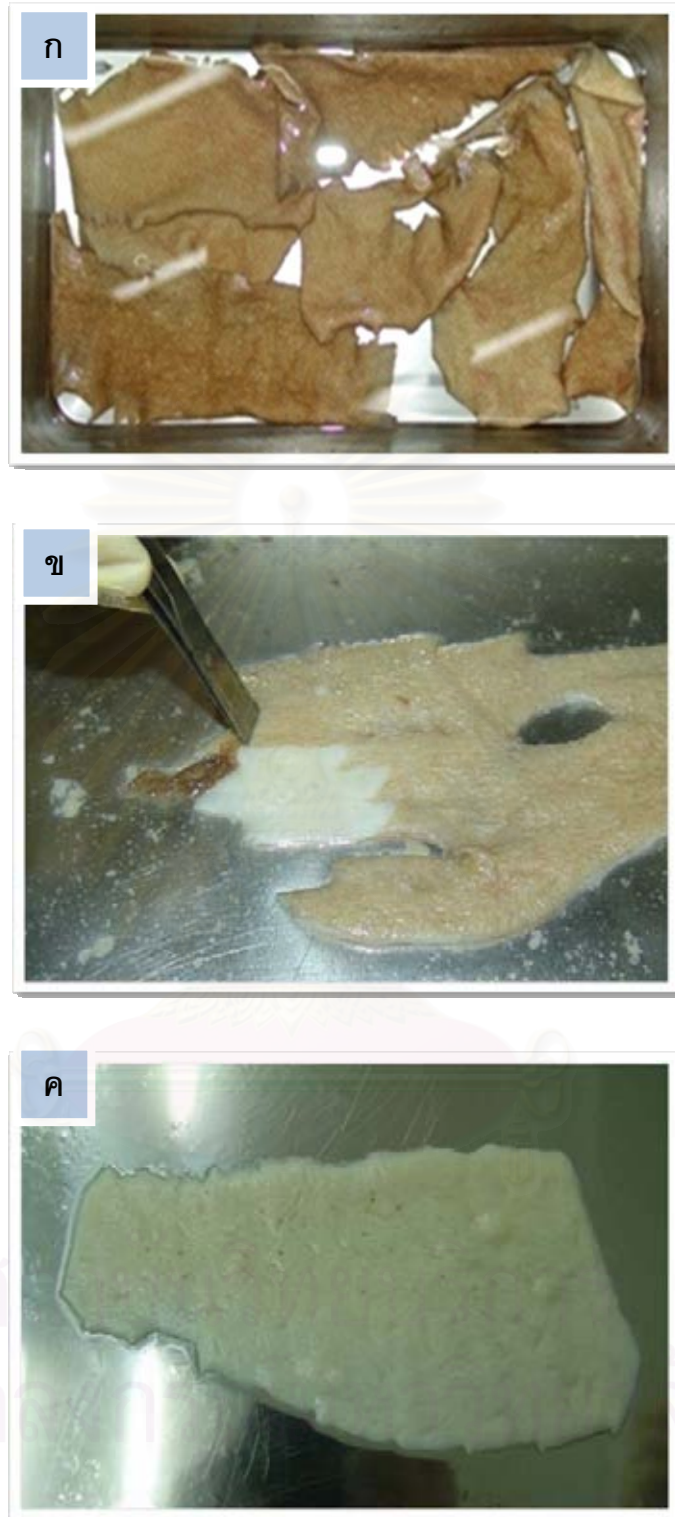
ลักษณะตัวอย่างผิวหนังที่ได้รับบริเวณด้านหนังกำพวด (Epidermis) มีลักษณะเหมือนผิวหนังของมนุษย์ที่มองเห็นจากภายนอกทั่วไป ดังรูปที่ 3.1 บริเวณด้านหนังแท้ (Dermis) มีลักษณะสีขาวนวล ด้านล่างมีเนื้อเยื่อไขมันติด (Adipose tissue) มาบ้างเล็กน้อย เมื่อนำตัวอย่างผิวหนังมาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผิวหนังที่ได้จะมีลักษณะนุ่มบวมน้ำเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.1 ก) สามารถใช้ Forceps ลอกผิวหนังชั้นหนังกำพวดออกได้ง่าย (รูปที่ 3.1 ข) เมื่อลอกผิวหนังชั้นหนังกำพวดออกจนหมดรวมทั้งลอกกำจัดเนื้อเยื่อไขมันที่ติดปนมาออกจนหมดเรียบร้อยแล้วจะได้ผิวหนังชั้นหนังแท้ที่มีลักษณะสีขาว (รูปที่ 3.1 ค) ซึ่งพร้อมสำหรับการนำไปเตรียมเป็นสารสกัดจากผิวหนังต่อไป

#### 3.3.1.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง

##### 3.3.1.1.1 การเตรียมผิวหนังชั้นหนังแท้ (Dermis)

1. นำตัวอย่างผิวหนังมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำบริสุทธิ์ 3 ครั้ง
2. แช่ตัวอย่างผิวหนังในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างผิวหนังมาลอกชั้นหนังกำพวดออกด้วย Forceps ให้เหลือแต่ผิวหนังชั้นหนังแท้





รูปที่ 3.1

กระบวนการเตรียมผิวหนังชั้นหนังแท้

ก ตัวอย่างผิวหนังในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 นอร์มัล

ข การลอกชั้นหนังกำพวด

ค ผิวหนังชั้นหนังแท้ที่เตรียมได้

### 3.3.1.1.2 การเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้

1. นำผิวหนังชั้นหนังแท้ที่เตรียมไว้มาล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ให้สะอาดและล้างด้วยสารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70
2. นำตัวอย่างผิวหนังชั้นหนังแท้มาชั่งน้ำหนักเปียก (Wet weight)
3. เตรียมสารละลายกรดแอสติก (Acetic acid) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3 ปริมาตรเป็น 15 เท่าของน้ำหนักหนังแท้
4. บดหนังแท้ให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อให้ละเอียด
5. นำหนังแท้ที่บดละเอียดแล้วไปปั่นในเครื่องปั่นน้ำผลไม้ มาผสมกับสารละลายกรดแอสติก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่เตรียมไว้ แล้วจึงปั่นให้สารละลายกลมกลืนเป็นเนื้อเดียวกัน
6. นำสารละลายที่ได้มาผสมให้กลมกลืนอีกครั้งด้วยเครื่อง Homogenizer



รูปที่ 3.2

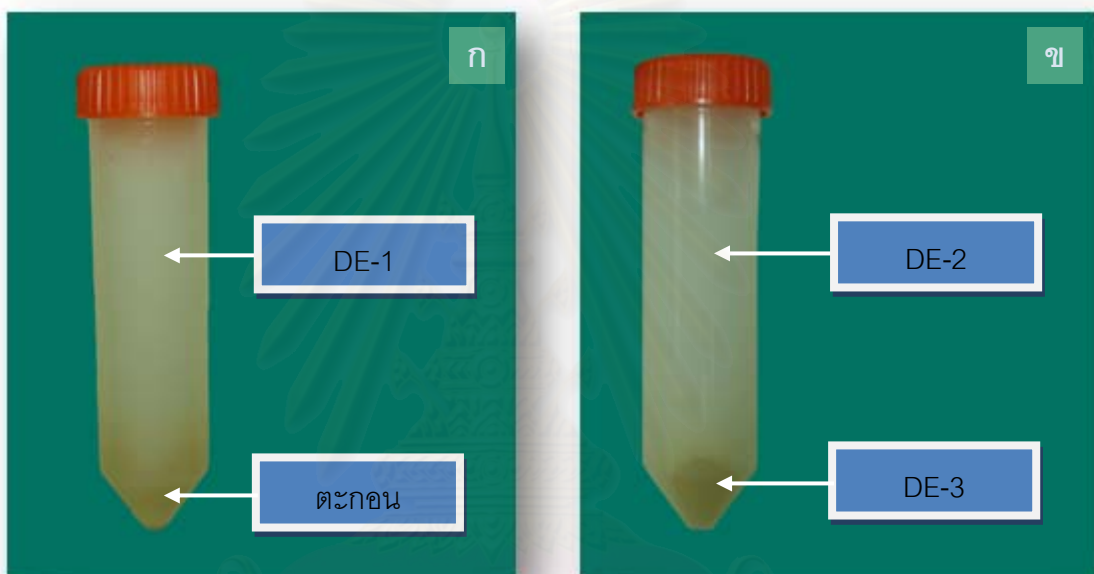
กระบวนการเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้

ก หนังแท้หลังการบดด้วยเครื่องบดเนื้อ

ข สารละลายผิวหนังที่เตรียมได้

### 3.3.1.1.3 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง

1. นำสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้ที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ตะกอนผิวหนังที่ไม่ละลายจะตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ของหลอดด้านบนเป็นสารละลายผิวหนัง กำหนดชื่อเป็น DE-1
2. นำสารละลายผิวหนัง DE-1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จะทำให้ของเหลวแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ของเหลวชั้นบนกำหนดชื่อเป็น DE-2 และของเหลวชั้นล่างกำหนดชื่อเป็น DE-3

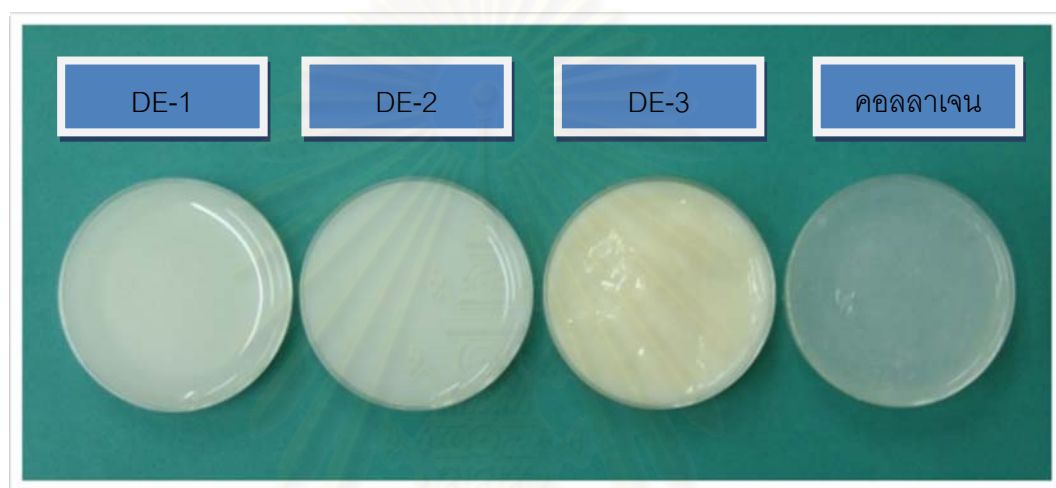


รูปที่ 3.3

ลักษณะที่ได้จากกระบวนการเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง

- ก ลักษณะของสารละลายจากหนังแท้หลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ของเหลวสีขาวด้านบนคือสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 ตะกอนด้านล่างเป็นตะกอนหยาบของผิวหนัง (Dermal remnant) ที่ไม่ละลาย และจะถูกกำจัดทิ้งไป
- ข ลักษณะของสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 หลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ของเหลวใสด้านบนคือสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 ตะกอนด้านล่างคือสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3

การเตรียมสารสกัดจากผิวหนังสัตว์ต่างๆ แสดงดังรูปที่ 3.3 สารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้เมื่อนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จะเกิดการแยกชั้นของสารละลาย ของเหลวสีขาวด้านบนที่ได้ คือ DE-1 ตะกอนด้านล่างเป็นตะกอนหยาบของผิวหนัง (Dermal remnant) ที่ไม่ละลาย และจะถูกกำจัดทิ้งไป ดังรูปที่ 3.3 ก เมื่อนำ DE-1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการแยกชั้นของสารละลายอีกครั้ง โดยที่ของเหลวใสด้านบน คือ DE-2 และ ตะกอนด้านล่างที่ได้ คือ DE-3 ดังรูปที่ 3.3 ข



รูปที่ 3.4 สารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา ได้แก่ DE-1, DE-2 และ DE-3 ตามลำดับ และขวาสุด คือ สารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1

### 3.3.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ ECM ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร

สารสกัดจากผิวหนังที่เตรียมได้แต่ละสูตร คือ DE-1, DE-2 และ DE-3 ถูกนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของ Extracellular matrix (ECM) โดยการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน (Collagen) และ ปริมาณ Glycosaminoglycans (GAGs)

#### 3.3.1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน ใช้การวิเคราะห์ปริมาณของ Hydroxyproline ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบได้น้อยในโปรตีนชนิดอื่นแต่พบมากในโมเลกุลของคอลลาเจน แล้วเทียบเป็นปริมาณ Collagen กระบวนการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนดำเนินการตามวิธีของ AOAC official method 990.26 ส่งตัวอย่างดำเนินการตรวจวิเคราะห์โดย บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

### 3.3.1.2.1.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณ Hydroxyproline

1. นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มาทำให้แห้งโดยกระบวนการ Lyophilization แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด
2. นำตัวอย่าง 4 กรัม ใส่ลงในพลาสติก แล้วเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3.5 โมลาร์ ปริมาตร 30 มล.
3. นำสารละลายที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์จนมีปริมาตร 500 มล. แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 เซนติเมตร
5. นำสารละลายปริมาตร 2 มล. มาเติมด้วยสารละลาย Chloramine-T reagent ความเข้มข้น 14.1 มก./มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
6. เติมสารละลาย 4-dimethylamino benzaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
7. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร

### 3.3.1.2.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Hydroxyproline

1. เตรียมสารละลาย Hydroxyproline ที่ความเข้มข้นหลายความเข้มข้นต่อเนื่องกัน โดยอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 2.4 ไมโครกรัม/มล.
2. นำสารละลายปริมาตร 2 มล. มาเติมด้วยสารละลาย Chloramine-T reagent ความเข้มข้น 14.1 มก./มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
3. เติมสารละลาย 4-dimethylamino benzaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Hydroxyproline ที่ความเข้มข้นต่างกัน มาสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้น

ของ Hydroxyproline และ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย  
Hydroxyproline ในแต่ละความเข้มข้น

### 3.3.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated Glycosaminoglycans (Sulfated GAGs)

การวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated GAGs ใช้วิธี Dimethylmethylene blue assay โดยแบ่งเป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซึ่งอ้างอิงตามวิธีการของ Koji Kojima และคณะ (2003) และขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated GAGs โดยวิธี Dimethylmethylene blue assay อ้างอิงตามวิธีการของ Richard W. Farndale และคณะ (1986)

#### 3.3.1.2.2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated GAGs

1. นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มาทำให้แห้งโดยกระบวนการ Lyophilization
2. นำตัวอย่างน้ำหนัก 2.5 มก. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.
3. เติมสารละลายเอนไซม์ปาเปนซึ่งประกอบด้วย

เอนไซม์ปาเปน (Papain)	125 ไมโครกรัม/มล.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 มิลลิโมลาร์
Cysteine hydrochloride	10 มิลลิโมลาร์
Na-EDTA	10 มิลลิโมลาร์
EDTA	5 มิลลิโมลาร์

ปริมาตร 1 มล. ลงในหลอดทดลอง

4. นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.3.1.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated GAGs

1. นำสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 50 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลาย Dimethylmethylene blue ปริมาตร 1 มล. ลงในแต่ละหลอด

สารละลาย Dimethylmethylene blue ซึ่งประกอบด้วย

Dimethylmethylene blue	16 มก./ล.
ไกลซีน (Glycine)	3.04 ก./ล.
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.37 ก./ล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3. ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบเป็นปริมาณ Sulfated GAGs จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Sulfated GAGs และค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

### 3.3.1.2.2.3 การสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Sulfated GAGs โดยวิธี

1. เตรียมสารละลาย Chondroitin-6-sulfate ให้มีความเข้มข้นเป็นลำดับดังนี้ 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม/มล.
2. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated GAGs ตามวิธีการทดลองที่ 1.2.2.2
3. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน มาสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ Sulfated GAGs (ในที่นี้ใช้ Chondroitin-6-sulfate แทน) และ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในแต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Sulfated GAGs ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Dimethylmethylene Blue assay

ความเข้มข้นของ Sulfated GAGs (ไมโครกรัม/มล.)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
10	0.0203	0.0096
20	0.0400	0.0040
30	0.0587	0.0015
40	0.0803	0.0144
50	0.1073	0.0116

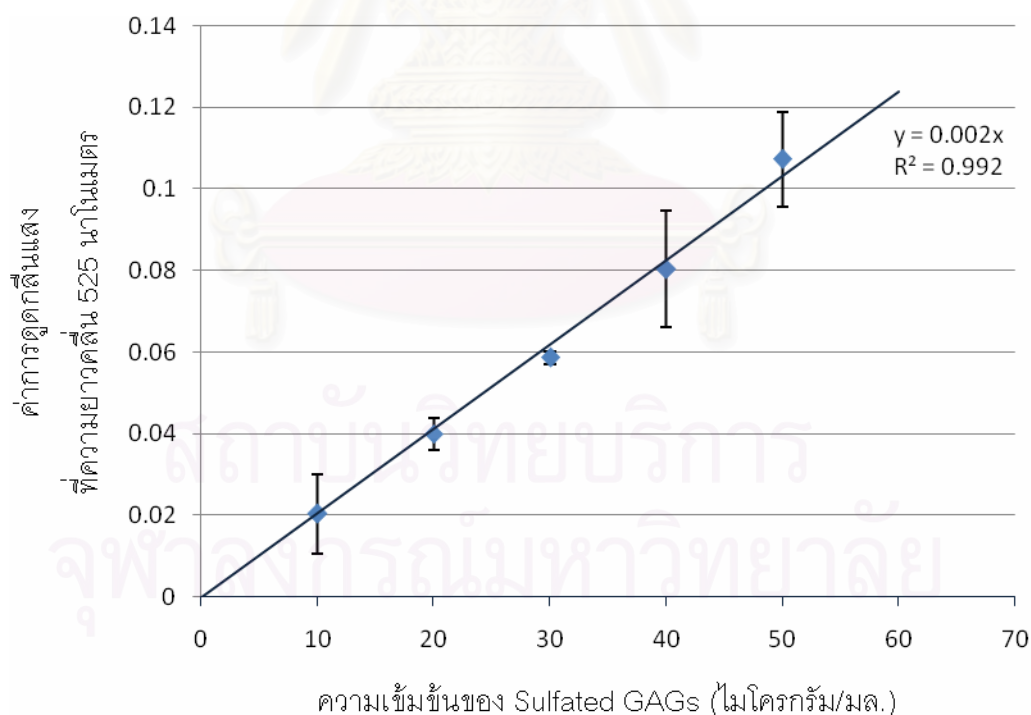
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Sulfated GAGs โดยใช้ Chondroitin-6-sulfate และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร โดยวิธี Dimethylmethylene Blue assay ได้ข้อมูลดังตารางที่ 3.1 ซึ่งสามารถนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ 4.6 สามารถสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Sulfated GAGs และค่าการดูดกลืนแสงได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่าการดูดกลืนแสง} = 0.002 \times \text{ความเข้มข้นของ Sulfated GAGs (ไมโครกรัม/มล.)}$$

$$\text{หรือ ความเข้มข้นของ Sulfated GAGs (ไมโครกรัม/มล.)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times 484.1$$

เนื่องจากในสารละลายที่ใช้วัดปริมาณ Sulfated GAGs ปริมาตร 1 มล. มีสารสกัดจากผิวหนังละลายอยู่ 2.5 มก. น้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงสามารถหาปริมาณ Sulfated GAGs ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากผิวหนังได้จากสมการ

$$\text{ปริมาณ Sulfated GAGs (ไมโครกรัม/มก.)} = (\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times 484.1) / 2.5$$



รูปที่ 3.5 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GAGs และค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์โดยวิธี Dimethylmethylene blue assay

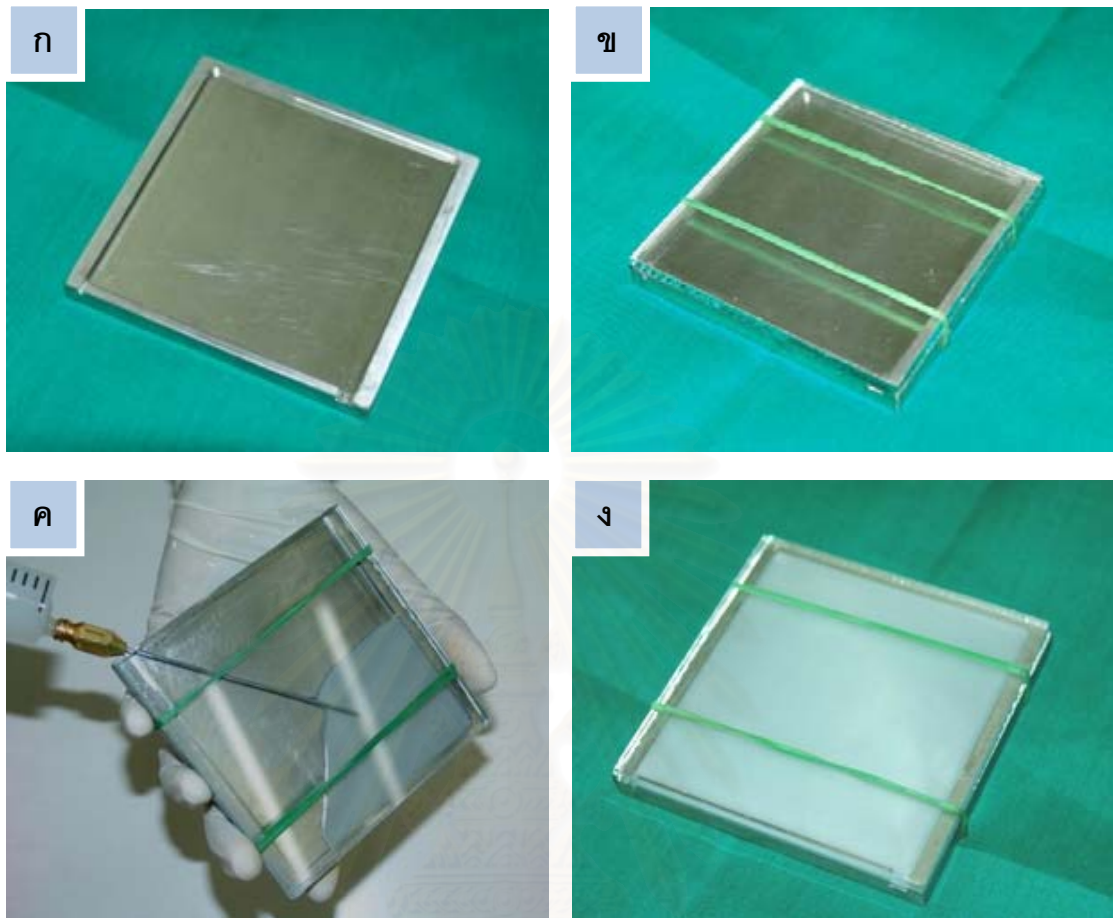


### 3.3. 2 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และการวิเคราะห์คุณสมบัติ

สารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรที่เตรียมได้ ซึ่งได้แก่ DE-1, DE-2 และ DE-3 รวมทั้งสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I Collagen) สำหรับใช้เป็นวัสดุเทียบเปรียบเทียบ ถูกนำมาเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยกระบวนการ Lyophilization ทำการวิเคราะห์ของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จาก คุณสมบัติของรูพรุน ความต้านทานแรงดึง ความต้านทานแรงกด และ อัตราการย่อยสลายโดยเอนไซม์

#### 3.3.2.1 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

1. นำสารสกัดจากหนังแท้แต่ละสูตร ซึ่งได้แก่ DE-1, DE-2 และ DE-3 รวมทั้งสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวล/ปริมาตร (ในสารละลายกรดแอสซิติค ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์) ฉีดเข้าสู่มแม่แบบขึ้นรูป (Mould) แบบแผ่น ความลึก 0.2 ซม.
2. นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำไปทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilization ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท
4. ย้ายโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในแม่แบบขึ้นรูปไปทำให้อุ่นขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ในเครื่อง Vacuum oven
5. นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ออกจากแม่แบบขึ้นรูป แล้วนำไปนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเครื่อง Vacuum oven
6. นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แบบแผ่นสี่เหลี่ยมที่ได้มาเจาะให้เป็นแผ่นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. โดยใช้อุปกรณ์ Biopsy punch



รูปที่ 3.6 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนังลงในแม่แบบขึ้นรูป  
 ก แม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แบบแผ่น  
 ข แม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แบบแผ่นหลังการปิดทับด้วยกระจก  
 ค การฉีดสารสกัดจากผิวหนังลงในแม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์  
 ง สารสกัดจากผิวหนังหลังฉีดลงในแม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.7 กระบวนการทำแท่งเพื่อขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์  
 ก กระบวนการขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยการทำแท่งแบบเยือกแข็ง  
 ข กระบวนการอบแท่งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.8 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ลักษณะเป็นวงกลมหนา 2 มม.

### 3.3.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

#### 3.3.2.2.1 การวิเคราะห์รูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เตรียมได้แต่ละชนิด มาเคลือบพื้นผิวด้วยทองคำและวิเคราะห์รูพรุนที่พื้นผิวด้านบนและด้านข้าง โดยการบันทึกภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า ด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ชื่อการค้า JEOL รุ่น JSM-5410LV จากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดของรูพรุน (Pore size) โดยโปรแกรม Image J

#### 3.3.2.2.2 การวิเคราะห์ความต้านทานแรงกด (Compressive stress)

วิเคราะห์ความต้านทานแรงกดโดยใช้เครื่อง Universal testing machine ชื่อการค้า Instron รุ่น No. 5567 ใช้อัตราการกด 0.5 ม.ม./นาที ช่วงความเครียด (strain range) อยู่ในช่วงร้อยละ 5 – 30 การทดสอบใช้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์รูปทรงสี่เหลี่ยมขนาด  $1 \times 1 \times 0.2$  ลูกบาศก์เซนติเมตร วิเคราะห์ตัวอย่างละ 5 ชิ้น นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (Stress) และความเครียด (Strain) เพื่อหาค่า Compressive modulus

#### 3.3.2.2.3 การวิเคราะห์การย่อยสลายของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยเอนไซม์

- เตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตร สูตรละ 12 ชิ้น (สำหรับการเก็บตัวอย่าง 4 เวลา เวลาละ 3 ชิ้น) ขนาด กว้าง 1 ซม. ยาว 1 ซม.หนา 0.2 ซม. ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 ชิ้น ชั่งน้ำหนักแห้งของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละชิ้นแล้วบันทึกน้ำหนักเริ่มต้น
- เตรียมสารละลายเอนไซม์ Collagenase type I ใน Phosphate buffer saline (PBS) ที่ประกอบด้วย

เอนไซม์ Collagenase type I	0.5	ยูนิต/มล.
แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)	0.36	มิลลิโมลาร์
โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide)	ร้อยละ 0.02	โดยน้ำหนัก
- เติมสารละลายเอนไซม์ Collagenase type I ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ หลอดละ 2 มล. แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- เก็บตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตร สูตรละ 3 หลอด ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง
- นำหลอดทดลองตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูคของเหลวทิ้ง

6. นำหลอดทดลองตัวอย่างไปทำให้แห้งโดยกระบวนการ Lyophilization
7. ชั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์หลังทดสอบการย่อยสลายโดยเอนไซม์
8. คำนวณร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่หลังการย่อยสลายโดยเอนไซม์จากสูตร

$$\begin{aligned} & \text{ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือ} \\ & = \frac{\text{น้ำหนักโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์หลังการย่อยสลาย} \times 100}{\text{น้ำหนักโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์หลังการย่อยสลาย}} \end{aligned}$$

9. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายกับร้อยละของน้ำหนักที่เหลือหลังการย่อยของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตร

### 3.3.3 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมนุษย์และการวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์

ตัวอย่างไขกระดูกจากกระดูกเชิงกราน (Iliac crest bone) ได้รับความบริจาคจากผู้เข้ารับบริการบำบัดรักษาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกตามปกติ ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยผู้บริจาคแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย การเก็บตัวอย่างไขกระดูกจากอาสาสมัครเพื่อการบำบัดรักษาตามปกติจะเก็บในปริมาณ 10 – 20 มล./ก.ก. น้ำหนักตัวอาสาสมัคร ซึ่งประมาณ 1,000 มล. (200 ซีออนซา) สำหรับในงานวิจัยนี้จะเก็บตัวอย่างไขกระดูกเพิ่มอีก 20 มล. (4 ซีออนซา) รวมเป็น 1,020 มล. (204 ซีออนซา) โดยที่ปริมาณไขกระดูกที่เก็บเพิ่มเพื่อการวิจัยดังกล่าวไม่มีผลต่อการบำบัดรักษาของอาสาสมัครและไม่เป็นอันตรายต่ออาสาสมัครแต่อย่างใด

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าสู่การวิจัย

1. เป็นผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องทำการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเพื่อการบำบัดรักษา หรือ เป็นผู้ที่มีสุขภาพร่างกายปกติแต่มีความประสงค์จะบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก

เกณฑ์การคัดเลือกออกจากการวิจัย

1. มีความจำเป็นบางประการที่ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไขกระดูกเพิ่มได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพิจารณาของแพทย์ผู้ดูแลและทำการเก็บตัวอย่างไขกระดูก

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะ

แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขใบรับรอง COA No. 134/2009 และ IRB No.

459/51 เมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2552

3.3.3.1 การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (Donald P. Lennon และ Arnold I. Caplan, 2006)

1. นำตัวอย่างไขกระดูกปริมาตร 20 มล. มาเติมอาหารเพาะเลี้ยง (DMEM-LG ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้นร้อยละ 10) ปริมาตร 20 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน
2. นำสารละลายไขกระดูกที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 450 g เป็นเวลา 5 นาที
3. สารละลายจะแยกชั้นเป็นชั้นของเหลวใสด้านบนและตะกอนเซลล์ด้านล่าง ดูดของเหลวใสด้านบนทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มล.
4. เติมสารแขวนลอยของเซลล์จากไขกระดูกลงบนสารละลาย Percoll ปริมาตร 35 มล. อย่างช้าๆด้วยความระมัดระวัง ให้สารแขวนลอยของเซลล์วางตัวเป็นชั้นบนสารละลาย Percoll (สารละลาย Percoll ประกอบด้วย Percoll ปริมาตร 22.05 มล. , Hank's balance salt ปริมาตร 10.50 มล. และ สารละลายไฮเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 2.45 มล.)
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 480 g เป็นเวลา 15 นาที
6. ดูดของเหลวที่แยกเป็นชั้นด้านบนสุดของสารละลายซึ่งเป็นชั้นของเหลวที่ประกอบด้วยเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก มาใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่แล้วปรับปริมาตรด้วยอาหารเพาะเลี้ยงจนมีปริมาตรเป็น 50 มล.
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 450 g เป็นเวลา 5 นาที
8. ดูดของเหลวใสด้านบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์ แล้วจึงละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงแล้วนำเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยง โดยให้มีความหนาแน่นเซลล์  $1.8 \times 10^5$  เซลล์/มล.
9. เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยง Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) สูตรกลูโคสต่ำ (DMEM-LG) ซึ่งประกอบด้วย

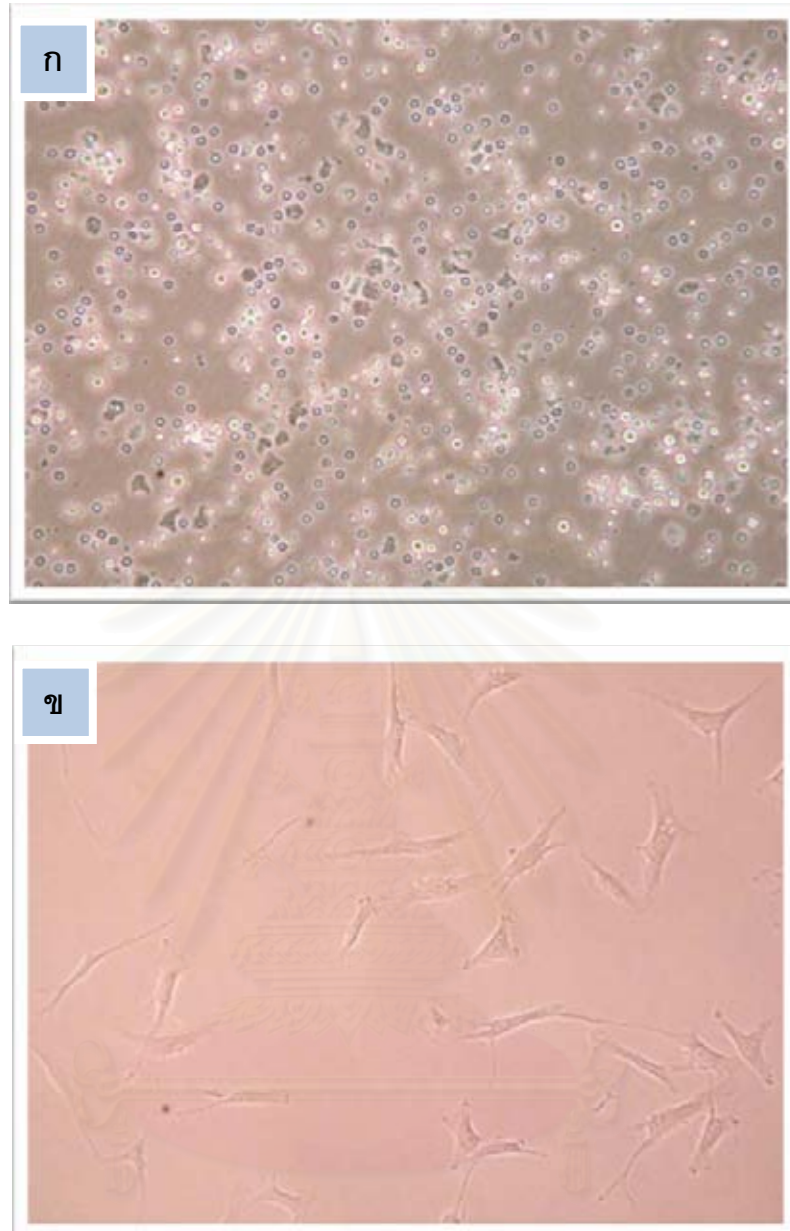
Fetal bovie serum	ร้อยละ 10
L-Glutamine	ร้อยละ 1
Antibiotic/Antimycotic solution	ร้อยละ 1



รูปที่ 3.9 กระบวนการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก  
 ก เซลล์จากไขกระดูกทั้งหมดที่ตกตะกอนจากการปั่นเหวี่ยงในอาหารเพาะเลี้ยง  
 ข เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่แยกเป็นชั้นอยู่ด้านบนจากการปั่นเหวี่ยงใน Percoll

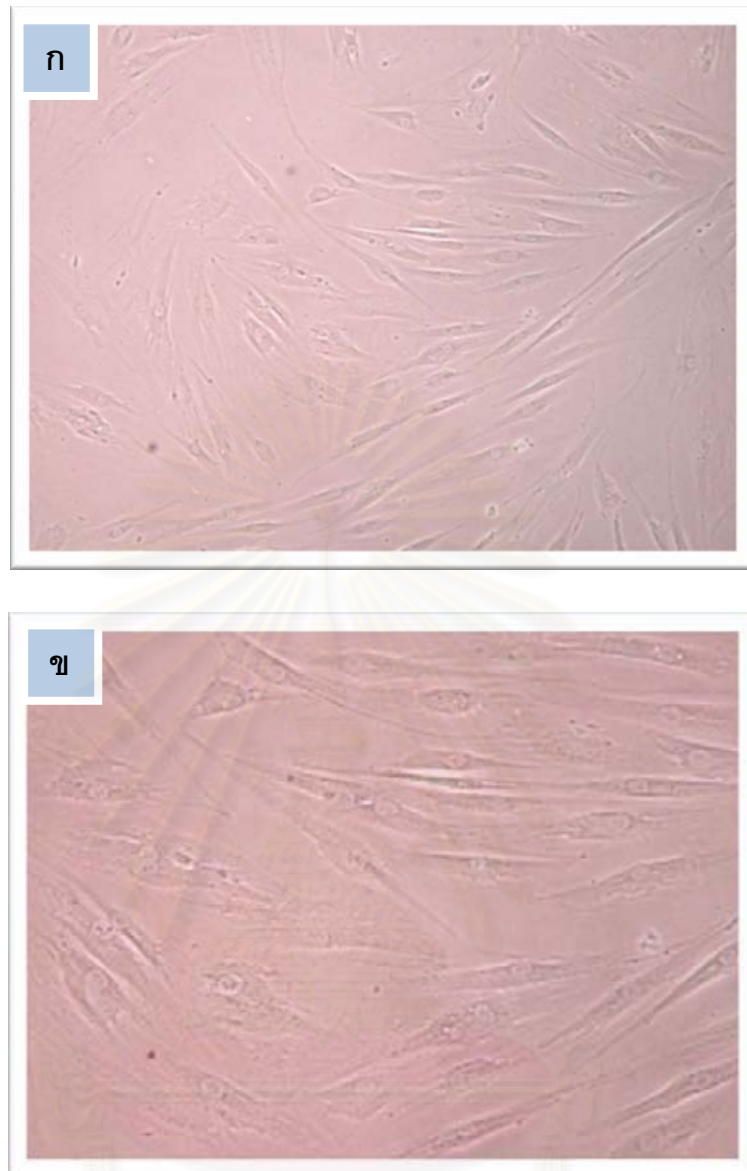
เซลล์ต้นกำเนิดจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ใน  $CO_2$  incubator ซึ่งควบคุมสภาวะที่ อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และ ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 โดยเปลี่ยนอาหารใหม่สัปดาห์ละ 2 ครั้ง เมื่อเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเพาะเลี้ยง จึงทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยแล้วแบ่งเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ใหม่ จาก 1 จานเพาะเลี้ยง แบ่งเป็น 4 จานเพาะเลี้ยง

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.10 เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่จากการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น (Primary culture) ที่กำลังขยาย 200 เท่า  
ก หลังเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน  
ข หลังเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน





รูปที่ 3.11 เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยง Passage ที่ 1

a ที่กำลังขยาย 100 เท่า

b ที่กำลังขยาย 200 เท่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก

การวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก จะดำเนินการวิเคราะห์คุณสมบัติทาง Immunophenotype โดยการวิเคราะห์แอนติเจนบนผิวเซลล์ที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปกติในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มจำนวน สร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์จำนวนเซลล์โดยวิธี MTT assay เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ รวมทั้งการตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดโดยการชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation และ Adipogenic differentiation

#### 3.3.3.2.1 การวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์โดยวิธี Flow cytometry

1. เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ ความหนาแน่น  $1 \times 10^6$  เซลล์/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในสารละลาย Phosphate buffer saline จำนวน 5 หลอดทดลอง สำหรับการวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์ 5 ชนิด
2. เติมแอนติบอดีที่ติดสารเรืองแสง (Fluorochrome-cojugated antibody) ต่อไปนี้ CD29-PE/Cy5, CD44 PE, CD71-PE, CD90-FITC และ CD105-PE แต่ละชนิดลงในสารแขวนลอยเซลล์แต่ละหลอดที่เตรียมไว้ หลอดละ 10 ไมโครลิตร
3. เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. เติมน้ำสารละลาย Phosphate buffer saline ปริมาตร 2 มล. ลงในแต่ละหลอดทดลอง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที
5. ดูดของเหลวใสด้านบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์ด้านล่าง แล้วจึงละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
6. วิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่สารเรืองแสงจากแอนติบอดีแต่ละชนิด โดยเครื่อง Flow cytometry

#### 3.3.3.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ในจานเพาะเลี้ยง 6 หลุม (6-well plate) จำนวน 3 หลุม โดยให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น 3000 เซลล์
2. เพาะเลี้ยงเซลล์ตามกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามขั้นตอนการทดลองที่

#### 3.3.3.1 ข้อ 9

3. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน จึงทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยด้วยเอนไซม์ทริปซิน เพื่อนับจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย Hemacytometer
4. นำเซลล์ทั้งหมดไปเพาะเลี้ยงใหม่ตามข้อที่ 1 ถึง 3 เพื่อนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ตั้งแต่เริ่มต้นเพาะเลี้ยง นาน 5, 10 และ 15 วัน
5. นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและจำนวนเซลล์ แล้วคำนวณหาระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (Doubling time)

### 3.3.3.2.3 การวิเคราะห์จำนวนเซลล์โดยวิธี MTT assay (Rober J. Hay, 2002)

#### 3.3.3.2.3.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนเซลล์

1. นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงหลายหลุม (multiwell culture plate) มาดูดเอาอาหารเพาะเลี้ยงออกจนหมด
2. เติมสารละลาย Phosphate buffer saline ปริมาตร 1 มล. แล้วดูดทิ้งเพื่อล้างอาหารเพาะเลี้ยงที่ติดค้าง
3. เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ในอาหารเพาะเลี้ยง DMEM ที่ปราศจาก Phenol red ปริมาตร 350  $\mu$ l ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปเก็บใน CO2 Incubator เป็นเวลา 30 นาที
4. ดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย DMSO:Glycine buffer อัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 1 มล. ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที
5. ใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อชะล้างสารสีม่วงที่อยู่ในเซลล์ให้ละลายออกมาจนหมด
6. นำสารละลายที่ได้ในแต่ละหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของของจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม (96-well plate)
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย DMSO:Glycine buffer อัตราส่วน 9:1 เป็น Blank
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณจำนวนเซลล์จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐานจำนวนเซลล์โดยวิธี MTT assay

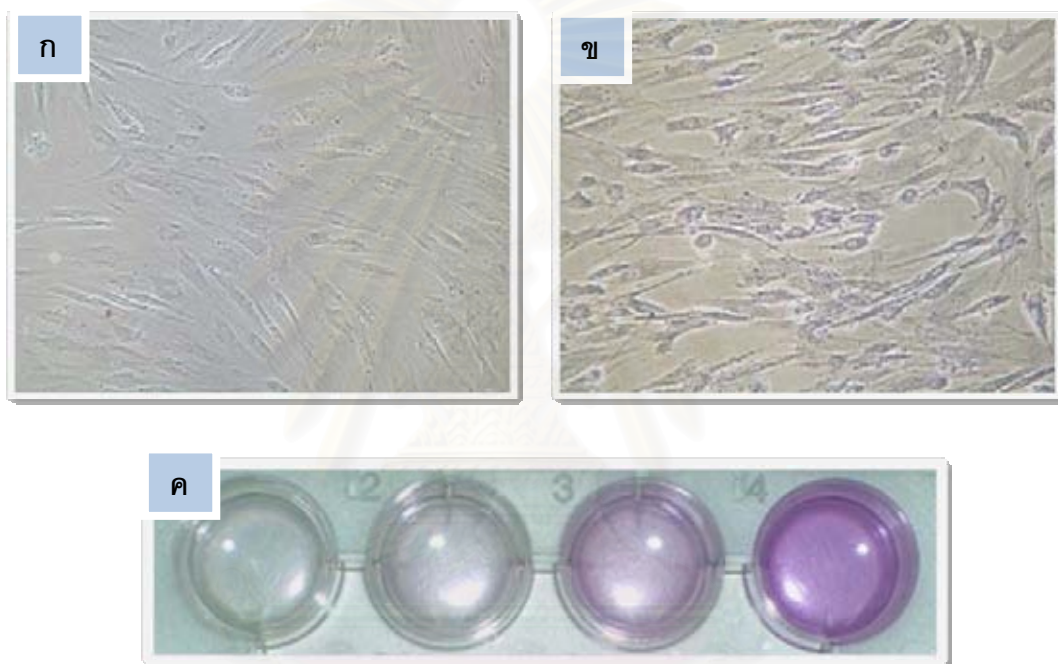
### 3.3.3.2.3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานจำนวนเซลล์

1. เตรียมเซลล์แขวนลอยโดยใช้เอนไซม์ทริปซินแล้วนับความหนาแน่นจำนวนเซลล์โดยใช้ Hemacytometer
2. ใส่สารแขวนลอยเซลล์ในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง 12 หลุม (12-well plate) ให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น 10000, 20000, 40000 และ 80000 เซลล์ จำนวนเซลล์ละ 3 หลุม
3. เติมหอาหารเพาะเลี้ยงหลุมละ 750 ไมโครลิตรแล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เจริญเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงจนหมด
4. วิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ทราบจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมที่เตรียมไว้ โดยวิธี MTT assay
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ เพื่อสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลจากการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่จำนวนต่างๆ โดยวิธี MTT assay

จำนวนเซลล์ (เซลล์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
10000	0.0607	0.0142
20000	0.1150	0.0053
40000	0.1910	0.0098
80000	0.3597	0.0051

วิธี MTT assay เป็นวิธีการหาจำนวนเซลล์โดยการย้อมสีเซลล์ด้วยสาร MTT เดิมลงในตัวอย่างที่ต้องการวัดจำนวนเซลล์ เซลล์ที่มีชีวิตจะนำสาร MTT เข้าสู่ไมโทคอนเดรียและเอนไซม์ Mitochondrial dehydrogenase จะเปลี่ยนสาร MTT ไปเป็นผลิตภัณฑ์ Formazan สีม่วงไม่ละลายน้ำซึ่งอยู่ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตมีสารสีม่วงภายในเซลล์ ดังรูปที่ 3.12 ก (เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ก่อนเติมสาร MTT ยังไม่ติดสีม่วง ดังรูปที่ 3.12 ก) และเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อให้เยื่อภายในเซลล์แตกสารสีม่วงภายในเซลล์จะละลายออกมา โดยความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังรูปที่ 3.12 ค



รูปที่ 3.12

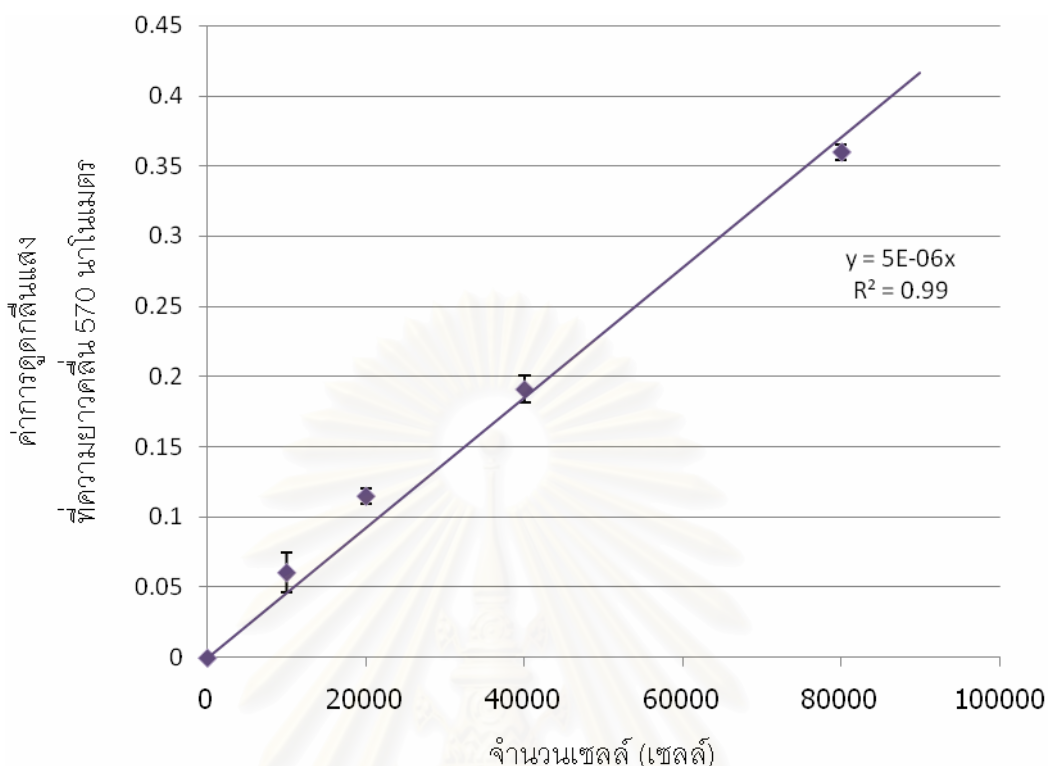
การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดโดยวิธี MTT assay

ก ลักษณะของเซลล์ก่อนเติมสาร MTT

ข ลักษณะของเซลล์หลังเติมสาร MTT

ค ระดับความเข้มของสารละลายสีตามจำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์

10000, 20000, 40000 และ 80000 เซลล์ เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ



รูปที่ 3.13 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์โดยวิธี MTT assay

#### 3.3.3.2.4 การทดสอบการเกิด Osteogenic differentiation

เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในจานเพาะเลี้ยง 12 หลุม (12-well plate) จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นที่ จากนั้นจึงเริ่มชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง DMEM high Glucose ที่ประกอบด้วย

Fetal bovine serum	ร้อยละ 10
Dexamethazone	0.1 ไมโครโมลาร์
□-Glycerol phosphate	10 มิลลิโมลาร์
L-Ascorbic acid	0.2 มิลลิโมลาร์

ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และ การตรวจสอบการสะสมแคลเซียมโดยใช้ O-Cresolphthalein complexone ในวันที่ 0, 7, 14 และ 21

### 3.3.3.2.4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ใช้วิธี p-Nitrophenyl-phosphate assay โดยมีขั้นตอนดังนี้

#### 3.3.3.2.4.2.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. ดูดอาหารเพาะเลี้ยงทิ้ง เติมสารละลาย Phosphate buffer saline แล้วดูดทิ้ง เพื่อชะล้างอาหารเพาะเลี้ยงที่เหลือค้าง
2. เติม Cell lysing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยงหลายหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ไว้และต้องการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase
 

สารละลาย Cell lysing buffer ประกอบด้วย	
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.2 มก./มล.
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	9 มก./มล.
Sodium Citrate	4.4 มก./มล.
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อทำให้เซลล์แตกกลมกลืนกับสารละลาย
5. เติมสารละลายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในสารละลาย p-Nitrophenyl phosphate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรณีของ Blank ให้ใช้น้ำบริสุทธิ์แทนสารละลายเซลล์
6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
7. นำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์จากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ p-Nitrophenol

### 3.3.3.2.4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol

1. เตรียมสารละลาย p-Nitrophenol ความเข้มข้นเป็นลำดับดังนี้ 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 และ 0.078125 มิลลิโมลาร์
2. เติมสารละลาย p-Nitrophenol ที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในสารละลาย p-Nitrophenyl phosphate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรณีของ Blank ให้ใช้น้ำบริสุทธิ์แทนสารละลายเซลล์
3. เติมสารละลายไซโตเคอไมโครออกไซด์ความเข้มข้น ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
4. นำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลาย p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปสร้างกราฟเพื่อหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย p-Nitrophenol

จากการสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย p-Nitrophenol และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ได้ข้อมูลดังตารางที่ 3.3 ซึ่งสามารถนำมาสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 3.14

$$\begin{aligned} & \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร} \\ & = 0.988 \times \text{ความเข้มข้นของสารละลาย p-Nitrophenol (มิลลิโมลาร์)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{หรือ } & \text{ความเข้มข้นของสารละลาย p-Nitrophenol (มิลลิโมลาร์)} \\ & = 1.011 \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร} \end{aligned}$$

เนื่องจากสารละลายเซลล์ที่นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ใน 1 หลุมเพาะเลี้ยง มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร และใช้เวลาในการวัดปฏิกิริยานาน 15 นาที ดังนั้นจึงสามารถคำนวณปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ได้จากสมการต่อไปนี้

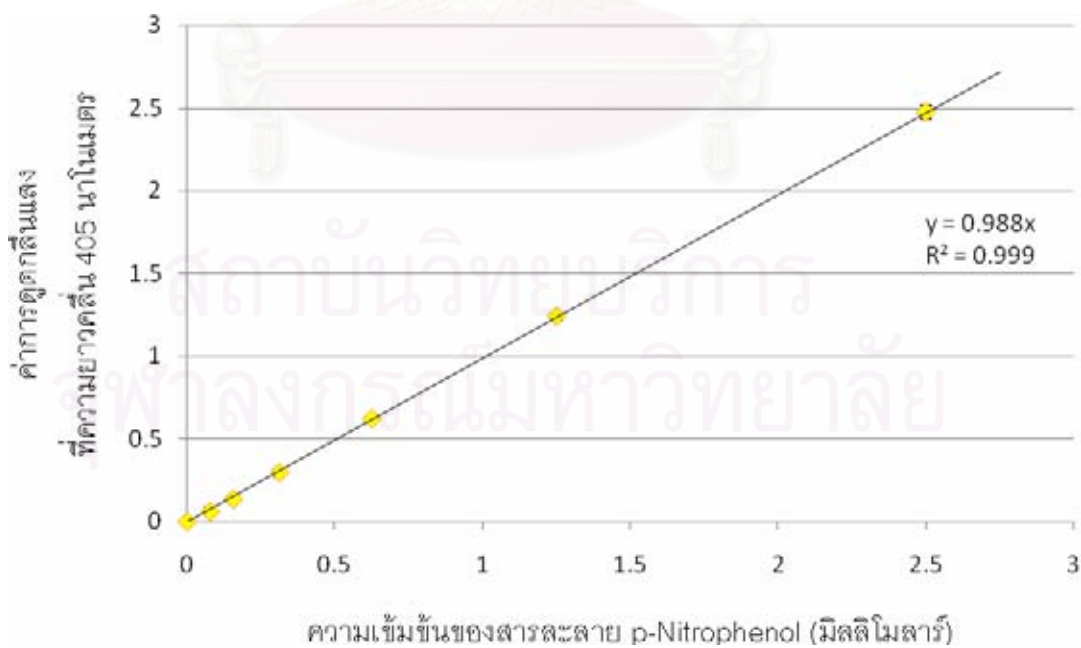


กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (พิโคโมล/นาที/เซลล์)

$$= \frac{13480 \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร}}{\text{จำนวนเซลล์}}$$

ตารางที่ 3.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรของสารละลาย p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย p-Nitrophenol (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0.0781	0.0603	0.0227
0.1562	0.1360	0.0217
0.3125	0.2967	0.0200
0.6250	0.6217	0.0154
1.2500	1.2400	0.0184
2.5000	2.4727	0.0407



รูปที่ 3.14 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย p-Nitrophenol และค่าการดูดกลืนแสง

### 3.3.3.2.4.3 การวิเคราะห์การสะสมแคลเซียม

#### 3.3.3.2.4.3.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม

1. เตรียมสารละลาย o-Cresolphthalein complexone (ในสารละลายปริมาตร 50 มล. ประกอบด้วย O-cresolphthalein complexone 2 มก. , สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 38 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ DMSO ปริมาตร 5 มล.) และสารละลาย Ethanolamine ความเข้มข้นร้อยละ 4
2. ผสมสารละลาย o-Cresolphthalein complexone และสารละลาย Ethanolamine อย่างละ 500 ไมโครลิตรเข้าด้วยกัน
3. เติมตัวอย่างสารที่ต้องการวัดปริมาณแคลเซียมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ กรณีของ Blank ใช้น้ำบริสุทธิ์แทนสารที่ต้องการวัดปริมาณแคลเซียม
4. ผสมสารให้เข้ากันแล้วดูตัวอย่างสารที่ได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาความเข้มข้นของแคลเซียมในสารละลายตัวอย่างจากสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

#### 3.3.3.2.4.3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานปริมาณแคลเซียม

1. เตรียมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) ในน้ำบริสุทธิ์ความเข้มข้นเป็นลำดับดังนี้ 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625 มิลลิโมลาร์
2. ผสมสารละลาย o-Cresolphthalein complexone และสารละลาย Ethanolamine อย่างละ 500 ไมโครลิตรเข้าด้วยกัน
3. เติมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตที่ทราบความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ กรณีของ Blank ใช้น้ำบริสุทธิ์แทนสารที่ต้องการวัดปริมาณแคลเซียม

4. ผสมสารให้เข้ากันแล้วดูดตัวอย่างสารที่ได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader
5. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตในแต่ละความเข้มข้น ไปสร้างกราฟและหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมกับค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 3.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรของสารละลายแคลเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของแคลเซียม (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
0.3906	0.0467	0.0466
0.7812	0.1047	0.0021
1.5625	0.2200	0.0067
3.1250	0.4757	0.0080

จากการสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ได้ข้อมูลดังตารางที่ 3.4 ซึ่งสามารถนำมาสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 3.15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียม และค่าการดูดกลืนแสง สามารถแสดงเป็นสมการได้ดังต่อไปนี้

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

$$= 0.148 \times \text{ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียม (มิลลิโมลาร์)}$$

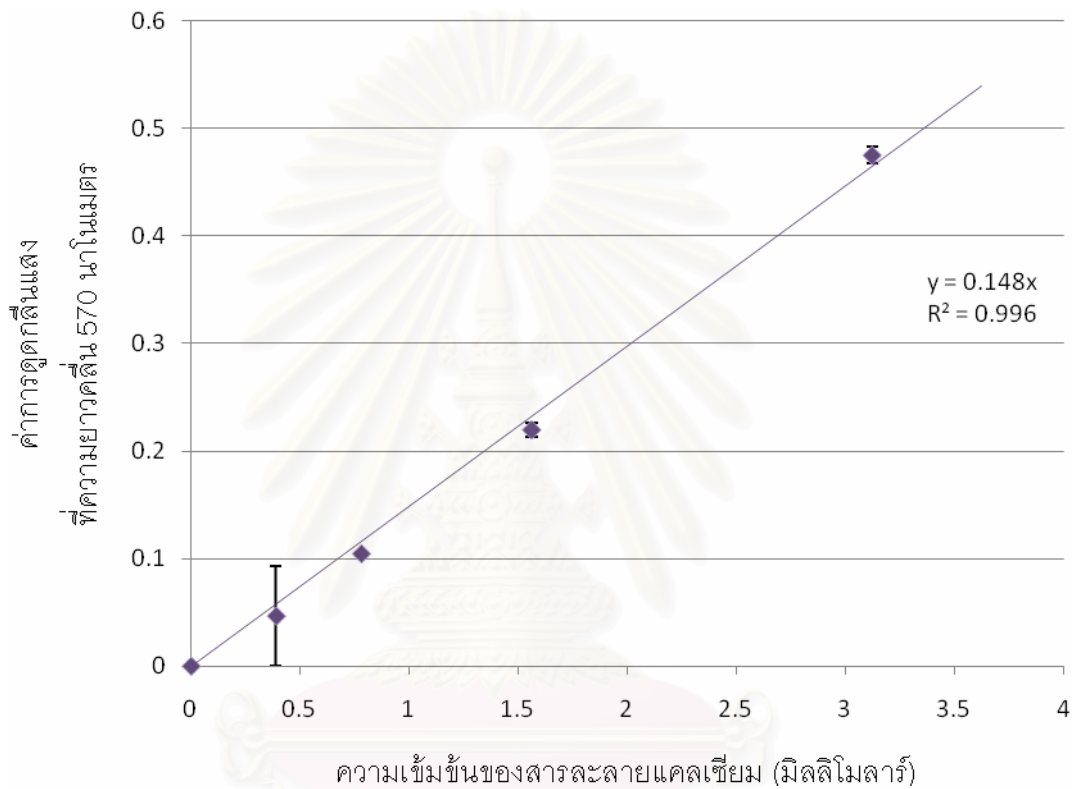
หรือ ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียม (มิลลิโมลาร์)

$$= 6.707 \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร}$$

เนื่องจากสารละลายเซลล์ที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมใน 1 หลุมเพาะเลี้ยงมีปริมาตร 400 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงสามารถคำนวณปริมาณการสะสมแคลเซียมได้จากสมการต่อไปนี้

ปริมาณการสะสมแคลเซียม (พิโคโมล/เซลล์)

$$= \frac{2682800 \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร}}{\text{จำนวนเซลล์}}$$



รูปที่ 3.15 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมและค่าการดูดกลืนแสง

### 3.3.3.2.5 การทดสอบการเกิด Adipogenic differentiation

เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในจานเพาะเลี้ยง 12 หลุม (12-well plate) จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นที่ จากนั้นจึงเริ่มชักนำให้เกิด Adipogenic differentiation โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง DMEM high Glucose ที่ประกอบด้วย Fetal bovine serum ร้อยละ 10, Insulin 10 ไมโครกรัม/มล. , 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 0.5 มิลลิโมลาร์ และ Indomethacin 0.1 มิลลิโมลาร์ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโดยการย้อม Lipid granules ภายในเซลล์โดยวิธี Oil red O stain ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมาดูดอาหารเพาะเลี้ยงทิ้ง แล้วล้างด้วย Phosphate buffer saline เพื่อชะล้างอาหารที่ตกค้าง
2. เติมสารละลาย Paraformaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดทิ้ง
3. ล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์เพื่อชะล้างสารละลาย Paraformaldehyde ที่ตกค้าง
4. เติมสารละลาย Oil red O ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้วดูดทิ้ง
5. ล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์เพื่อชะล้างสารละลาย Oil red O ที่ตกค้าง
6. ตรวจสอบดูการย้อมติดสี Oil red O ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.3.4 การวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิดในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

#### 3.3.4.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร โดยเปรียบเทียบกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ใช้เป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. หนา 2 มม. หลังจากนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงใน CO<sub>2</sub> incubator โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนตามปกติ เก็บตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรละ 3 ชิ้นในแต่ละช่วงเวลาการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ หลังเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 4, 7, 11 และ 14 วัน มาวัดจำนวนเซลล์โดยวิธี MTT method ตามวิธีการวัดจำนวนเซลล์ในวิธีการทดลองที่ 3.2.3.1

##### 3.3.4.1.1 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ก่อนนำเซลล์เข้าสู่ภายใน

1. นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มาแช่ในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง
2. ล้างโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline 3 ครั้ง
3. นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มาแช่ในสารละลาย Phosphate buffer saline แล้วเก็บไว้ใน CO<sub>2</sub> Incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มาแช่ในอาหารเพาะเลี้ยงแล้วเก็บไว้ใน CO<sub>2</sub> Incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

##### 3.3.4.1.2 การนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

1. นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เตรียมไว้แต่ละชิ้นใส่ลงในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง 48 หลุม (48-well plate)
2. เติมสารแขวนลอยเซลล์ความหนาแน่น  $1 \times 10^5$  เซลล์/มล. หลุมละ 250  $\mu$ l (25,000 เซลล์/1ชิ้น โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์)
3. นำจานเพาะเลี้ยง 48 หลุมที่มีโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในสารแขวนลอยเซลล์ ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวราบ (Horizontal shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ใน CO<sub>2</sub> Incubator
4. ย้ายโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละชิ้นที่ผ่านการนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้ว ใส่ในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง 48 หลุมอันใหม่

5. เติมหอาหารหลุมละ 750  $\mu$ l แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน CO<sub>2</sub> Incubator โดยเปลี่ยนอาหารสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

### 3.3.4.2 การวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

วิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร โดยเปรียบเทียบกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ใช้เป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม.หนา 2 มม.

การทดลองแบ่งเป็น 4 ชุด ได้แก่

1. ชุดทดลอง เป็นชุดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์ เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation
2. ชุดควบคุม เป็นชุดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์ เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนตามปกติ
3. ชุด Blank สำหรับชุดทดลอง เป็นชุดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์ เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิด Osteogenic differentiation
4. ชุด Blank สำหรับชุดควบคุม เป็นชุดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์ เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนตามปกติ

หลังจากนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ตามวิธีการทดลองที่ 4.1.2 แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงใน CO<sub>2</sub> incubator โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงให้ตรงกับแต่ละชุดทดลอง เก็บตัวอย่างโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในแต่ละชุดทดลอง สูตรละ 3 ชิ้น ในแต่ละช่วงเวลาการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง หลังเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ตามวิธีการทดลองที่ 3.2.4.2.1 และการตรวจสอบการสะสมแคลเซียมตามวิธีการทดลองที่ 3.2.4.3.1

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนังและการวิเคราะห์องค์ประกอบ

##### 4.1.1 การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง

ตัวอย่างผิวหนังเมื่อเตรียมเป็นสารละลายและทำการแยกเป็นสารสกัดจากผิวหนัง 3 ชนิด ได้แก่ DE-1, DE-2 และ DE-3 ลักษณะของสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรมีลักษณะข้น สีค่อนข้างขาวและเหนียว แต่แต่ละสูตรต่างกันเล็กน้อย นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้เตรียมสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I Collagen) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบเปรียบเทียบในการทดลองด้วย โดยใช้คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากบริษัท Sigma-Aldrich corporation เนื่องจากเป็นคอลลาเจนที่นิยมใช้ในการเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ลักษณะของสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เตรียมได้มีลักษณะเหนียวหนืดเกาะกันเป็นก้อน ใสไม่มีสี ใสกว่าสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตร ลักษณะของสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตรและสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 แสดงดังรูปที่ 3.4

เมื่อนำสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตร ไปทำการหาน้ำหนักแห้งเพื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นของเนื้อสารในสารสกัด ได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.1 สารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3 ซึ่งมีลักษณะข้นและเหนียวมากที่สุด มีความหนาแน่นเป็น  $30.8030 \pm 0.2414$  มก./น้ำหนักแห้ง/มล. เป็นสารสกัดที่มีความหนาแน่นของเนื้อสารมากที่สุดและมากกว่า DE-1 และ DE-2 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) สำหรับสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 และสูตร DE-2 มีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน คือ  $9.1991 \pm 0.4181$  และ  $8.9203 \pm 0.2414$  มก./น้ำหนักแห้ง/มล. ตามลำดับ โดยความหนาแน่นของเนื้อสารในสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 และ DE-2 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.1 ความหนาแน่นของสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตร

สารสกัดจากผิวหนัง	ความหนาแน่น (มก./น้ำหนักแห้ง/มล.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
สูตร DE-1	9.1991	0.4181
สูตร DE-2	8.9203	0.2414
สูตร DE-3	30.8030	0.2414



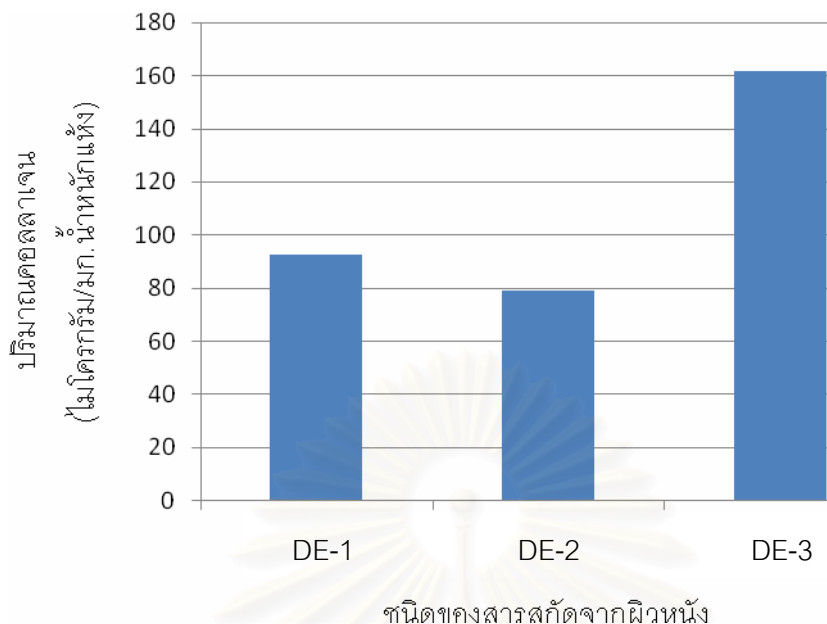
#### 4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ ECM ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร

##### 4.1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

จากการวิเคราะห์ปริมาณของ Hydroxyproline แล้วเทียบเป็นปริมาณคอลลาเจน (Collagen) ตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนของ AOAC official method 990.26 ได้ ข้อมูลปริมาณคอลลาเจนในหน่วย ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักเปียก ดังตารางที่ 4.2 และจากข้อมูล ความหนาแน่นของเนื้อสารในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรในตารางที่ 4.1 สามารถคำนวณ ปริมาณคอลลาเจนในหน่วย มก./ก. น้ำหนักแห้ง ได้ดังตารางที่ 4.2 และแสดงเป็นกราฟแท่งได้ดังรูป ที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์พบว่า สารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3 มีปริมาณคอลลาเจนเป็น องค์ประกอบมากที่สุด (161.6823 ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง) ซึ่งมีปริมาณคอลลาเจนสูงกว่าสาร สกัดจากผิวหนังอีก 2 สูตรมาก ปริมาณคอลลาเจนในสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 มีปริมาณ ใกล้เคียงกับในสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 โดยปริมาณคอลลาเจนใน DE-1 สูงกว่าใน DE-2 เล็กน้อย (ปริมาณคอลลาเจนในสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 และ DE-2 มีปริมาณเป็น 92.2264 และ 79.0668 ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณคอลลาเจนในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร

สารสกัดจากผิวหนัง	ปริมาณคอลลาเจน	
	ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักเปียก	ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง
สูตร DE-1	0.8484	92.2264
สูตร DE-2	0.7053	79.0668
สูตร DE-3	4.9803	161.6823



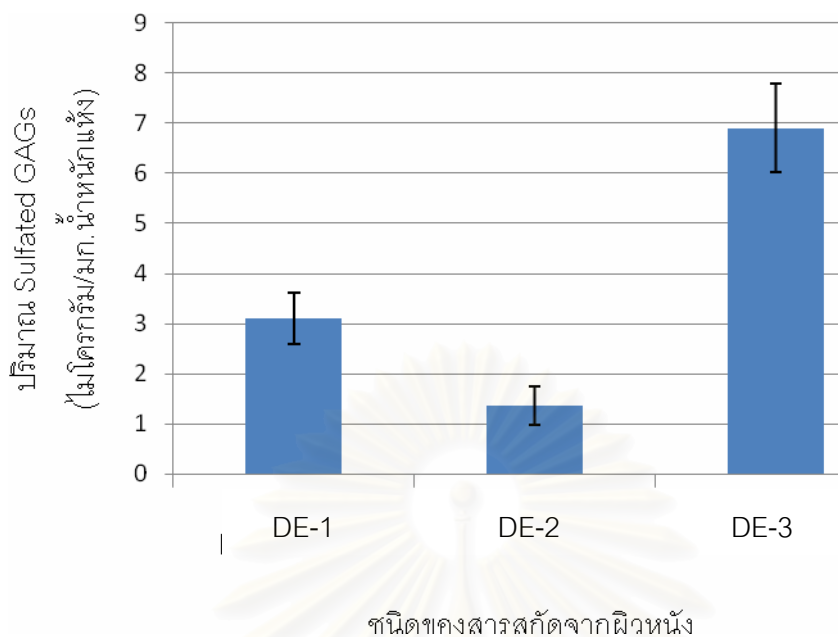
รูปที่ 4.1 กราฟแท่งแสดงปริมาณคอลลาเจนในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร

#### 4.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated Glycosaminoglycans

จากการวิเคราะห์ปริมาณ Sulfated GAGs ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรโดยวิธี Dimethylmethylene Blue assay เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ที่วัดได้จากสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรมาคำนวณหาปริมาณ Sulfated GAGs จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Sulfated GAGs และค่าการดูดกลืนแสง ที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน พบว่าปริมาณ Sulfated GAGs ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรเป็นดังข้อมูลในตารางที่ 4.3 ซึ่งสามารถแสดงเป็นกราฟแท่งได้ดังรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ Sulfated GAGs ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร

สารสกัดจากผิวหนัง	ปริมาณ Sulfated GAGs (ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
สูตร DE-1	3.0986	0.5124
สูตร DE-2	1.3556	0.3873
สูตร DE-3	6.9073	0.8733



รูปที่ 4.2 กราฟแท่งแสดงปริมาณ Sulfated GAGs ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร

สารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3 มีปริมาณ Sulfated GAGs เป็นองค์ประกอบมากที่สุด ( $6.9073 \pm 0.8733$  ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง) รองลงมาคือ DE-1 ( $3.0986 \pm 0.5124$  ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง) และ DE-2 มีปริมาณ Sulfate GAGs น้อยที่สุด ( $1.3556 \pm 0.3873$  ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง) โดยสารสกัดจากผิวหนังทุกสูตรมีปริมาณ Sulfated GAGs แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของ ECM ในสารสกัดจากผิวหนังที่ได้กับปริมาณองค์ประกอบของ ECM ที่พบในผิวหนังชั้นหนังแท้ (จากข้อมูลในตารางที่ 2.2) พบว่าปริมาณคอลลาเจนในเนื้อสารของสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 มีปริมาณต่ำกว่าที่พบในผิวหนัง (ผิวหนังประกอบด้วยคอลลาเจน  $598.50$  ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง) โดยมีปริมาณต่ำกว่าเป็น  $6.5$  เท่า,  $7.5$  เท่า และ  $3.7$  เท่า ตามลำดับ สำหรับปริมาณ Sulfated GAGs เมื่อเปรียบเทียบกับในผิวหนังซึ่งประกอบด้วย GAGs ทั้งหมด  $5.05$  ไมโครกรัม/มก. น้ำหนักแห้ง พบว่าในสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 มีปริมาณ Sulfated GAGs ใกล้เคียงกับที่พบในผิวหนัง ในขณะที่ DE-2 มีปริมาณ Sulfated GAGs ต่ำกว่า และ DE-3 มีปริมาณ Sulfated GAGs สูงกว่าที่พบในผิวหนัง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในกระบวนการปั่นเหวี่ยงเพื่อเตรียมสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 และ DE-3 โมเลกุลของ Sulfated GAGs เกิดการตกตะกอนจากส่วนบนซึ่งเป็น DE-2 ไปอยู่ในส่วนล่างซึ่งเป็นส่วนของ DE-3 แทน

ตารางที่ 4.4 ปริมาณองค์ประกอบและสัดส่วนของ Sulfated GAGs และคอลลาเจน ที่พบใน สารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร

สารสกัดจาก ผิวหนัง	ปริมาณองค์ประกอบของ ECM (ไมโครกรัม/มก.น้ำหนักแห้ง)		สัดส่วนของ Sulfated GAGs และคอลลาเจน (ร้อยละ)
	Sulfated GAGs	คอลลาเจน	
สูตร DE-1	3.0986	92.2264	3.36
สูตร DE-2	1.3556	79.0668	1.71
สูตร DE-3	6.9073	161.6823	4.27

จากข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนและ Sulfated GAGs ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร ดังตารางที่ 4.4 พบว่า สัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจน ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรมีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ DE-3 มีสัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจนสูงสุดคือ ร้อยละ 4.27 รองลงมาคือ DE-1 (ร้อยละ 3.36) และ น้อยที่สุดคือ DE-2 (ร้อยละ 1.71) ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของเนื้อสารในสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 และ DE-2 จะใกล้เคียงกัน (9.1991 และ 8.9203 มก.น้ำหนักแห้ง/มล. ตามลำดับ) แต่สัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจน ใน DE-1 สูงกว่าใน DE-2 ถึง 2 เท่าโดยประมาณ ในขณะที่ DE-3 ซึ่งมีความเข้มข้นของเนื้อสารมากที่สุด (30.8030 มก.น้ำหนักแห้ง/มล.) ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นของเนื้อสารใน DE-1 ประมาณ 3 เท่า แต่มีสัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจนใกล้เคียงกับใน DE-1 (DE-3 มีสัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจน เป็น 1.27 เท่า โดยประมาณ) ดังนั้นสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3 ซึ่งเป็นสารสกัดจากผิวหนังที่มีความเข้มข้นของเนื้อสารในสารสกัดมากที่สุด แต่มีสัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจนใกล้เคียงกับใน DE-1 สารสกัดสูตร DE-3 จึงเปรียบเสมือนเป็นสารสกัดสูตร DE-1 ที่เข้มข้นขึ้น ในขณะที่ DE-2 และ DE-1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเนื้อสารใกล้เคียงกันแต่มีสัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจน ต่างกันมาก ดังนั้นสารสกัดสูตร DE-2 จึงเปรียบเสมือนเป็นสารสกัดสูตร DE-1 ที่มีสัดส่วนของ Sulfated GAGs ต่อคอลลาเจนน้อยกว่าเป็น 2 เท่า จากข้อมูลองค์ประกอบของ ECM ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรที่ได้มานี้จะถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ได้ต่อไป

## 4.2 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และการวิเคราะห์คุณสมบัติ

### 4.2.1 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากวัตถุดิบแต่ละชนิดที่ได้จากการเตรียมในแม่แบบขึ้นรูป จะมีลักษณะเป็นแผ่นสี่เหลี่ยม หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร ในการนำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ไปทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกจะเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แบบวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เตรียมได้โดยการใช้ Biopsy punch ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แบบวงกลมที่ได้ แสดงได้ดังรูปที่ 3.8

### 4.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

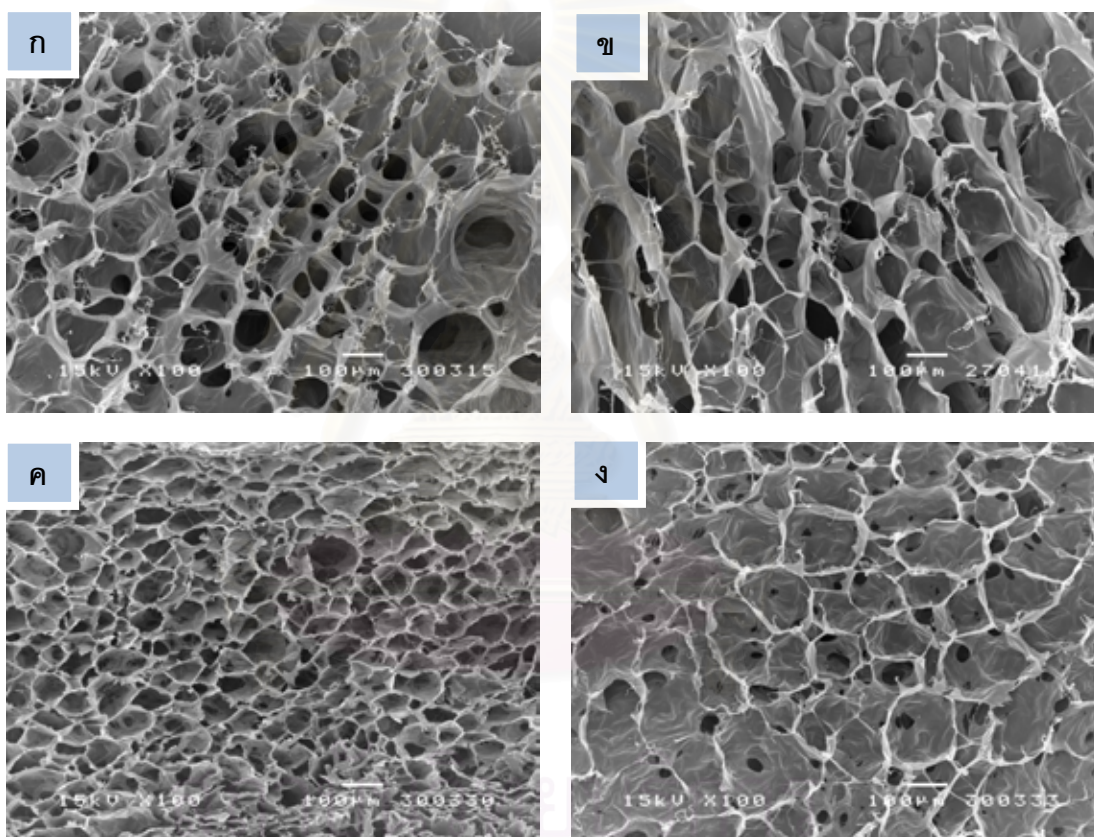
โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สุนัข (DE-1, DE-2 และ DE-3) และจากสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เตรียมได้ จะถูกนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ โดยการวิเคราะห์รูพรุนที่เกิดขึ้นในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ วิเคราะห์คุณสมบัติทางกลจากความต้านทานแรงกด และศึกษาอัตราการย่อยสลายโดยเอนไซม์ Collagenase type I

#### 4.2.2.1 การวิเคราะห์รูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

ลักษณะรูพรุนของโครงเนื้อเยื่อที่เตรียมจากวัตถุดิบแต่ละชนิด วิเคราะห์จากภาพที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ชื่อการค้า JEOL รุ่น JSM-5410LV แสดงได้ดังรูปที่ 4.3 จากลักษณะที่ปรากฏ พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เตรียมได้ทุกสุนักรูพรุนที่มีความต่อเนื่อง (Interconnected pore) ดังนั้นเมื่อมีการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้ามาในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ เซลล์จะสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างต่อเนื่องทั่วทั้งโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์และสามารถเกิดการถ่ายเทของสารได้ต่อเนื่อง ขนาดของรูพรุน (Pore size) ของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Image J โดยวิเคราะห์จากเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่ปรากฏในภาพจำนวน 50 รูพรุน แล้วคำนวณขนาดของรูพรุนโดยเฉลี่ย ผลการวิเคราะห์ขนาดของรูพรุน ได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ขนาดรูปทรงของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละชนิด

ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	ขนาดของรูปทรง (ไมโครเมตร)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
DE-1	145.6845	46.8591
DE-2	142.5356	45.3861
DE-3	97.8116	21.9892
คอลลาเจนชนิดที่ 1	188.8419	35.4062



รูปที่ 4.3 ลักษณะรูปทรงทางด้านข้างของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ จากการวิเคราะห์โดย SEM

ก โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1

ข โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-2

ค โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-3

ง โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร คอลลาเจนชนิดที่ 1

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรมีขนาดของรูพรุนแตกต่างกันดังตารางที่ 4.6 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยใหญ่ที่สุด ( $188.84 \pm 35.41$  ไมโครเมตร) ซึ่งใหญ่กว่าขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 และ DE-2 ซึ่งมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยรองลงมาและมีใกล้เคียงกัน คือ  $145.68 \pm 46.86$  และ  $142.54 \pm 45.39$  ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ สำหรับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-3 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเล็กที่สุด ( $97.81 \pm 21.99$  ไมโครเมตร) ซึ่งเล็กกว่าขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เนื่องจากกระบวนการขึ้นรูปเพื่อเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรในงานวิจัยนี้ ใช้กระบวนการเดียวกันและขึ้นรูปพร้อมกัน ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของรูพรุนจึงเกิดจากชนิดของวัสดุดิบและความเข้มข้นของวัสดุดิบในสารละลาย สารสกัดจากผิวหนังกุ้ง 3 สูตรเตรียมได้จากวัสดุดิบชนิดเดียวกัน ดังนั้นคุณสมบัติของวัสดุดิบจึงมีความใกล้เคียงกัน แต่สารสกัดจากผิวหนังกุ้งแต่ละสูตรมีความเข้มข้นของเนื้อสารต่างกัน สารสกัดจากผิวหนังกุ้ง DE-1 และ DE-2 มีความหนาแน่นของเนื้อสารในสารสกัดใกล้เคียงกัน ดังนั้นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เตรียมได้จากสารสกัดจากผิวหนังกุ้ง 2 สูตรนี้ จึงมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สารสกัดจากผิวหนังกุ้ง DE-3 มีความหนาแน่นของเนื้อสารมากดังนั้นเมื่อเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จึงมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเล็กกว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เตรียมจากสารสกัดจากผิวหนังกุ้ง DE-1 และ DE-2

#### 4.2.2.2 การวิเคราะห์ความต้านทานแรงกด

การวิเคราะห์ความต้านทานแรงกดของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แสดงผลในรูปแบบของค่า Compressive modulus ได้ผลดังตารางที่ 4.6 ความต้านทานแรงกดของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1, DE-2, DE-3 และคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีค่า Compressive modulus เป็น  $88.72 \pm 27.61$ ,  $84.30 \pm 21.62$ ,  $147.54 \pm 11.07$  และ  $56.32 \pm 16.98$  ตามลำดับ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-3 มีความต้านทานแรงกดสูงที่สุดและสูงกว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1, DE-2 และคอลลาเจนชนิดที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1, DE-2 และคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีความต้านทานแรงกดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.6 ค่า Compressive modulus ของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตร

ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	Compressive Modulus (กิโลปาสคาล)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
DE-1	88.72	27.61
DE-2	84.30	21.62
DE-3	147.54	11.07
คอลลาเจนชนิดที่ 1	56.32	16.98

#### 4.2.2.3 การวิเคราะห์การย่อยสลายของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยเอนไซม์

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เตรียมจากวัตถุดิบแต่ละชนิดนำมาวิเคราะห์การย่อยสลายโดยเอนไซม์โดยเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ขนาด ขนาดกว้าง 1 ซม. ยาว 1 ซม. และหนา 0.2 ซม. ซึ่งนำหนักแห้งเริ่มต้น แล้วนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Collagenase type I เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์น้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 4.7 และสามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการย่อยโดยเอนไซม์และร้อยละของน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น ได้ดังรูปที่ 4.4

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรมีอัตราการย่อยสลายโดยเอนไซม์ Collagenase type I ในอัตราที่ต่างกัน สมการความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการย่อยโดยเอนไซม์และร้อยละของน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น แสดงในรูปที่ 4.4 จากสมการดังกล่าวสามารถคำนวณระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายจนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีน้ำหนักลดลงจนเหลือร้อยละ 50 ของน้ำหนักเริ่มต้น ได้ดังตารางที่ 4.8



ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อย่อยสลายโดยเอนไซม์ Collagenase type I ที่ระยะเวลาต่างๆ

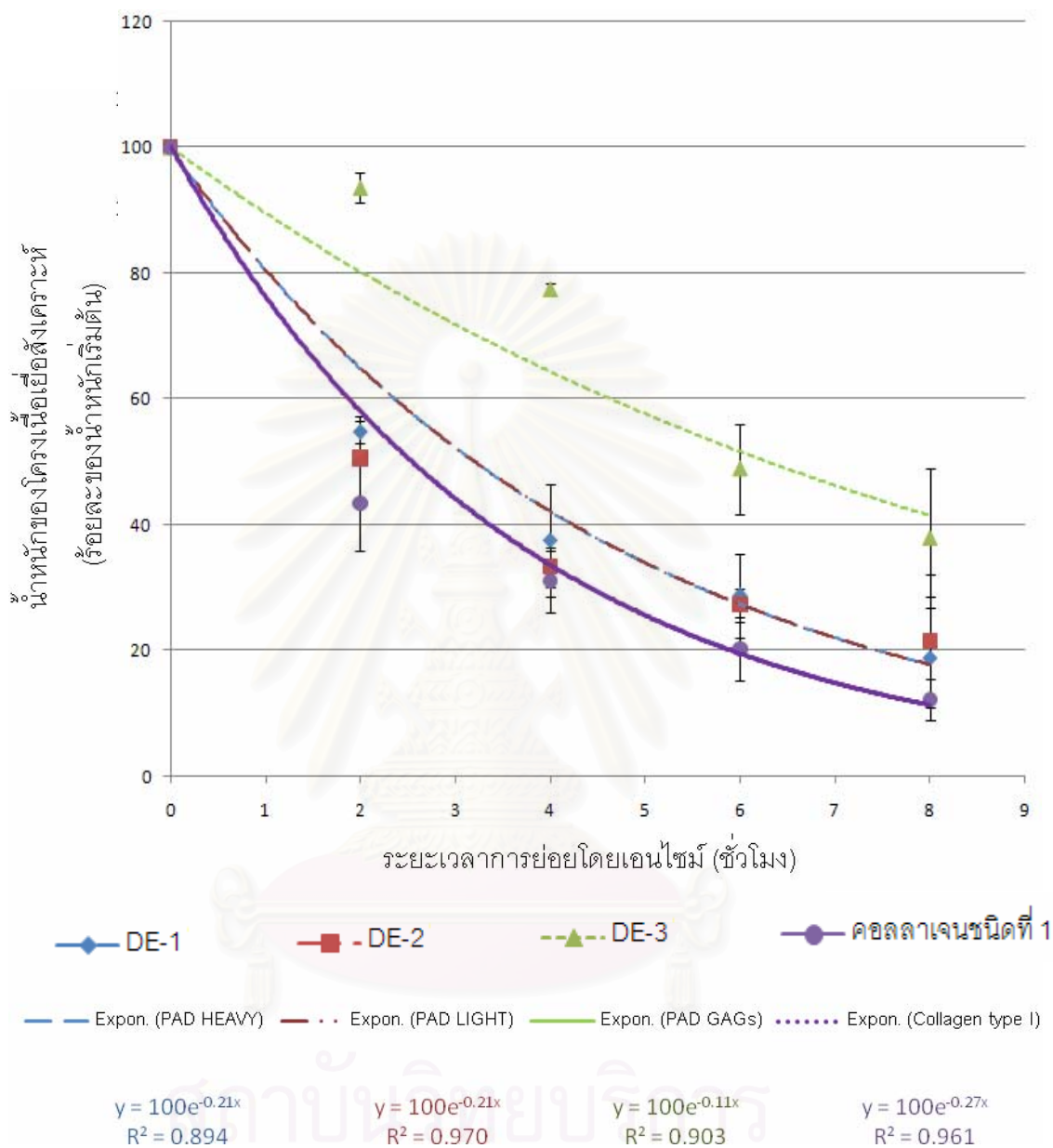
ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	น้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ (ร้อยละของน้ำหนักเริ่มต้น) เมื่อใช้ระยะเวลาการย่อยสลายโดยเอนไซม์				
	0 วัน	2 วัน	4 วัน	6 วัน	8 วัน
DE-1	100	54.78 ±1.79	37.48 ±8.96	28.68 ±6.72	18.73 ±9.83
DE-2	100	50.51 ±6.72	33.23 ±3.18	27.16 ±2.57	21.45 ±10.60
DE-3	100	93.57 ±2.49	77.45 ±0.98	48.89 ±7.16	37.82 ±11.11
คอลลาเจนชนิดที่ 1	100	43.37 ±7.60	31.01 ±4.93	20.25 ±4.93	12.16 ±3.28

ตารางที่ 4.8 ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายจนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีน้ำหนักลดลงจนเหลือร้อยละ 50 ของน้ำหนักเริ่มต้น

ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	ระยะเวลาการย่อยสลายจนน้ำหนักเหลือร้อยละ 50
DE-1	3.30
DE-2	3.30
DE-3	6.30
คอลลาเจนชนิดที่ 1	2.57

อัตราเร็วในการย่อยสลายโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรสามารถพิจารณาได้จากระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายจนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีน้ำหนักลดลงจนเหลือร้อยละ 50 ของน้ำหนักเริ่มต้น (ตารางที่ 4.8) โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีอัตราการย่อย

สลายเร็วที่สุด โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 และ DE-2 มีอัตราเร็วในการย่อยสลายเท่ากัน และโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีอัตราเร็วในการย่อยสลายช้าที่สุด



รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการย่อยโดยเอนไซม์และร้อยละของน้ำหนักของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น

### 4.3 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและการวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์

#### 4.3.1 การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมนุษย์

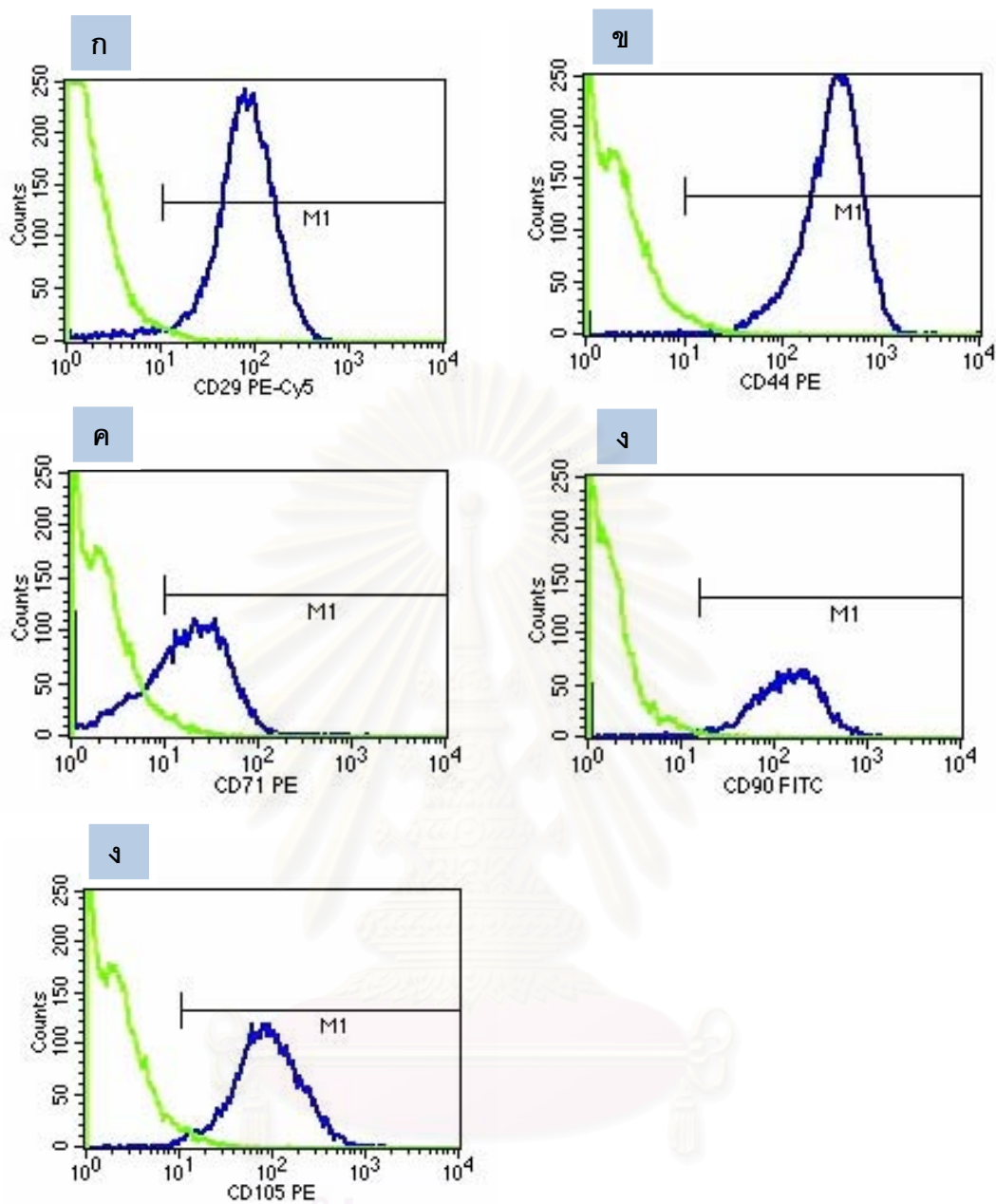
ตัวอย่างไขกระดูกที่ได้ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดมีเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมาก เมื่อนำไขกระดูกที่ได้มาคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อเริ่มต้นเพาะเลี้ยงยังคงมีเซลล์เม็ดเลือดแดงปนอยู่ค่อนข้างมาก แต่หลังเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ เซลล์ต้นกำเนิดเกาะพื้นภาชนะเพาะเลี้ยงแล้วจึงเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงชุดใหม่แทน เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนมาจึงหมดไป หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เซลล์ต้นกำเนิดจะเจริญเติบโตหนาแน่น ซึ่งจะทำการแบ่งเซลล์ไปเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงจำนวนเพิ่มขึ้น ในการทดลอง 4.3 ทั้งหมดจะใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก Passage ที่ 2 และในการทดลอง 4.4 ทั้งหมดจะใช้เซลล์ Passage ที่ 4 เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีจำนวน Passage ใกล้เคียงกันดังนั้นคุณสมบัติของเซลล์จึงยังคงไม่แตกต่างกัน

#### 4.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก

เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่คัดแยกได้หลังจากเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนได้มากพอจะถูกนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ การวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์ที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และ การวิเคราะห์ความสามารถในการเกิด Differentiation ซึ่งในโครงการวิจัยได้ทำการทดสอบการเกิด Osteogenic differentiation และ Adipogenic differentiation นอกจากนี้ยังได้ทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ในการเจริญเติบโตจากการวัดอัตราการเจริญเติบโต และทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์โดยวิธี MTT assay เพื่อได้ข้อมูลสำหรับนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

##### 4.3.2.1 การวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์โดยวิธี Flow cytometry

ผลการวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์แสดงดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.9 จากการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD29, CD44, CD90 และ CD105 ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ปรากฏบนเซลล์ต้นกำเนิด พบว่ามีเซลล์ที่ปรากฏแอนติเจนเหล่านี้ร้อยละ 96.33, 98.06, 97.49 และ 97.71 ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงว่าเซลล์ที่คัดแยกได้จากไขกระดูกมากกว่าร้อยละ 95 เป็นเซลล์ต้นกำเนิด นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD71 ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ปรากฏบนเซลล์ที่มีการแบ่งตัว พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD71 ร้อยละ 68.40 แสดงว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงประมาณร้อยละ 68.40 เป็นเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์อยู่



รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก  
 โดยวิธี Flow cytometry  
 (เส้นสีเขียว แสดงผลการวิเคราะห์เซลล์ที่ไม่ยอมแอนติบอดีที่ติดสารเรืองแสง ,  
 เส้นสีน้ำเงิน แสดงผลการวิเคราะห์เซลล์ที่ยอมแอนติบอดีที่ติดสารเรืองแสง)  
 ก ผลการวิเคราะห์เซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD29  
 ข ผลการวิเคราะห์เซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD44  
 ค ผลการวิเคราะห์เซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD44  
 ง ผลการวิเคราะห์เซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD90  
 จ ผลการวิเคราะห์เซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD105

ตารางที่ 4.9 ร้อยละของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่ปรากฏแอนติเจนต่างๆ

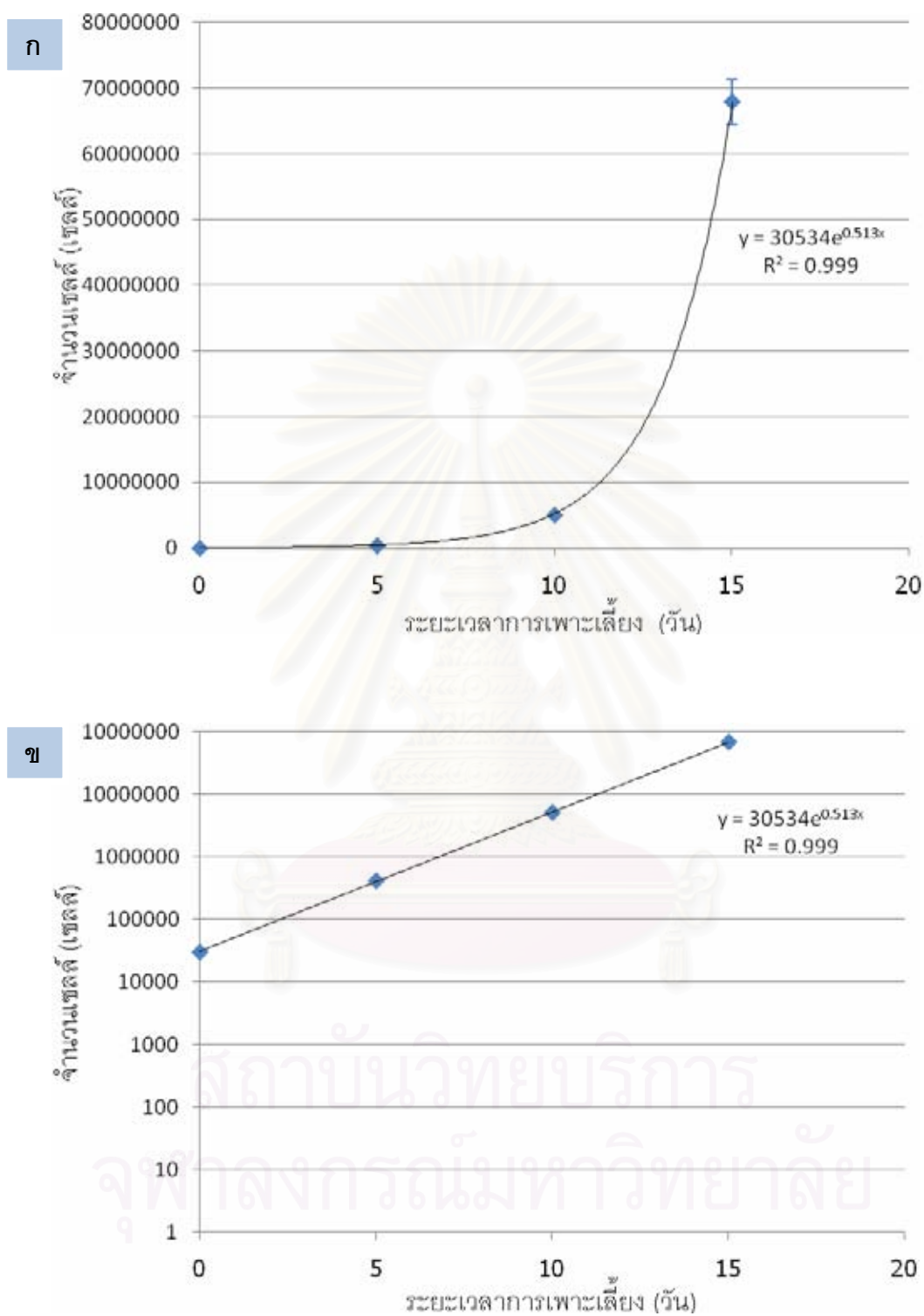
แอนติเจนที่วิเคราะห์	จำนวนเซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน (ร้อยละของเซลล์ที่วิเคราะห์ทั้งหมด)
CD29	96.33
CD44	98.06
CD71	68.40
CD90	97.49
CD105	97.71

#### 4.3.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต

เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่ใช้วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต เป็นเซลล์ใน Passage ที่ 2 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง 6 หลุม โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น 30,000 เซลล์ในแต่ละหลุม หรือคิดเป็นความหนาแน่นของเซลล์ในพื้นที่เพาะเลี้ยงประมาณ 3125 เซลล์/ตารางเซนติเมตร (พื้นที่ในจานเพาะเลี้ยง 6 หลุม เป็น 9.6 ตารางเซนติเมตร/หลุม) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน โดยทำให้เซลล์เป็นเซลล์แขวนลอยด้วยเอนไซม์ทริปซินในวันที่ 5, 10 และ 15 เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ทั้งหมดลงไปเพาะเลี้ยงใหม่โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น 30,000 เซลล์ในแต่ละหลุมตามเดิม ได้ผลดังตารางที่ 4.10 และแสดงเป็นกราฟได้รูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	จำนวนเซลล์ (เซลล์)
0	30,000.00
5	413,333.33±23,094.01
10	5,097,777.78±238,638.11
15	67,970,370.37±3,398,518.52



รูปที่ 4.6

กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก

ก เมื่อแกนตั้งแสดงจำนวนเซลล์ในสัดส่วนแกนปกติ

ข เมื่อแกนตั้งแสดงจำนวนเซลล์ในสัดส่วนแกนแบบลอการิทึม (Logarithm)

จากการทดลองการวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเจริญเติบโตและจำนวนเซลล์ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ (เซลล์)} = 30534 e^{0.513 \times \text{ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)}}$$

$$\text{หรือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)} = 1.946 \times \ln(\text{จำนวนเซลล์}) - 20.09$$

จากสมการดังกล่าวสามารถคำนวณหาระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Doubling time) ได้ดังนี้

ถ้าเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมีจำนวน 30000 เซลล์ ในการเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวน 100000 เซลล์ ต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยง

$$= 1.946 \ln(100000) - 20.09 = 2.3095 \text{ วัน}$$

ในการเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวน 200000 เซลล์ ต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยง

$$= 1.946 \ln(200000) - 20.09 = 3.6585 \text{ วัน}$$

ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เป็น

$$= 3.6585 - 2.3095 = 1.3490 \text{ วัน}$$

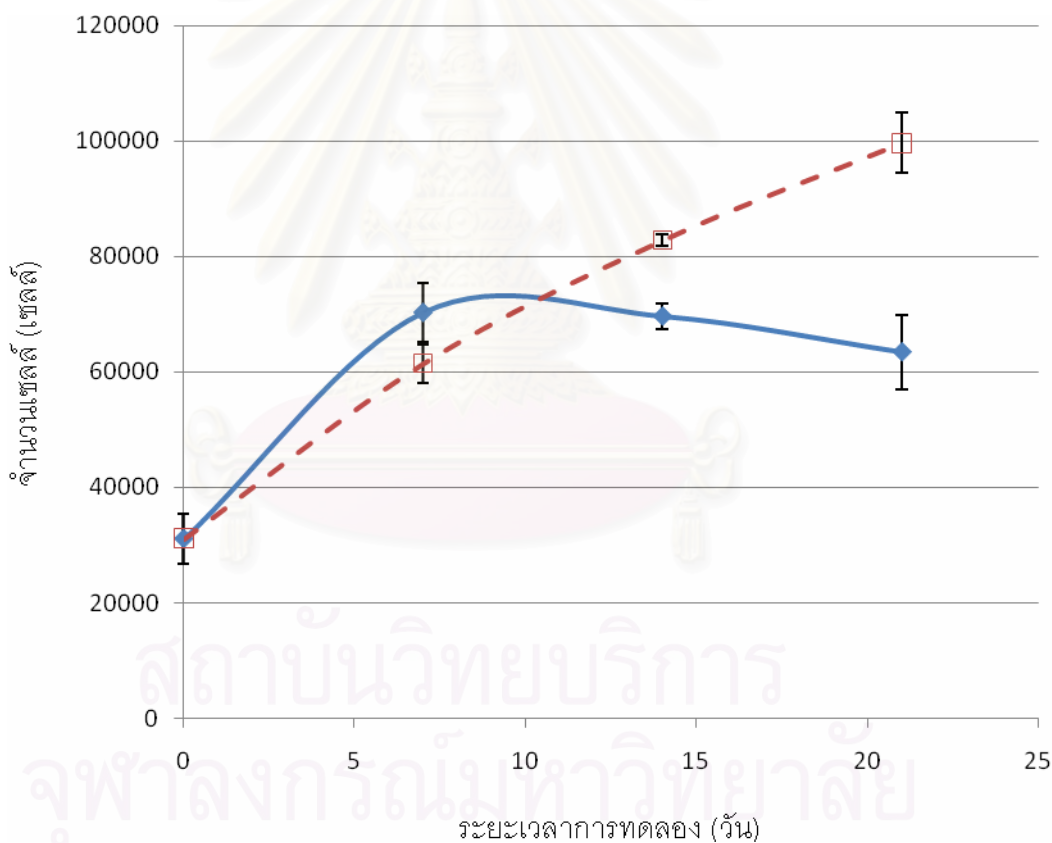
จากผลการวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Doubling time) ประมาณ 1.35 วัน

#### 4.3.2.3 การทดสอบการเกิด Osteogenic differentiation

การวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ในการทดลองจะทำการตรวจวัดเปรียบเทียบการเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และการสะสมแคลเซียมของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation จากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยวิธี MTT assay ได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.8 สำหรับการวิเคราะห์การสะสมแคลเซียมได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการทดลอง (วัน)			
	0	7	14	21
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ	31054.9 ±4303.22	61464.33 ±3335.57	82836.99 ±970.21	99691.26 ±5201.08
ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation	31054.9 ±4303.22	70214.21 ±5133.89	69568.72 ±2280.44	63400.77 ±6383.92

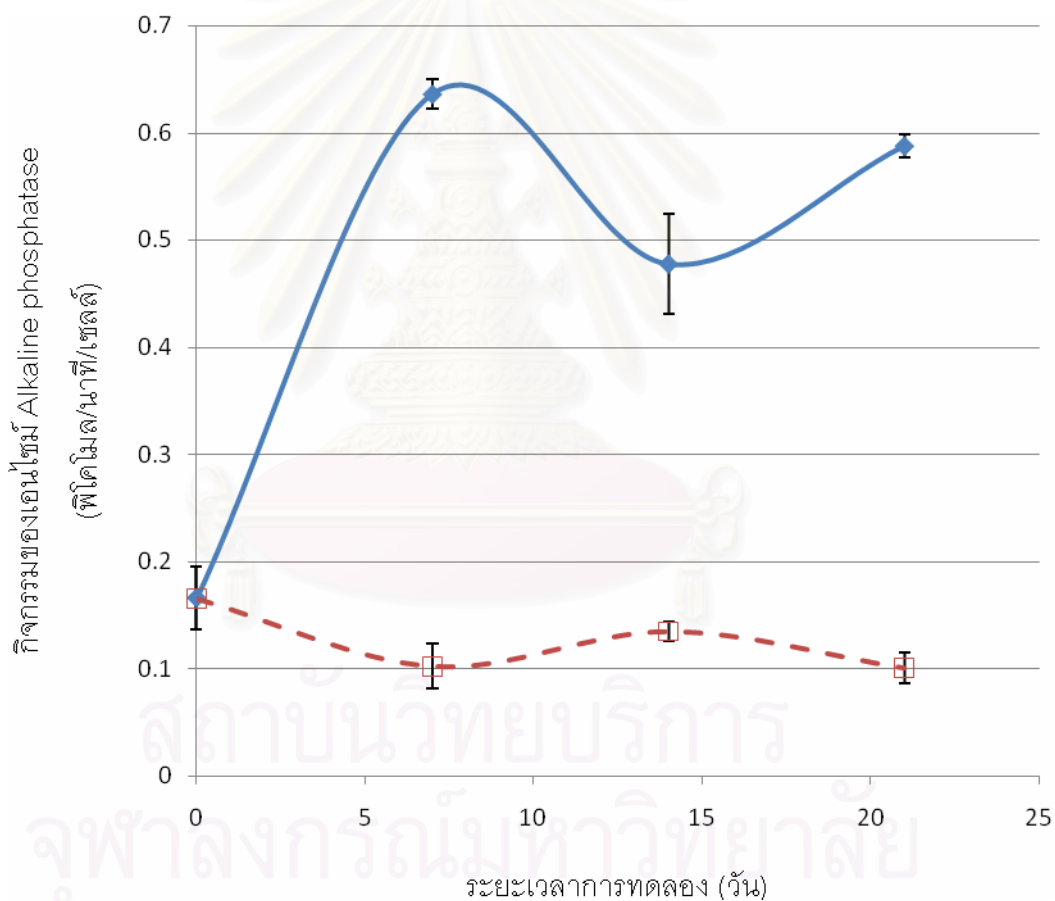


รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบระหว่างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและที่เพาะเลี้ยงอาหารชักนำ Osteogenic differentiation



ตารางที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ Alkaline phosphatase ระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยง  
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation

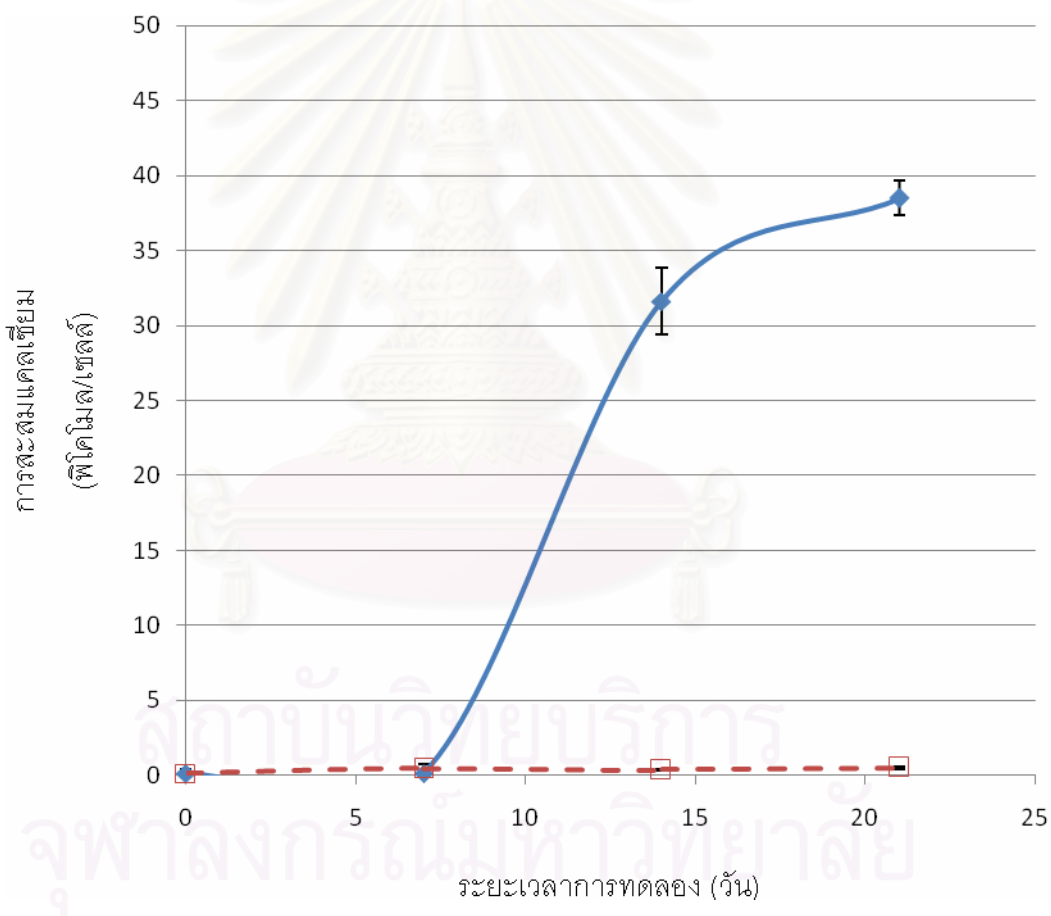
ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการทดลอง (วัน)			
	0	7	14	21
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ	0.1657 ±0.0291	0.1019 ±0.0208	0.1348 ±0.0089	0.1004 ±0.0147
ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation	0.1657 ±0.0291	0.6363 ±0.0136	0.4777 ±0.0468	0.5879 ±0.0109



รูปที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก  
เปรียบเทียบระหว่างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและที่เพาะเลี้ยงอาหาร  
ชักนำ Osteogenic differentiation

ตารางที่ 4.13 การสะสมแคลเซียมระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการทดลอง (วัน)			
	0	7	14	21
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ	0.1152 ±0.3115	0.4510 ±0.3055	0.3670 ±0.0324	0.4934 ±0.1120
ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation	0.1152 ±0.3115	0.1401 ±0.1167	31.6219 ±2.2347	38.4784 ±1.1591



รูปที่ 4.9 การสะสมแคลเซียมของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบระหว่างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและที่เพาะเลี้ยงอาหารชักนำ Osteogenic differentiation

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์ระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation พบว่าในชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นในอัตราที่คงที่ ในขณะที่ชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์แรก หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะลดลงเล็กน้อยอย่างต่อเนื่องในสัปดาห์ต่อมาซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ทางสถิติระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation พบว่าจำนวนเซลล์ในสัปดาห์ที่ 1 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่จำนวนเซลล์ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

เมื่อพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation พบว่าชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติมีกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase คงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์แรก หลังจากนั้นในสัปดาห์ต่อมา กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase จะลดลงเล็กน้อยก่อนที่จะสูงขึ้นอีกครั้งในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase เปรียบเทียบทางสถิติระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในทุกสัปดาห์ที่วิเคราะห์

เมื่อพิจารณาจากการสะสมแคลเซียมระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation พบว่าชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติไม่พบการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง (21 วัน) ในขณะที่ชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ในสัปดาห์แรกยังไม่พบการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้น โดยชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ปริมาณการสะสมแคลเซียมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่จะพบการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ซึ่งสูงกว่าชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ปริมาณการสะสมแคลเซียมในสัปดาห์ที่ 3 สูงกว่าในสัปดาห์ที่ 2 เล็กน้อย โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

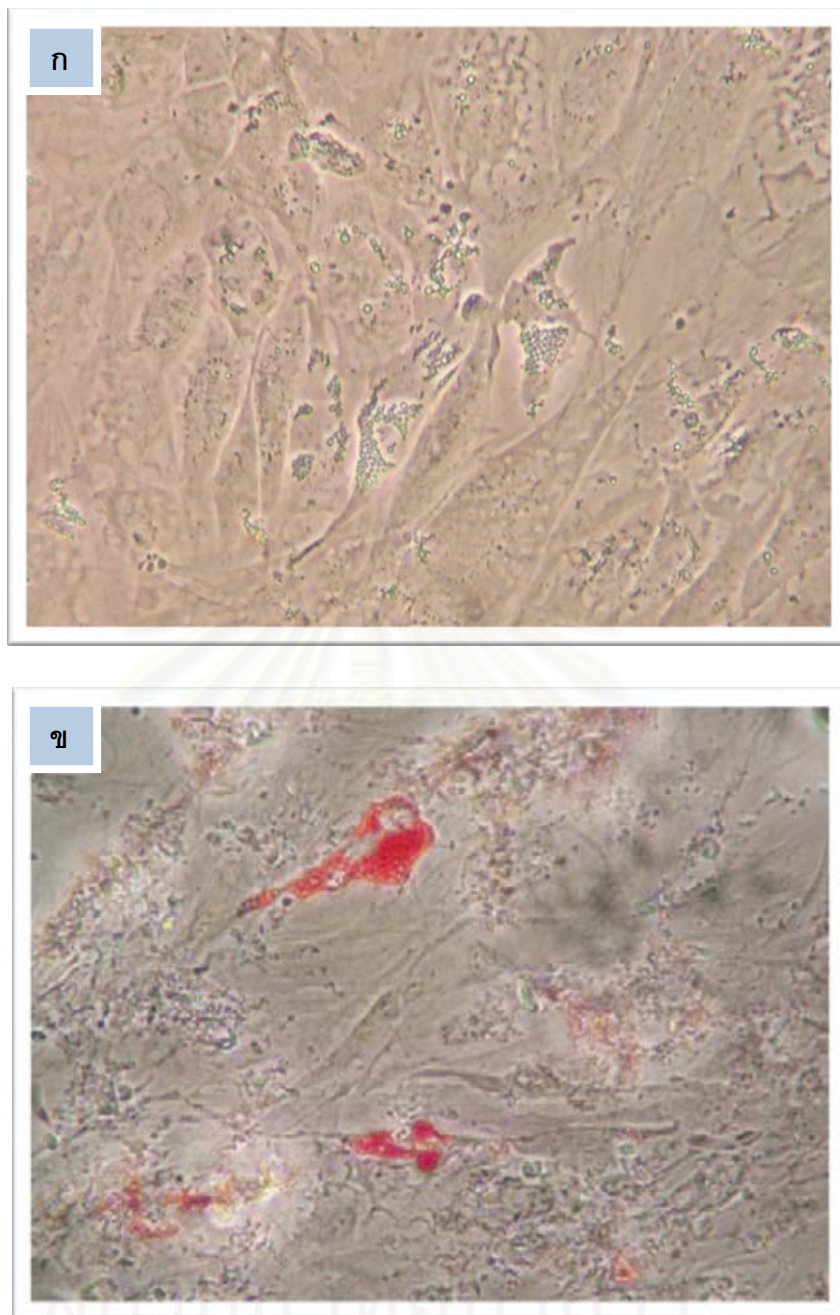
จากการวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation สามารถยืนยันได้ว่าเซลล์จากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติในการเกิด Osteogenic differentiation โดยมีการตอบสนองต่อการชักนำการเกิด Osteogenic differentiation ในสภาวะที่ใช้ดังผลการทดลองตามที่กล่าวมาข้างต้น และสามารถให้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกนี้ในการทดสอบคุณสมบัติของ

สารสกัดจากผิวหนังในการส่งเสริมการเกิด Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ในการทดลองต่อไป

#### 4.3.2.4 การทดสอบการเกิด Adipogenic differentiation

การวิเคราะห์การเกิด Adipogenic differentiation ในการทดลองจะทำการย้อม Lipid granules ภายในเซลล์โดยการย้อม Oil red O stain เปรียบเทียบระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Adipogenic differentiation หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Adipogenic differentiation มีการสร้าง Lipid granules ภายในเซลล์ที่สามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ดังรูปที่ 4.10 ก และเมื่อย้อมโดย Oil red O stain จะติดสีแดงเข้มใน Lipid granules ดังรูปที่ 4.10 ข ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น

จากการทดลองแสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกนอกจากจะมีคุณสมบัติในการเกิด Osteogenic differentiation แล้วยังสามารถเกิด Adipogenic differentiation ได้ เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์แอนติเจนที่ผิวเซลล์ซึ่งยืนยันว่าเซลล์จากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมากกว่าร้อยละ 95 ของเซลล์ทั้งหมด แต่จากการทดลองการเกิด Adipogenic differentiation พบว่าเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงและพบการเกิด Lipid granules ภายในเซลล์มีจำนวนเพียงเล็กน้อย แสดงว่าถึงแม้ว่าเซลล์จากไขกระดูกที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดแต่มีเซลล์ต้นกำเนิดเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถเกิด Adipogenic differentiation ได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ใช้



รูปที่ 4.10 เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Adipogenic differentiation เป็นระยะเวลา 21 วัน ที่กำลังขยาย 200 เท่า  
 ก เซลล์ที่พบ Lipid granule ภายในเซลล์ ก่อนย้อม Oil red O stain  
 ข เซลล์ที่พบ Lipid granule ภายในเซลล์ หลังย้อม Oil red O stain

#### 4.4 การวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิดในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

##### 4.4.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

หลักจากนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยใช้จำนวนเซลล์ 25,000 เซลล์/1 ชิ้นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ และวัดจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้หลังนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์นาน 1 วัน จำนวนเซลล์ที่สามารถยึดเกาะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรได้แสดงตารางที่ 4.15 แสดงข้อมูลเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ทั้งหมดได้ดังตารางที่ 4.14 และรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เพาะเลี้ยงนาน 1 วันหลังจากนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ย้อมเซลล์ด้วยสสาร MTT แสดงดังรูปที่ 4.12 ก

เมื่อพิจารณาจากร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกสามารถยึดเกาะเข้าไปในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้ดีที่สุด (ร้อยละ  $89.79 \pm 6.57$  ของเซลล์ทั้งหมด) รองลงมาคือโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 และ DE-2 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะเป็นร้อยละ  $73.15 \pm 6.72$  และ  $73.15 \pm 4.55$  ของเซลล์ทั้งหมด ตามลำดับ สำหรับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3 มีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะน้อยที่สุดคือร้อยละ  $72.01 \pm 7.31$  ของเซลล์ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรต่างๆ พบว่ามีเพียงสูตร DE-2 และคอลลาเจนชนิดที่ 1 เท่านั้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

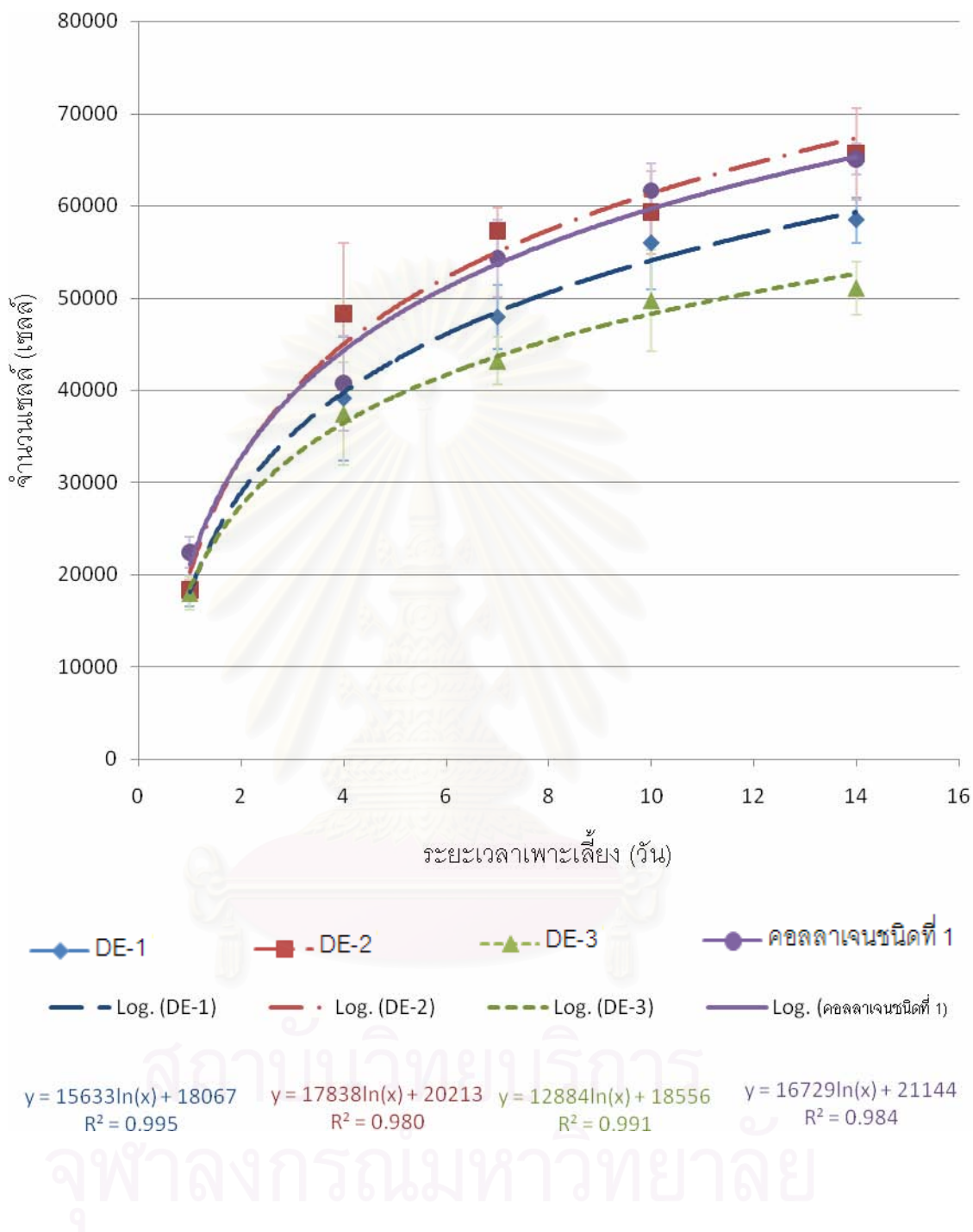
ตารางที่ 4.14 จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ภายหลังจากกระบวนการนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร	จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ (ร้อยละของเซลล์เริ่มต้น)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
DE-1	73.15	6.72
DE-2	73.15	4.55
DE-3	72.01	7.31
คอลลาเจนชนิดที่ 1	89.79	6.57

หลังจากนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้ว จึงนำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์ไปเพาะเลี้ยงแล้ววัดจำนวนเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์หลังจากเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตร ได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.15 และสามารถนำมาสร้างเป็นกราฟ ได้ดังรูปที่ 4.11 ลักษณะของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์อยู่ภายในหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ เมื่อข้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ลักษณะที่ปรากฏแสดงได้ดังรูปที่ 4.12 สำหรับลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 รวมทั้งจากคอลลาเจนชนิดที่ 1 แสดงได้ดังรูป 4.13, 4.14, 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ

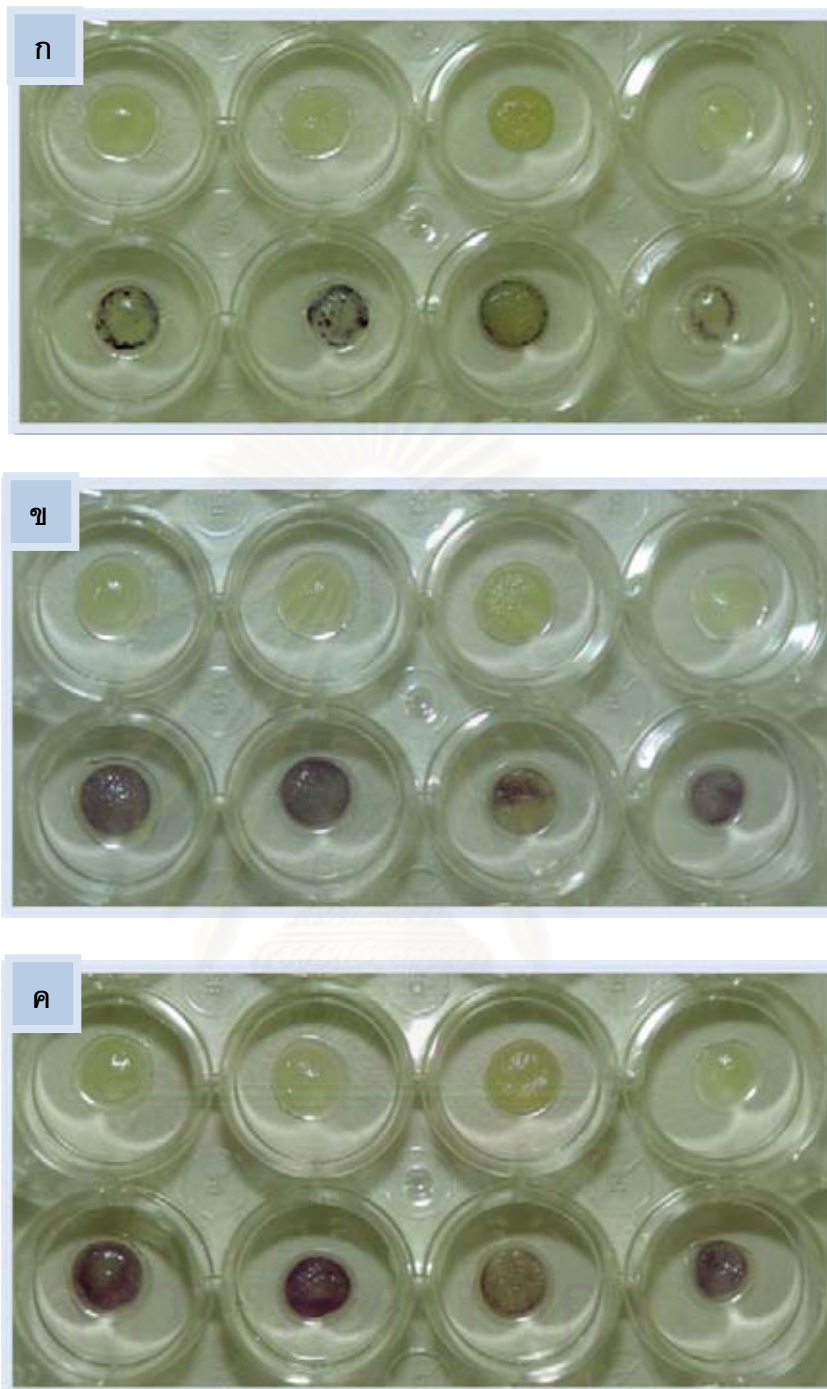
ตารางที่ 4.15 จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เมื่อทำการวัดจำนวนเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยง

ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	จำนวนเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา (เซลล์ $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)				
	1 วัน	4 วัน	7 วัน	10 วัน	14 วัน
PAD HEAVY	18288.69 $\pm$ 1680.46	39087.58 $\pm$ 6685.01	47909.18 $\pm$ 3458.23	55941.86 $\pm$ 5004.52	58452.07 $\pm$ 2446.91
DE-2	18288.69 $\pm$ 1138.53	48267.78 $\pm$ 7701.84	57232.83 $\pm$ 2581.93	59240.99 $\pm$ 3790.34	65624.11 $\pm$ 4962.72
DE-3	18001.8 $\pm$ 1829.92	37438.01 $\pm$ 5594.19	43175.64 $\pm$ 2566.95	49702.19 $\pm$ 5531.77	51064.88 $\pm$ 2857.14
คอลลาเจนชนิดที่ 1	22448.46 $\pm$ 1643.32	40737.15 $\pm$ 5165.36	54292.29 $\pm$ 4196.09	61607.77 $\pm$ 2983.95	65050.34 $\pm$ 1643.32



รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ



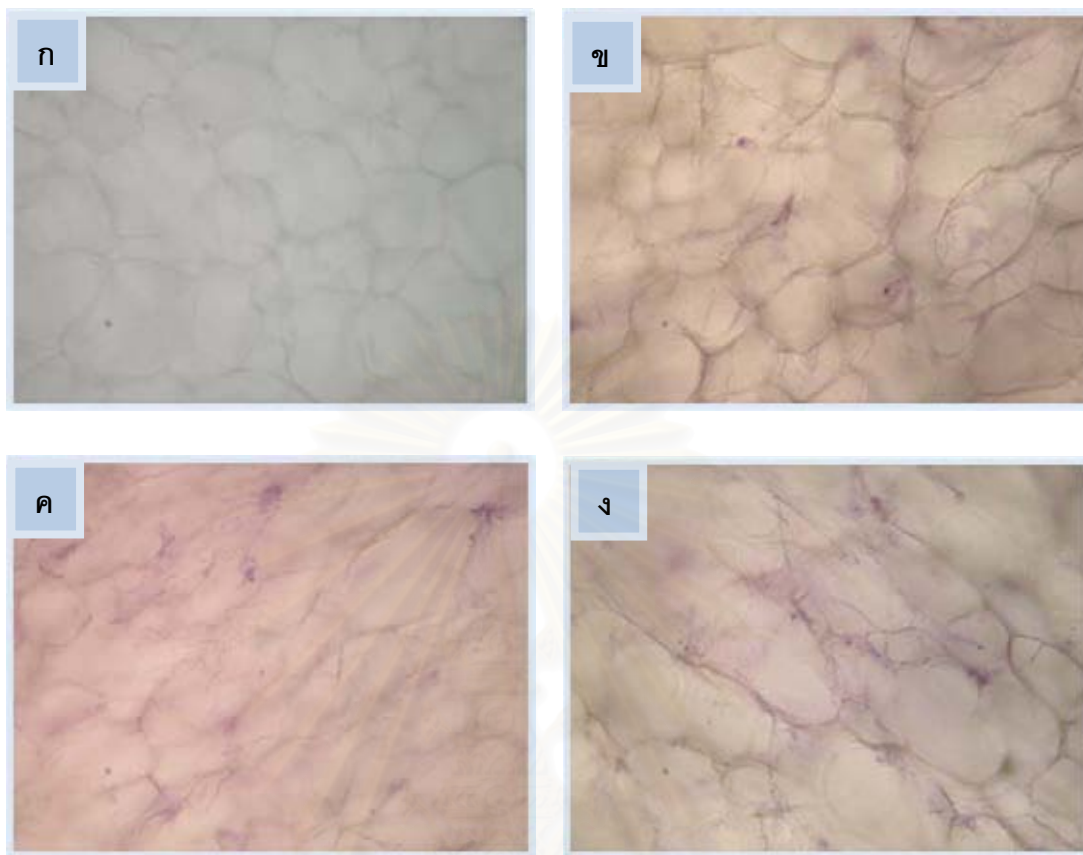


รูปที่ 4.12 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ปราศจากเซลล์ (แถวบนของแต่ละรูป) และที่มีเซลล์ (แถวล่างของแต่ละรูป) เติบโตจากซ้ายไปขวา ได้แก่ DE-1, DE-2, DE-3 และคอลลาเจนชนิดที่ 1

ก โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เพาะเลี้ยงนาน 1 วัน

ข โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เพาะเลี้ยงนาน 7 วัน

ค โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เพาะเลี้ยงนาน 14 วัน



รูปที่ 4.13 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า

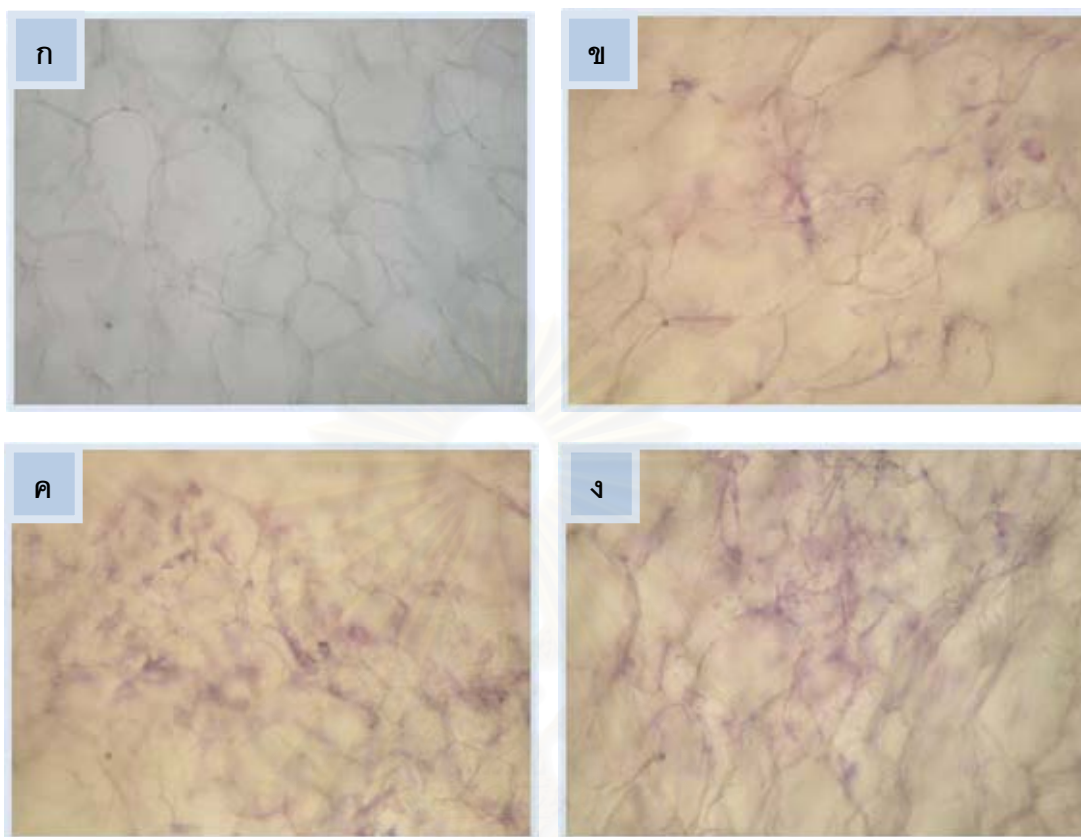
ก ไม่มีเซลล์ภายใน

ข มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 1 วัน

ค มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 7 วัน

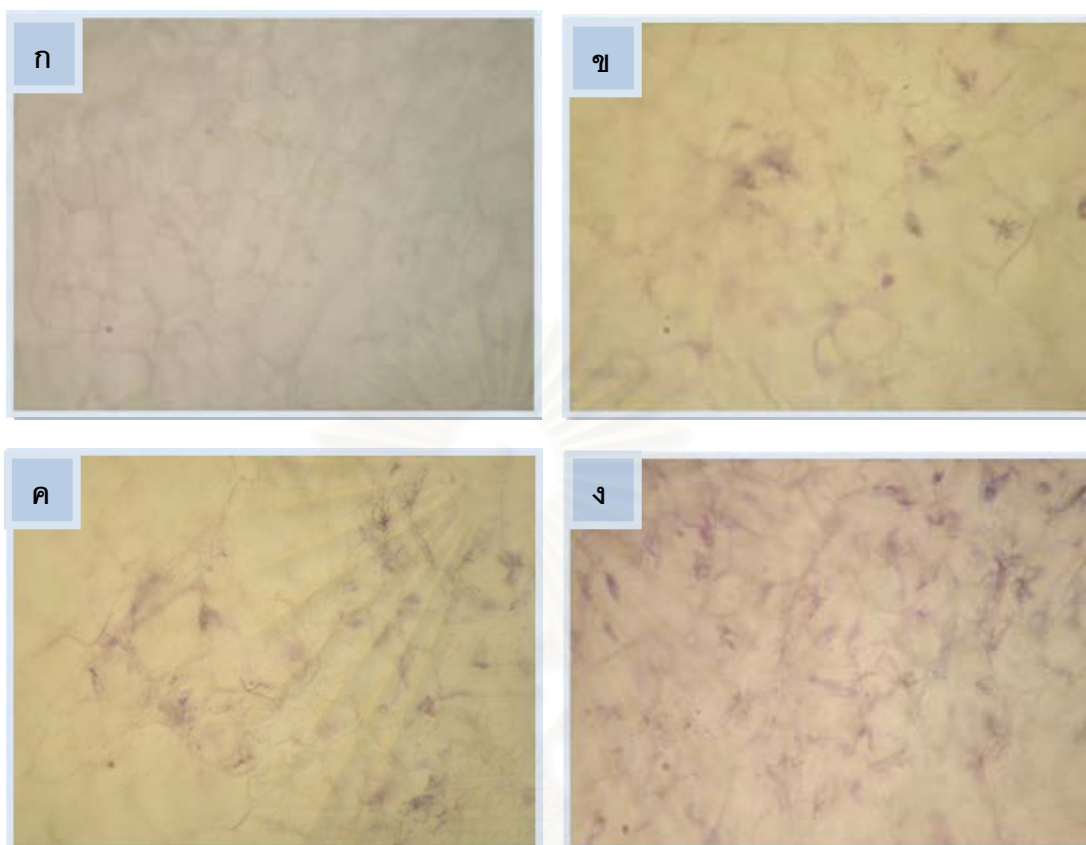
ง มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



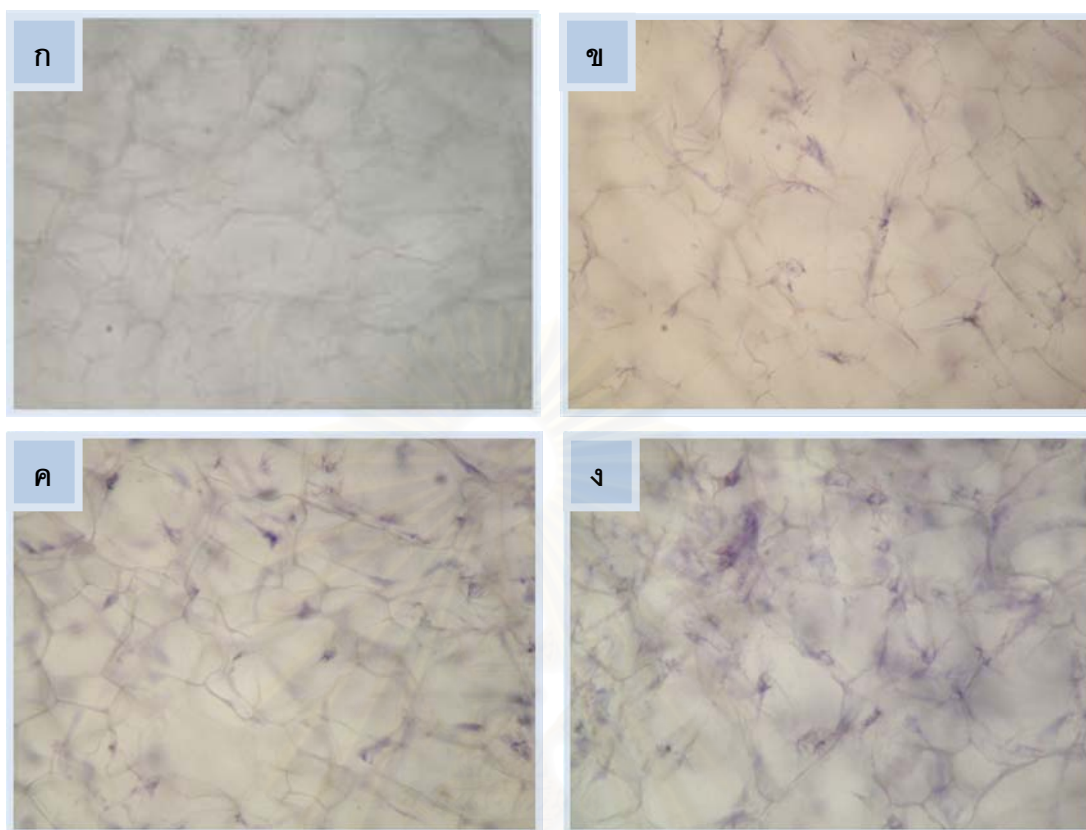
รูปที่ 4.14 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-2 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า

ก ไม่มีเซลล์ภายใน  
 ข มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 1 วัน  
 ค มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 7 วัน  
 ง มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 14 วัน



รูปที่ 4.15 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-3 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า  
 ก ไม่มีเซลล์ภายใน  
 ข มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 1 วัน  
 ค มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 7 วัน  
 ง มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

สภามหาวิทยาลัย  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์คอลลาเจนชนิดที่ 1 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกและย้อมเซลล์ด้วยสาร MTT ที่กำลังขยาย 200 เท่า

ก ไม่มีเซลล์ภายใน

ข มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 1 วัน

ค มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 7 วัน

ง มีเซลล์ภายใน เพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตร พิจารณาจากกราฟการเจริญเติบโตและสมการความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและจำนวนเซลล์แสดงดังรูปที่ 4.11 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกสามารถเจริญเติบโตภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ต่อมาคือ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 สำหรับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3 มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด

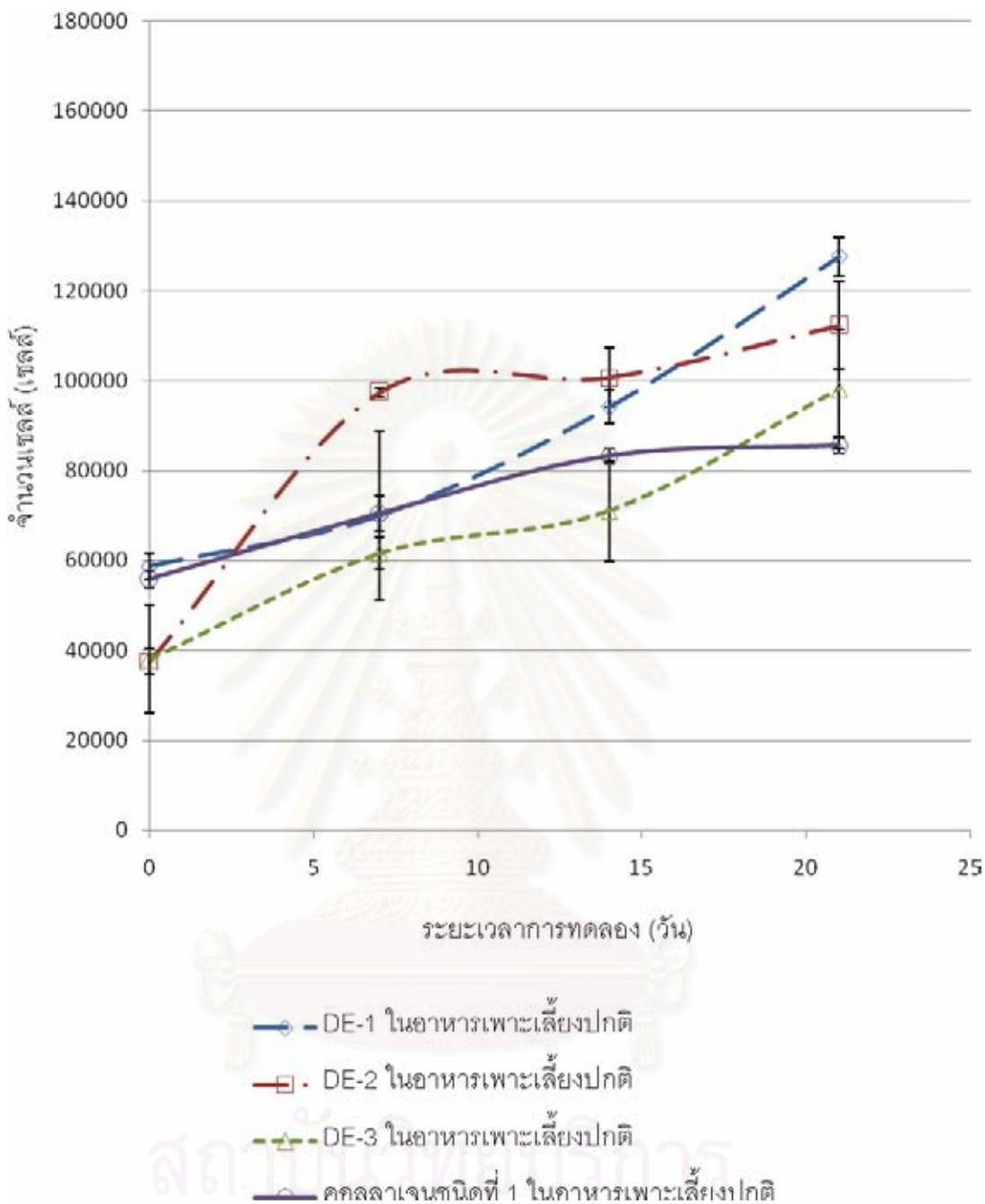
#### 4.4.2 การวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

การวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรต่างๆ จะทำการตรวจวัดเปรียบเทียบการเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และการสะสมแคลเซียมของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกระหว่างชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation

จากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยวิธี MTT assay ได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.16 การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติแสดงดังรูปที่ 4.17 การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation แสดงดังรูปที่ 4.18 สำหรับการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation แสดงดังรูปที่ 4.19 ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์มีรูปแบบคล้ายกับลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ในภาวะเพาะเลี้ยงทั้งในสภาวะที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation กล่าวคือ การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติจำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในอัตราที่คงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง ในขณะที่การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในสัปดาห์แรกในทุกชนิดของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ แต่หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละชนิดแตกต่างกันเล็กน้อยคือ การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 มีการเพิ่มจำนวนต่อไปอย่างต่อเนื่อง การเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-2 และ DE-3 มีการลดจำนวนเซลล์ลงเล็กน้อยอย่างต่อเนื่อง สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นต่อไปในสัปดาห์ที่ 2 แล้วจึงมีจำนวนลดลงในสัปดาห์ที่ 3

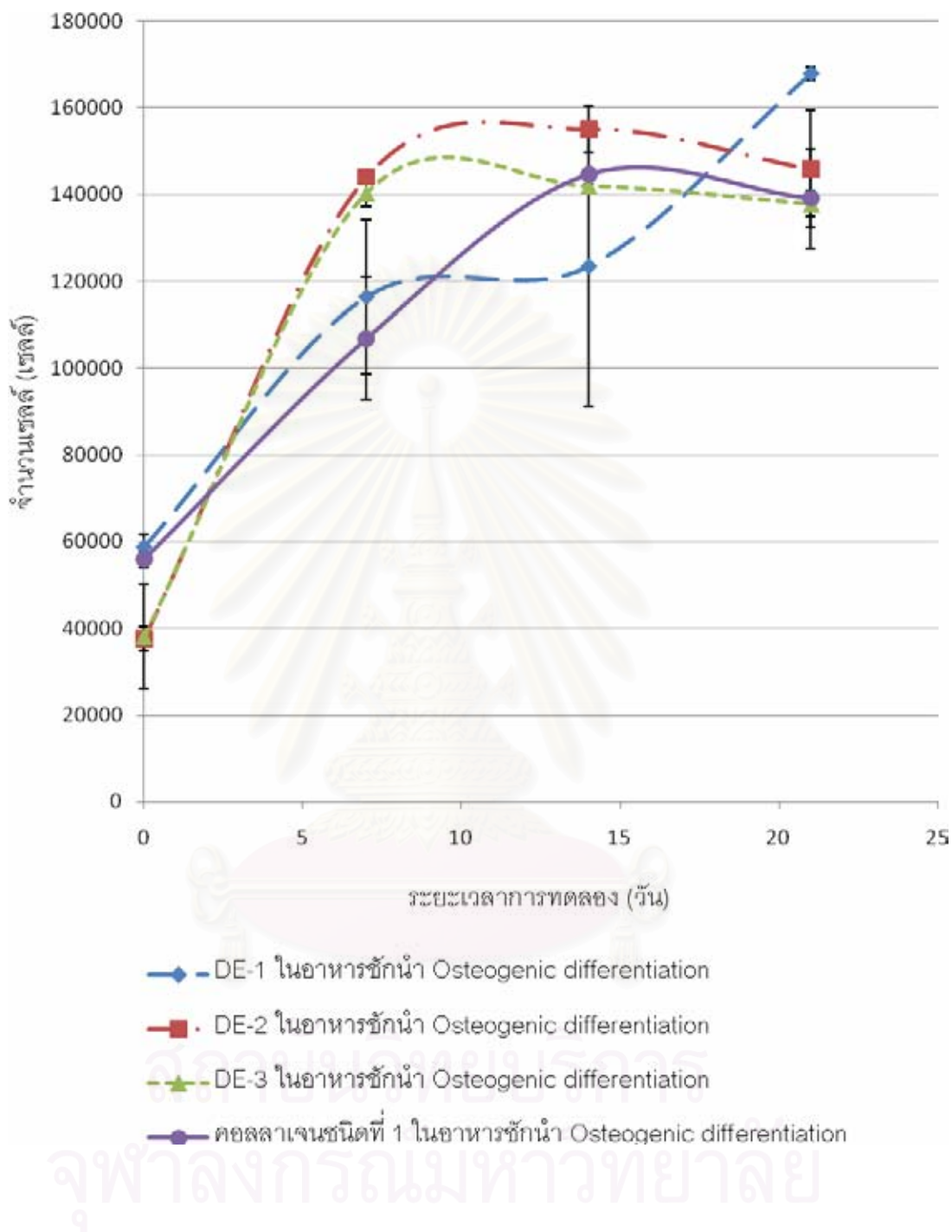
ตารางที่ 4.16 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ

	ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	จำนวนเซลล์ (เซลล์) เมื่อทดลองเป็นเวลา			
		0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ	DE-1	58738.95 ±2889.36	69999.05 ±18799.62	94168.80 ±3703.85	127590.50 ±4319.33
	DE-2	37581.45 ±2929.14	97396.21 ±1075.81	100623.60 ±6669.99	112242.30 ±9846.60
	DE-3	38155.22 ±12066.93	61607.77 ±3657.74	71003.13 ±11157.3	98113.42 ±13236.05
	คอลลาเจนชนิดที่ 1	55870.14 ±1940.43	70501.09 ±3980.96	83267.31 ±1624.43	85562.36 ±1838.34
ในอาหารที่เพิ่ม Osteogenic diff.	DE-1	58738.95 ±2889.36	116402.10 ±17643.64	123430.70 ±32267.22	167969.00 ±1511.24
	DE-2	37581.45 ±2929.14	144014.40 ±124.223	155131.10 ±5283.51	145879.20 ±13546.60
	DE-3	38155.22 ±12066.93	140356.70 ±3022.48	141934.50 ±430.32	137846.50 ±2957.98
	คอลลาเจนชนิดที่ 1	55870.14 ±1940.43	106791.60 ±13992.64	144588.20 ±14458.15	138994.00 ±11519.32

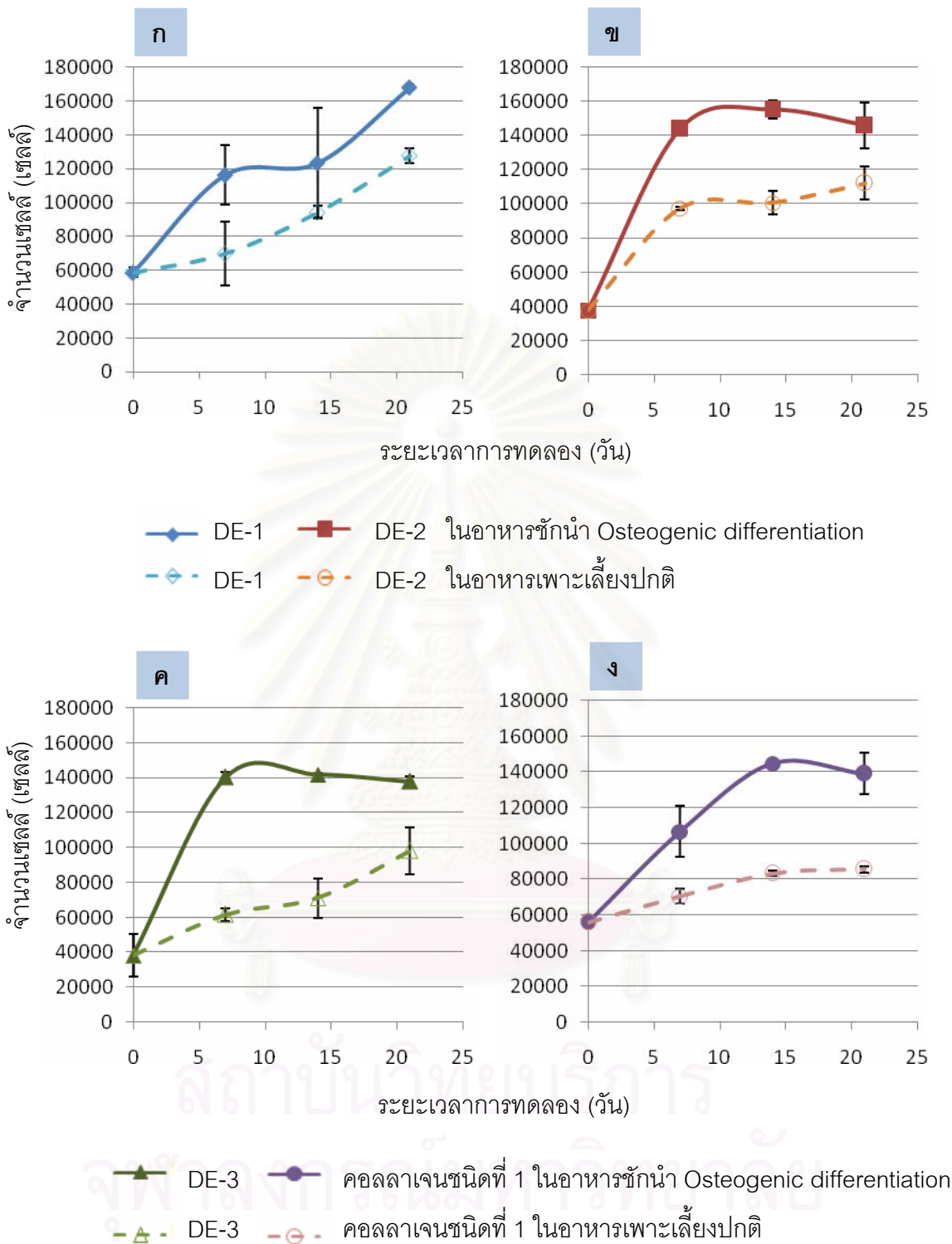


รูปที่ 4.17 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ





รูปที่ 4.18 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation



รูปที่ 4.19 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเปรียบเทียบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ

ก DE-1      ข DE-2      ค DE-3      ง คอลลาเจนชนิดที่ 1

เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ และในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation แสดงดังตารางที่ 4.17 กราฟกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ แสดงดังรูปที่ 4.20 กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation แสดงดังรูปที่ 4.21 สำหรับการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation แสดงดังรูปที่ 4.22

ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ ถึงแม้ว่าไม่ใช่สารชักนำ Osteogenic differentiation แต่ปรากฏว่าเซลล์มีการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในทุกสูตรโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ซึ่งมีรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในลักษณะคล้ายกันกับการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงเนื้อเยื่อแต่ละสูตรที่ทดสอบมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิด Osteogenic differentiation ได้โดยการกระตุ้นของวัตถุเติมที่ใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ โดยในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรมีปริมาณการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ที่ใกล้เคียงกันในทุกวันตลอดการทดลองที่วิเคราะห์และมีปริมาณที่สูงกว่าการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1

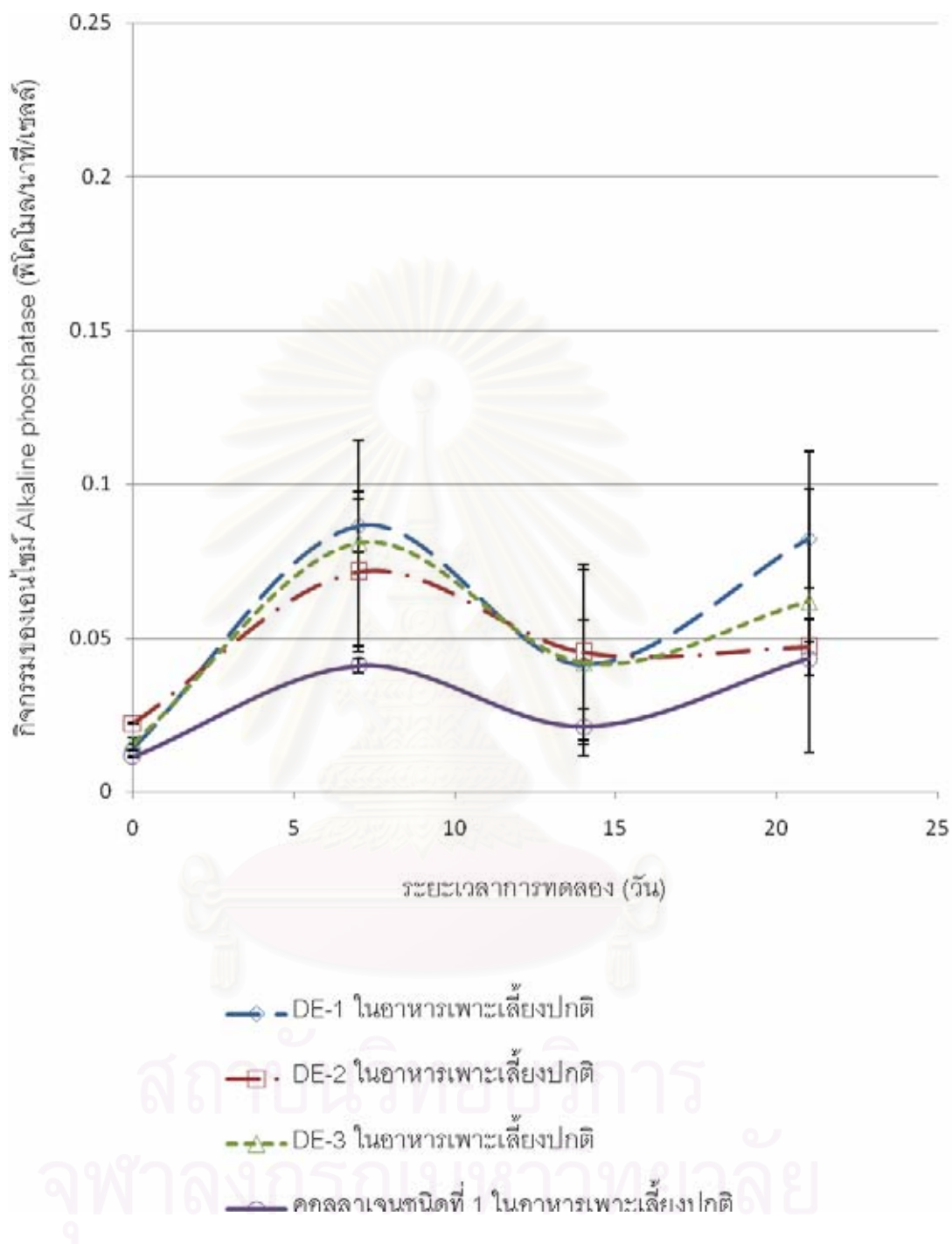
ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation เซลล์มีการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase เพิ่มขึ้นในทุกสูตรโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ แต่มีรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ที่ต่างจากการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในอัตราที่คงที่จนถึงวันที่ 14 แล้วจึงลดลงในวันที่ 21 โดยในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-2 สูงสุดทั้งวันที่ 14 และในวันที่ 21 ซึ่งเป็นวันที่เซลล์มีการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรสูงที่สุดและวันสุดท้ายของการทดลอง ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation (รูปที่ 4.22) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ ซึ่งโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรให้ผลเหมือนกัน

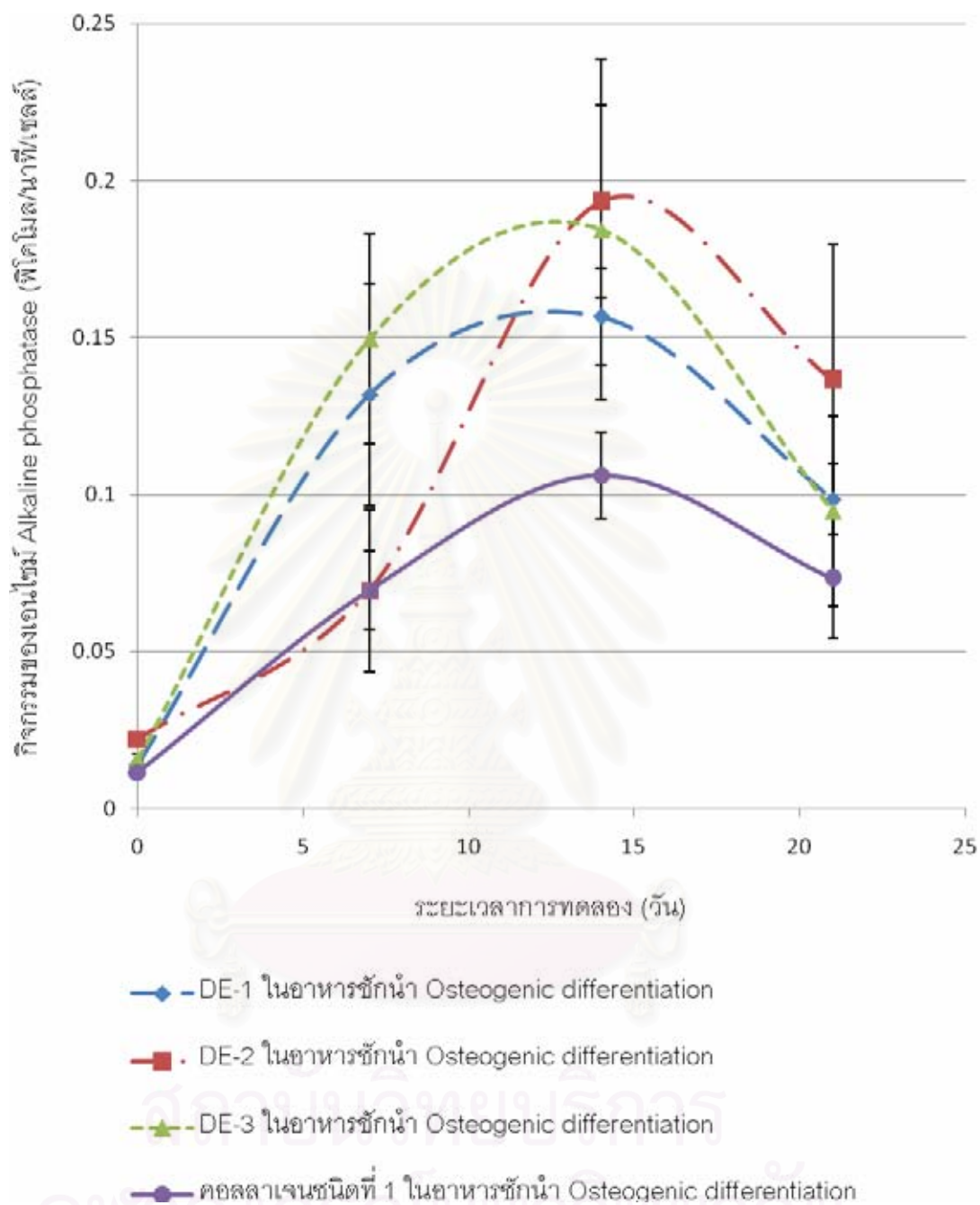
ตารางที่ 4.17 กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดภายในโครง  
เนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ

	ชนิดโครงเนื้อเยื่อ สังเคราะห์	กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (พิโคโมล/นาที/เซลล์) เมื่อทดลองเป็นเวลา			
		0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ	DE-1	0.0141 ±0.0011	0.0864 ±0.0084	0.0413 ±0.0143	0.08223 ±0.0161
	DE-2	0.0221 ±0.0004	0.0715 ±0.0259	0.0453 ±0.0287	0.0469 ±0.0092
	DE-3	0.0155 ±0.0019	0.0809 ±0.0335	0.0418 ±0.0302	0.0617 ±0.0488
	คอลลาเจน ชนิดที่ 1	0.0114 ±0.0004	0.0409 ±0.0022	0.0209 ±0.0058	0.0433 ±0.0054
ในอาหารชักนำ Osteogenic diff.	DE-1	0.0141 ±0.0011	0.1318 ±0.0354	0.1566 ±0.0154	0.0985 ±0.0114
	DE-2	0.0221 ±0.0004	0.0694 ±0.0259	0.1933 ±0.0307	0.1363 ±0.0431
	DE-3	0.0155 ±0.0019	0.1497 ±0.0334	0.1843 ±0.0543	0.0947 ±0.0303
	คอลลาเจน ชนิดที่ 1	0.0114 ±0.0004	0.0694 ±0.0124	0.1061 ±0.0139	0.0732 ±0.0189

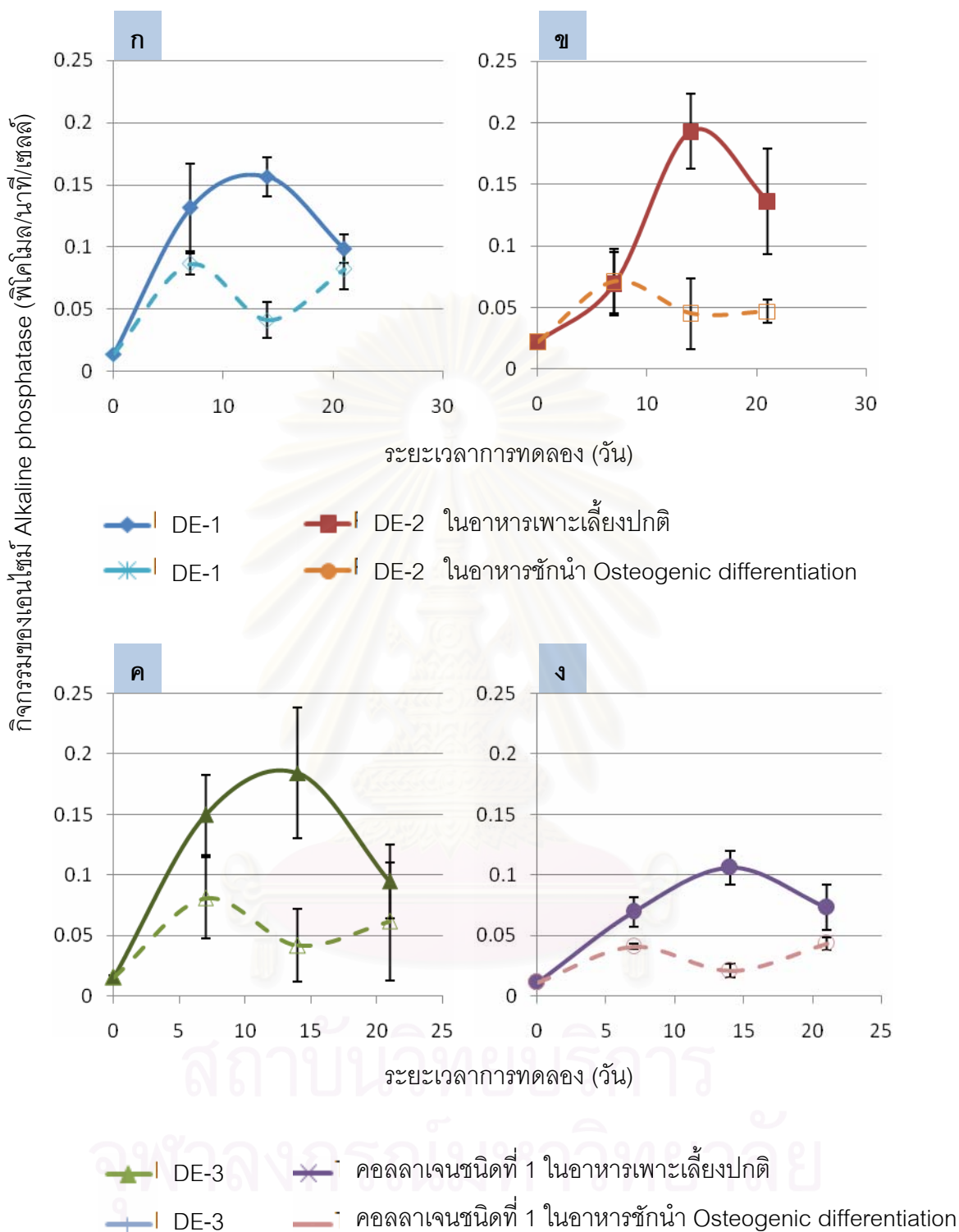
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.20 กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ



รูปที่ 4.21 กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation



รูปที่ 4.22 กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก เปรียบเทียบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ

ก DE-1      ข DE-2      ค DE-3      ง คอลลาเจนชนิดที่ 1

ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรต่างๆ ในกรณีที่มีเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation แสดงข้อมูลได้ดังตารางที่ 4.18 กรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติสามารถสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 4.26 และในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation สามารถสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 4.27 นอกจากนี้ยังได้พิจารณาการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตรต่างๆ ในกรณีที่ไม่มีเซลล์ด้วย สำหรับในกรณีที่ไม่มีเซลล์แสดงข้อมูลได้ดังตารางที่ 4.19 กรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติสามารถสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 4.28 และในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation สามารถสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 4.29

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการสะสมแคลเซียมในสภาวะที่แตกต่างกันพบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แม้ว่าไม่เซลล์แต่ก็พบว่าการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วย ซึ่งแสดงว่าวัสดุที่ที่ใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทุกสูตรที่ทดสอบมีคุณสมบัติในการสะสมแคลเซียมด้วยตัวเอง ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในแต่ละสภาวะมีลักษณะที่แตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติกรณีที่มีเซลล์ การสะสมแคลเซียมของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 และ DE-2 มีปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงที่สุดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน สำหรับสูตร DE-3 มีอัตราการสะสมแคลเซียมในอัตราที่ช้ากว่าแต่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนในที่สุด ในวันที่ 21 ของการทดลองการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-3 มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับใน DE-1 และ DE-2 ในที่สุด ในขณะที่การสะสมแคลเซียมของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีการสะสมแคลเซียมต่ำกว่าในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตร ตลอดระยะเวลาการทดลอง

ในกรณีโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังทุกสูตรมีลักษณะแนวโน้มและปริมาณการสะสมแคลเซียมในในช่วงเวลาต่างๆ ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีอัตราการสะสมแคลเซียมที่ต่ำกว่าแต่มีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งวันที่ 21 ของการทดลอง มีปริมาณการสะสมแคลเซียมเท่ากับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตรอื่นๆ

การสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์ ทั้งในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation พบว่า การสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดแต่ละสูตรมีปริมาณเท่ากันแต่ต่างกันในวันที่ 21 ของการทดลอง สำหรับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการสะสมแคลเซียมในระยะเริ่มต้นต่ำกว่าในกรณีของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนัง แต่มีปริมาณการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

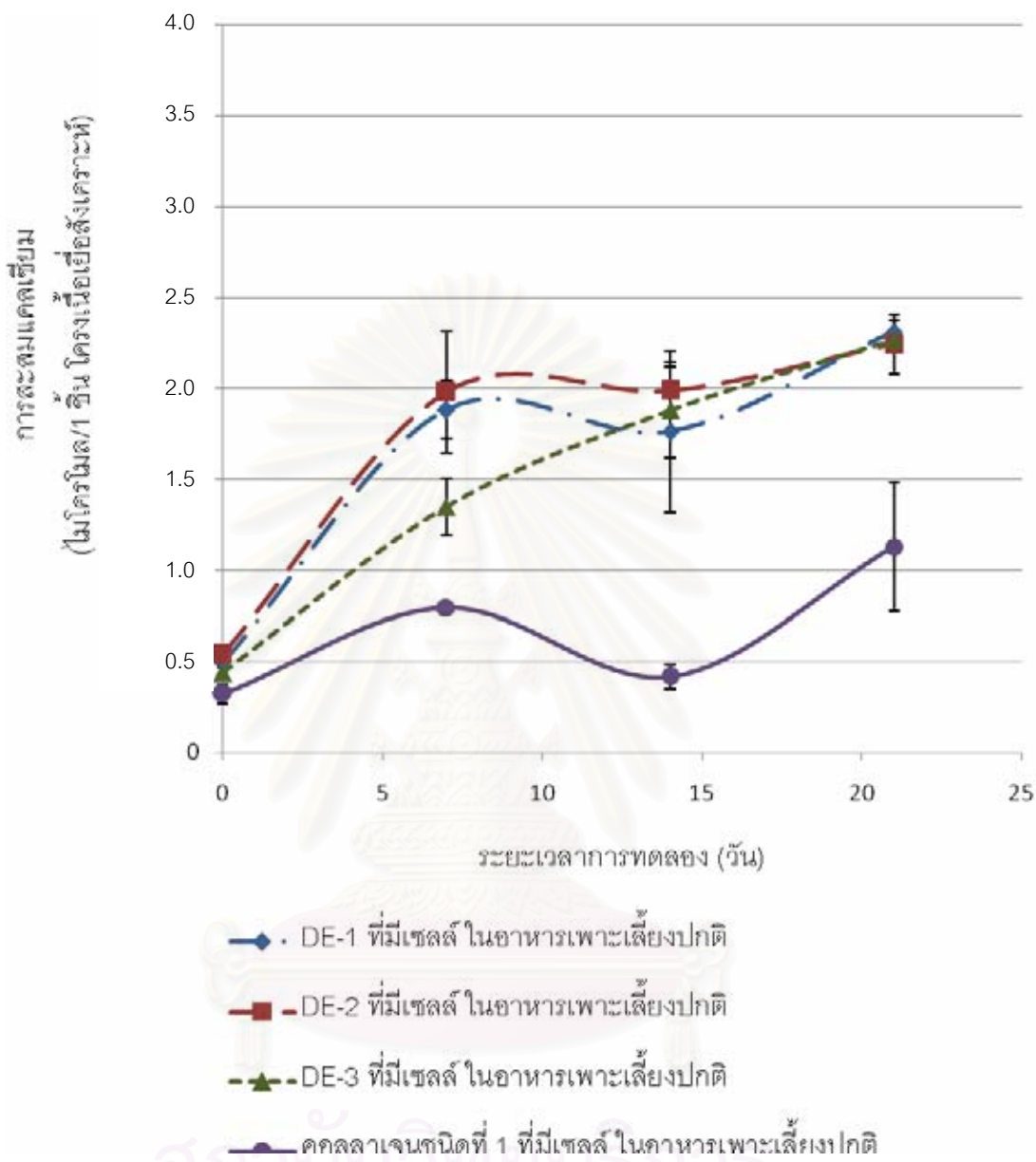


ตารางที่ 4.18 การสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆในกรณีที่มีเซลล์

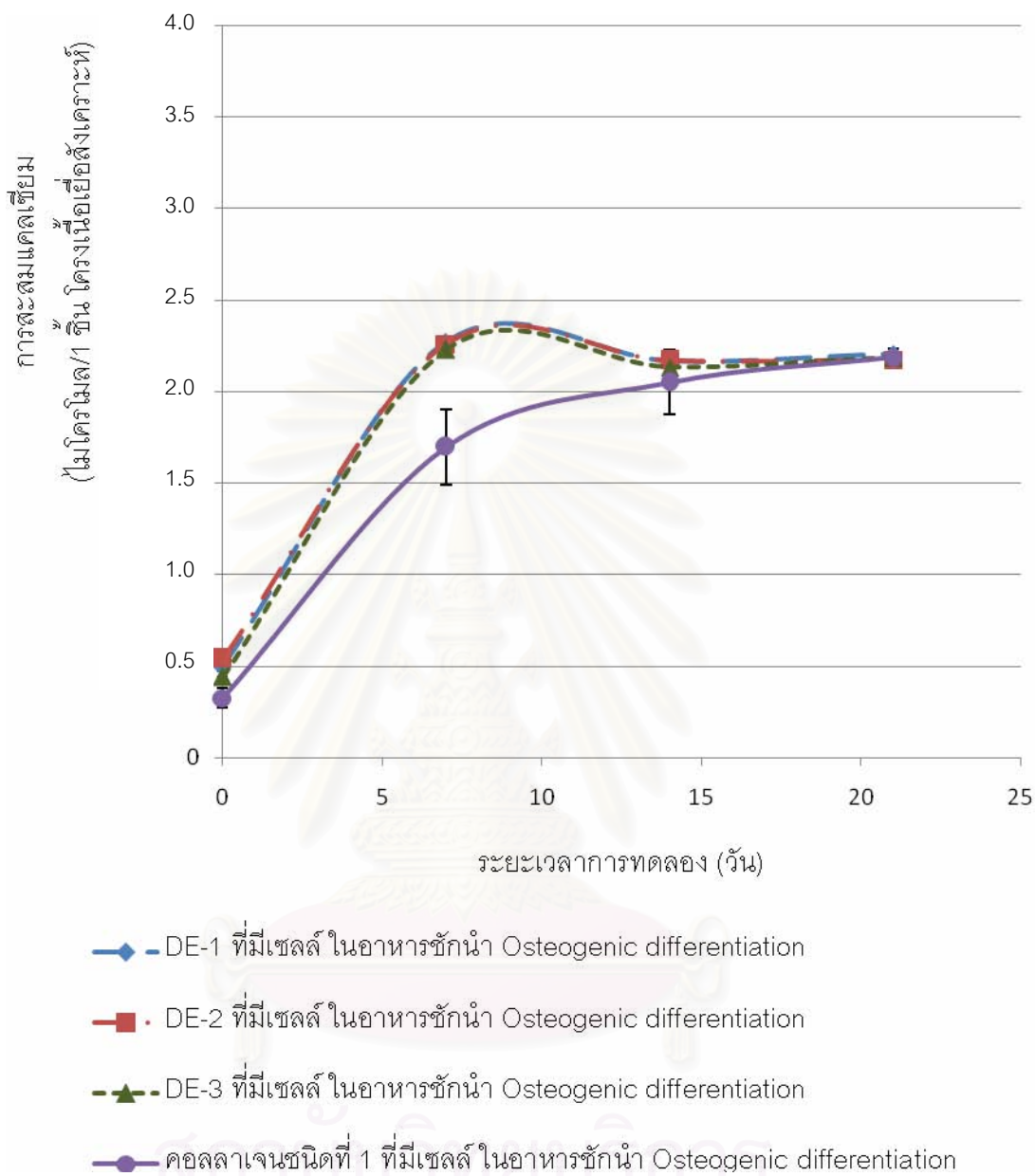
	ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	ปริมาณการสะสมแคลเซียม (ไมโครโมล/1 ชิ้นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์) เมื่อทดลองเป็นเวลา			
		0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ	DE-1	0.4990 ±0.0606	1.8833 ±0.1605	1.7626 ±0.4460	2.3117 ±0.0591
	DE-2	0.5401 ±0.0228	1.9808 ±0.3348	1.9871 ±0.1361	2.2437 ±0.1611
	DE-3	0.4399 ±0.0295	1.3512 ±0.1570	1.8815 ±0.2634	2.2696 ±0.0121
	คอลลาเจนชนิดที่ 1	0.3255 ±0.0540	0.7950 ±0.0056	0.4176 ±0.0674	1.1304 ±0.3528
ในอาหารชักนำ Osteogenic diff.	DE-1	0.4990 ±0.0606	2.2714 ±0.0217	2.1677 ±0.0077	2.2062 ±0.0309
	DE-2	0.54014 ±0.0228	2.2598 ±0.0201	2.1704 ±0.0228	2.1739 ±0.0149
	DE-3	0.4399 ±0.0295	2.2285 ±0.0008	2.1337 ±0.0345	2.1865 ±0.0305
	คอลลาเจนชนิดที่ 1	0.3255 ±0.0540	1.6982 ±0.2057	2.0506 ±0.1781	2.1874 ±0.0163

ตารางที่ 4.19 การสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆในกรณีที่ไม่ให้เซลล์

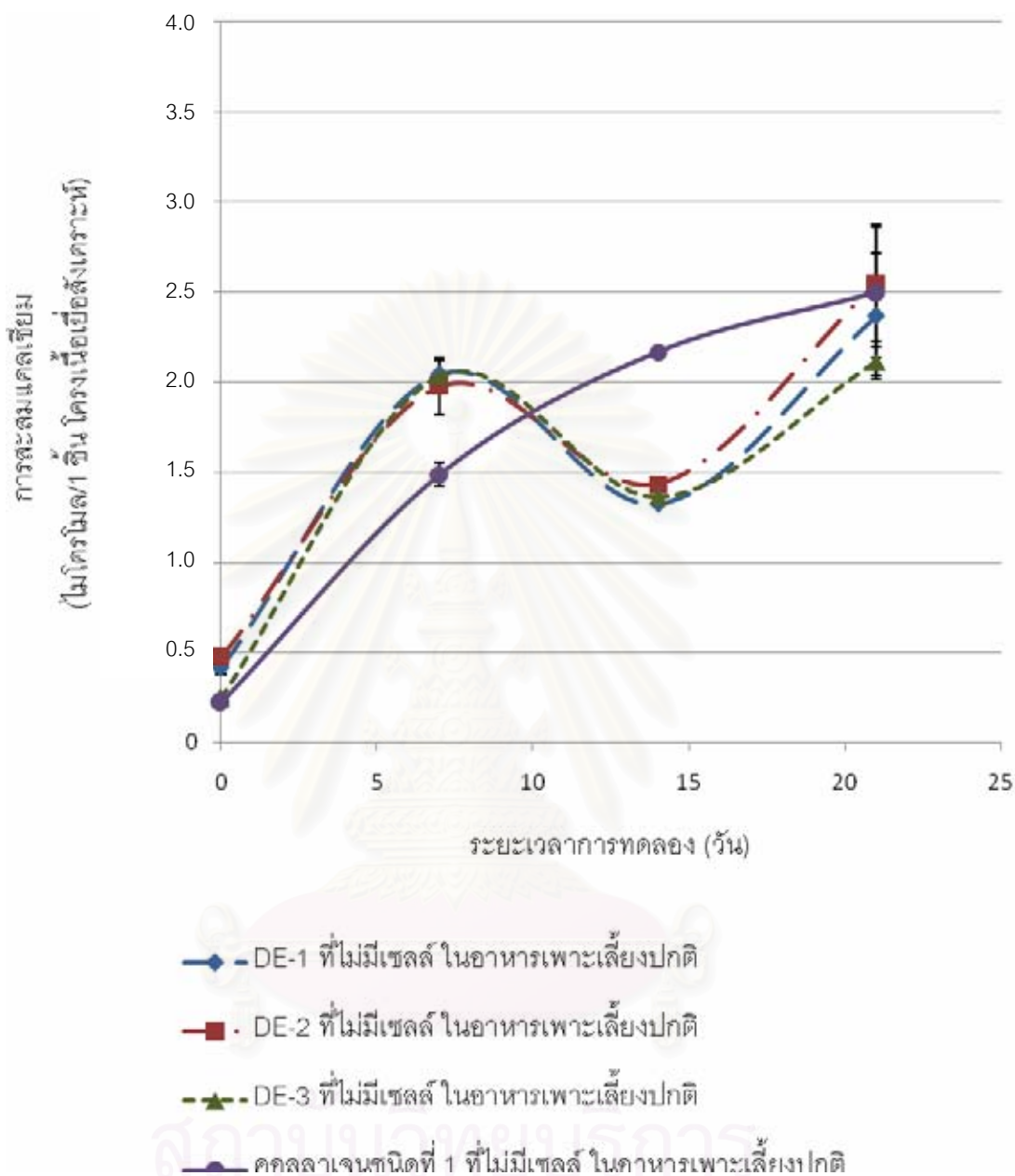
	ชนิดโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์	ปริมาณการสะสมแคลเซียม (ไมโครโมล/1 ชิ้นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์) เมื่อทดลองเป็นเวลา			
		0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ	DE-1	0.4114 ±0.0335	2.0434 ±0.0201	1.3253 ±0.0015	2.3689 ±0.3500
	DE-2	0.4713 ±0.0313	1.9781 ±0.1589	1.4353 ±0.0015	2.5504 ±0.3238
	DE-3	0.2468 ±0.0142	2.0345 ±0.0849	1.3638 ±0.0015	2.1158 ±0.0797
	คอลลาเจนชนิดที่ 1	0.2199 ±0.0123	1.4881 ±0.0679	2.1686 ±0.0135	2.4986 ±0.3636
ในอาหารชักนำ Osteogenic diff.	DE-1	0.4114 ±0.0335	2.2428 ±0.0395	2.2276 ±0.0041	3.3490 ±0.0027
	DE-2	0.471279 ±0.0313	2.184693 ±0.0322	2.095267 ±0.0108	2.3984 ±0.3743
	DE-3	0.2468 ±0.0142	2.2169 ±0.0377	2.1024 ±0.0054	3.1925 ±0.0376
	คอลลาเจนชนิดที่ 1	0.2199 ±0.0123	1.2216 ±0.0354	2.2276 ±0.0201	3.5332 ±0.1302



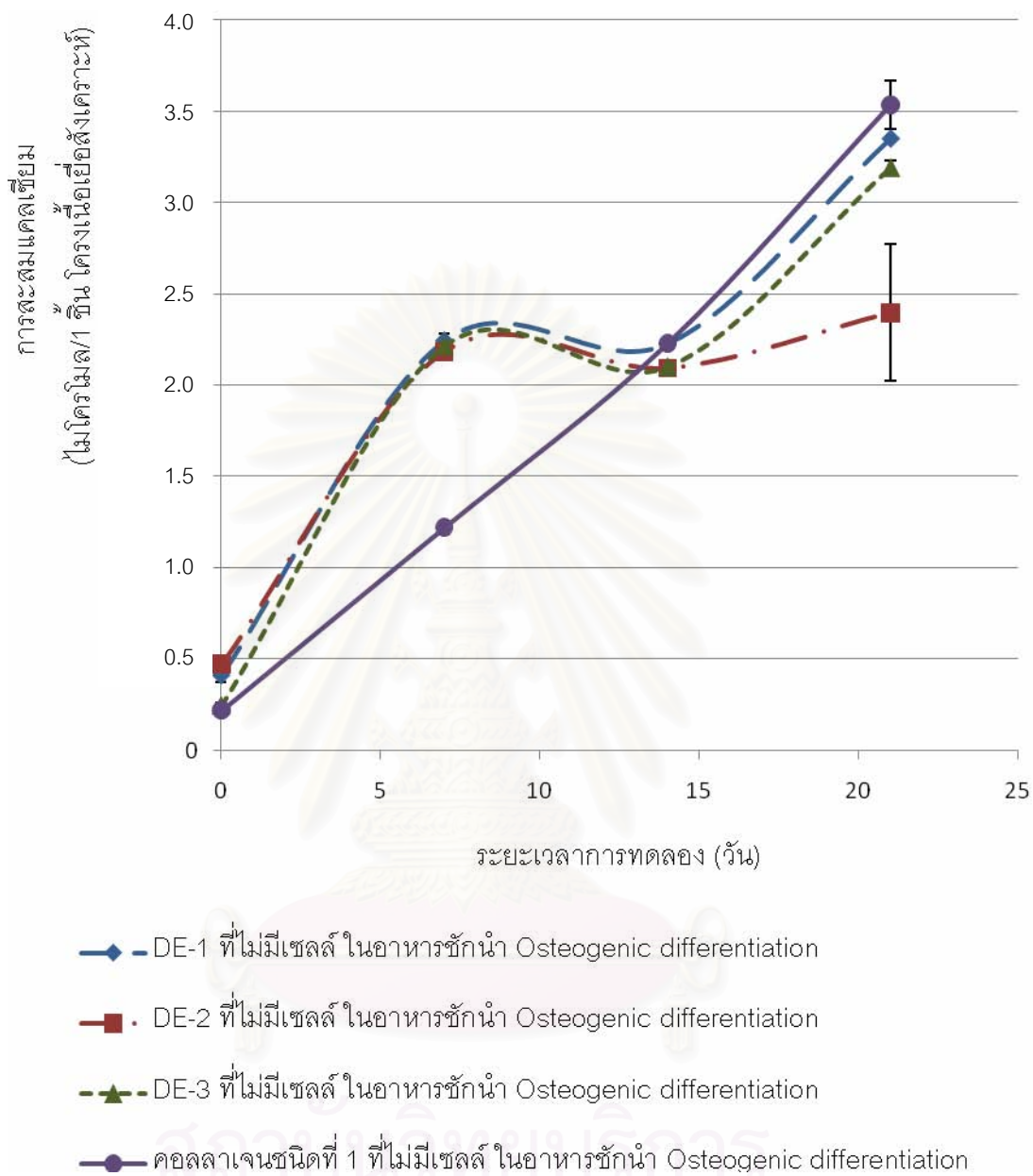
รูปที่ 4.26 ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ



รูปที่ 4.27 ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่มีเซลล์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation

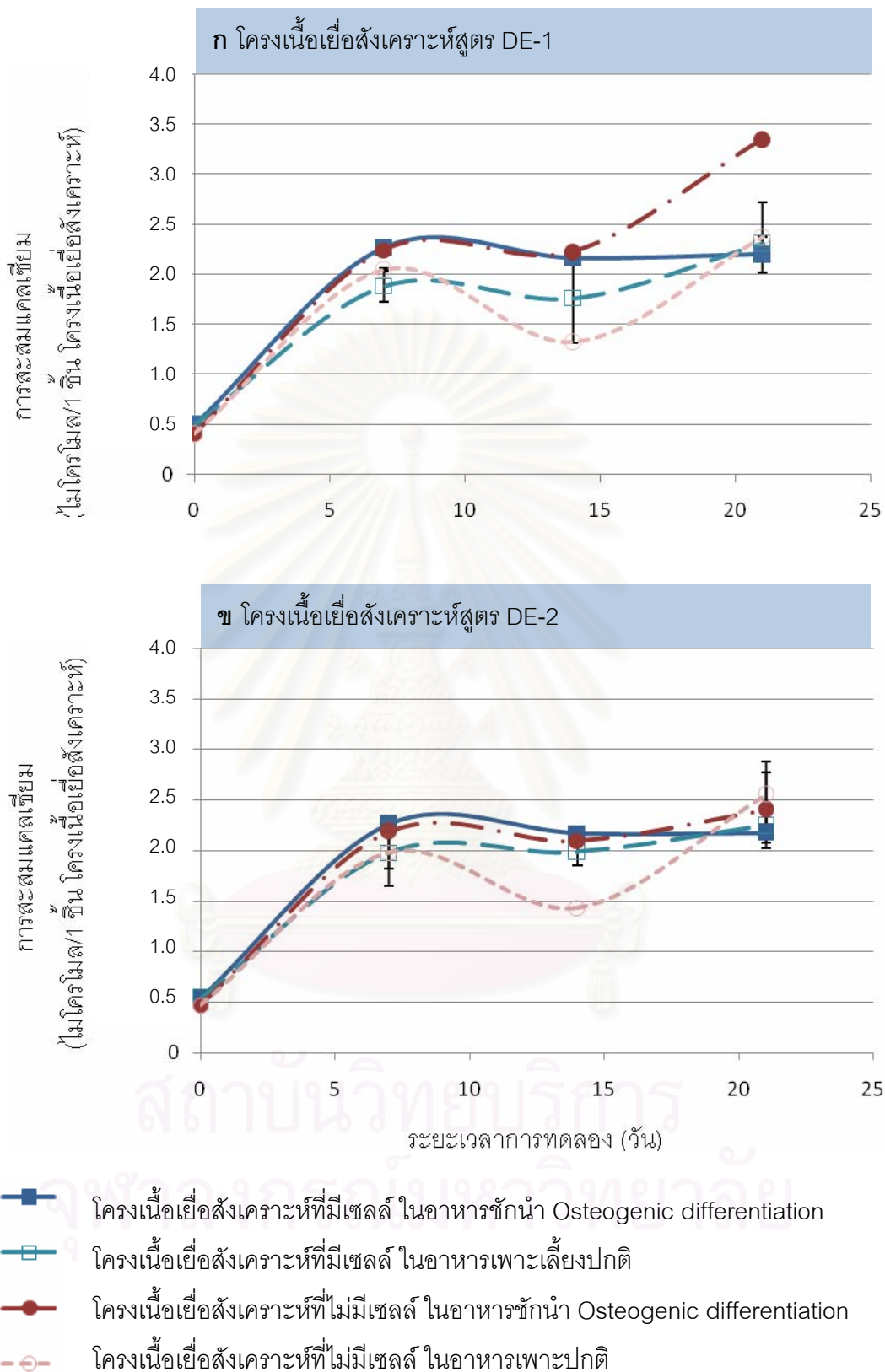


รูปที่ 4.28 ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่ไม่มีเซลล์ ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ

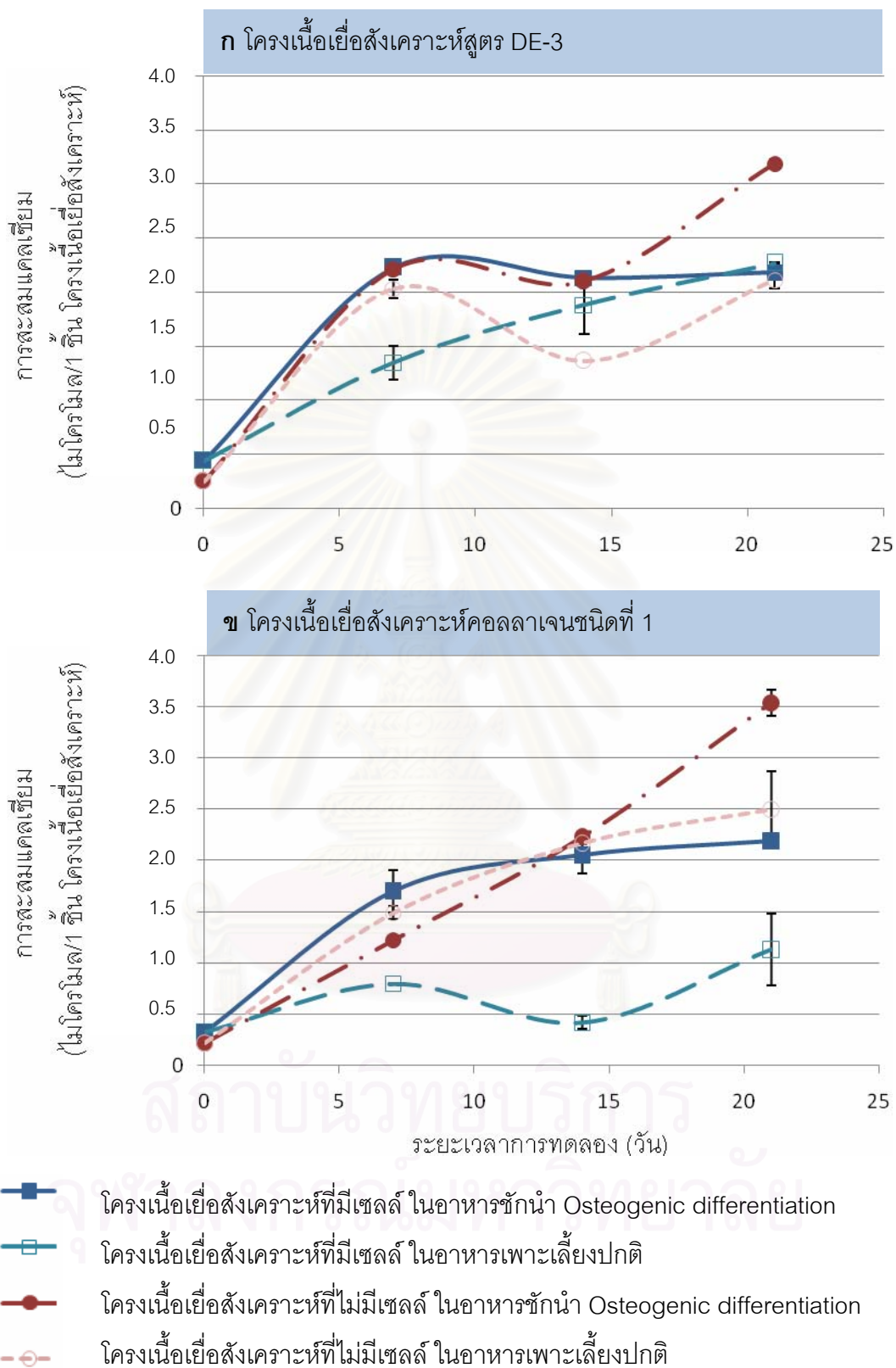


รูปที่ 4.29

ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อกระดูกชนิดต่างๆ ที่ไม่มีเซลล์ ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation



รูปที่ 4.30 ปริมาณการสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ DE-1 (ก) และ DE-2 (ข) ในสภาวะที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.31 ปริมาณการสะสมแคลเซียมภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ DE-3 (ก) และคอลลาเจนชนิดที่ 1(ข) ในสภาวะที่แตกต่างกัน



โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทุกสูตรเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation จะมีการสะสมแคลเซียมในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ ทั้งในกรณีที่มีเซลล์และไม่มีเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation ทั้งในกรณีที่มีเซลล์และไม่มีเซลล์มีปริมาณการสะสมแคลเซียมตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 14 มีปริมาณไม่ต่างกัน แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 21 โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์จะมีการสะสมแคลเซียมสูงที่สุด

ปริมาณการสะสมแคลเซียมในโครงเนื้อเยื่อแต่ละสูตรในทุกสภาวะจะมีการสะสมในปริมาณสูงที่สุดในวันสุดท้ายของการทดลองและสภาวะที่ทำให้เกิดการสะสมแคลเซียมสูงสุดในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทุกสูตรก็คือ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation สำหรับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตร ปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงที่สุดในวันสุดท้ายของการทดลอง ในชุดที่มีเซลล์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation รวมทั้งชุดที่ไม่มีเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation มีปริมาณไม่แตกต่างกัน แต่สำหรับกรณีของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ชุดที่ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติมีการสะสมแคลเซียมต่ำกว่าในสภาวะอื่นๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอนแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

กระบวนการเตรียมสารสกัดจากผิวหนังในงานวิจัยทำให้ได้สารสกัดจากผิวหนัง 3 สูตร กำหนดชื่อเป็น DE-1, DE-2 และ DE-3 สารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรมีความหนาแน่นของเนื้อสารในสารสกัดต่างกัน สารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 มีความหนาแน่นของเนื้อสารเป็น  $9.1991 \pm 0.4181$ ,  $8.9203 \pm 0.2414$  และ  $30.8030 \pm 0.2414$  มก. น้ำหนักแห้ง/มล. ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของ Extracellular matrix ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร พบว่าสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 มีปริมาณคอลลาเจนเป็น 92.2264, 79.0668 และ 161.6823 ไมโครกรัม/มล. น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สำหรับปริมาณ Sulfated Glycosaminoglycans (Sulfated GAGs) ที่พบในสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 มีปริมาณเป็น  $3.0986 \pm 0.5124$ ,  $1.3556 \pm 0.3873$  และ  $6.9073 \pm 0.8733$  ตามลำดับ จากปริมาณของคอลลาเจนและ Sulfated GAGs ที่ได้ เมื่อเทียบสัดส่วนของปริมาณ Sulfated GAGs ต่อปริมาณคอลลาเจน พบว่าสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 มีสัดส่วนของปริมาณ Sulfated GAGs ต่อปริมาณคอลลาเจน เป็นร้อยละ 3.36, 1.71 และ 4.27 ตามลำดับ

สารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตร ถูกนำมาเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตร โดยเทียบคุณสมบัติกับโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากบริษัท Sigma-Aldrich corporation ซึ่งเป็นวัสดุที่นิยมใช้ในเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย เมื่อวิเคราะห์ขนาดของรูพรุนของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ พบว่า โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทุกชนิดที่เตรียมได้มีรูพรุนแบบต่อเนื่อง (Interconnected pore) โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ที่สุด คือ  $188.84 \pm 35.41$  ไมโครเมตร ในขณะที่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เตรียมจากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 มีรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $145.68 \pm 46.86$ ,  $142.54 \pm 45.39$  และ  $97.81 \pm 21.99$  ไมโครเมตร ตามลำดับ วิเคราะห์ความต้านทานแรงกดในรูปของ Compressive modulus พบว่า โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1, DE-2, DE-3 และ คอลลาเจนชนิดที่ 1 มีค่า Compressive modulus เป็น  $145.68 \pm 46.86$ ,  $142.54 \pm 45.39$ ,  $97.81 \pm 21.99$  และ  $188.84 \pm 35.41$  กิโลปาสคาล ตามลำดับ จากการวิเคราะห์การย่อยสลายของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ Collagenase type I พบว่า โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1, DE-2, DE-3 และ คอลลาเจนชนิดที่ 1 ใช้ระยะเวลาในการย่อย

สลายจนมีน้ำหนักเหลือร้อยละ 50 จากน้ำหนักเริ่มต้น เป็น 3.30, 3.30, 6.30 และ 2.57 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากความต้านทานแรงกดและอัตราการย่อยสลายโดยเอนไซม์สรุปได้ว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-3 มีความแข็งแรงที่สุด รองลงมาคือสูตร DE-1 และ DE-2 มีความแข็งแรงใกล้เคียงกัน และโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีความแข็งแรงน้อยที่สุด

เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกสำหรับใช้วิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิดในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ มีจำนวนเซลล์ที่ปรากฏแอนติเจน CD29, CD44, CD71, CD90 และ CD105 เป็นจำนวนร้อยละ 96.33, 98.06, 68.40, 97.49 และ 97.71 ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดตามลำดับ มีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เป็น 1.35 วัน และมีความสามารถในการเกิด Osteogenic differentiation และ Adipogenic differentiation ได้ ในการทดลองการเกิด Osteogenic differentiation เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติและในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติเซลล์ยังคงเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่อง ไม่มีการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และไม่พบการสะสมแคลเซียม ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์แรกแล้วจึงลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่อง มีการแสดงออกของเอนไซม์ Alkaline phosphatase เพิ่มขึ้นสูงในสัปดาห์แรก ลดลงในสัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 สำหรับการสะสมแคลเซียมพบว่าปริมาณการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในสัปดาห์ต่อมา

การวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ต้นกำเนิดพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการเกิด Osteogenic differentiation เมื่อนำเซลล์เข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แล้ววัดจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะได้ภายใน 1 วัน พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดสามารถยึดเกาะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้คือ คอลลาเจนชนิดที่ 1, DE-1, DE-2 และ DE-3 มีจำนวนเซลล์คิดเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่นำเข้าสู่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์เป็น  $89.79 \pm 6.57$ ,  $73.15 \pm 6.72$ ,  $73.15 \pm 4.55$  และ  $72.01 \pm 7.31$  ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ภายในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีจากมากไปน้อยดังนี้ คือ DE-2, คอลลาเจนชนิดที่ 1, DE-1 และ DE-3 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์การเกิด Osteogenic differentiation ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทุกชนิดที่ทดสอบสามารถกระตุ้นการเกิด Osteogenic differentiation ได้ โดยไม่ต้องอาศัยสารเหนี่ยวนำพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation มีปริมาณที่สูงกว่าในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติในทุกชนิดของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

สำหรับการสะสมแคลเซียมพบว่าวัตถุดิบที่ใช้ทำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ สารสกัดจากผิวหนังทั้ง 3 สูตรและคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีคุณสมบัติในการสะสมแคลเซียมได้เองจึงมีปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทุกสูตรที่ไม่มีเซลล์ ลักษณะแนวโน้มของปริมาณการสะสมแคลเซียมในแต่ละสภาวะแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากปริมาณการสะสมแคลเซียมที่สูงที่สุดในวันที่ 21 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทุกชนิดที่ทดสอบ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่ไม่มีเซลล์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation มีปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงที่สุดในกรณีของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ มีเซลล์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation และ ไม่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 มีปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงที่สุดในวันสุดท้ายของการทดลองใกล้เคียงกัน โดยที่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในกรณีที่มีเซลล์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation และในกรณีที่ไม่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติมีปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงที่สุดในวันสุดท้ายของการทดลองใกล้เคียงกันด้วยเช่นกัน สำหรับโครงเนื้อเยื่อจากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ไม่มีเซลล์ในอาหารชักนำ Osteogenic differentiation มีปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงที่สุดในการทดลองนี้ ในขณะที่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติมีการสะสมแคลเซียมต่ำที่สุดในการทดลองนี้ด้วยเช่นกัน

จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1, DE-2 และ DE-3 ในด้านขนาดของรูพรุน ความต้านทานแรงกด และ ระยะเวลาการย่อยสลายโดยเอนไซม์ พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 และ DE-2 ให้ผลใกล้เคียงกันมากซึ่งเป็นผลมาจากความหนาแน่นของเนื้อสารใกล้เคียงกัน ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์พบว่าโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร DE-1 และ DE-3 ให้ผลใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เป็นเพราะโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ทั้ง 2 สูตรนี้มีสัดส่วนของปริมาณ Sulfated GAGs ต่อปริมาณคอลลาเจนที่ใกล้เคียงกัน

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรวิเคราะห์องค์ประกอบของ ECM ในสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรเพิ่มเติม
2. เพื่อการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวภาพของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรที่ดีขึ้น ควรเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ให้มีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกัน เช่น ความหนาแน่นของเนื้อสารและขนาดของรูพรุน เป็นต้น

3. การยืดระยะเวลาการทดสอบ Osteogenic differentiation ให้นานยิ่งขึ้นอาจทำให้ได้ข้อมูลที่น่าสนใจบางอย่างซึ่งจะช่วยให้สามารถสรุปผลของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ต่อการเกิด Osteogenic differentiation ได้ดียิ่งขึ้น

### 5.3 งานวิจัยต่อไปในอนาคต

1. ศึกษาการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดในโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แต่ละสูตรให้เกิด Differentiation ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อค้นหาศักยภาพของสารสกัดจากผิวหนังแต่ละสูตรในการพัฒนาเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อวิศวกรรมเนื้อเยื่อของเนื้อเยื่อแต่ละชนิด
2. ปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังโดยการเพิ่มเติมสารบางชนิดลงไปเพื่อเพิ่มคุณสมบัติที่ต้องการให้โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในลักษณะที่ต้องการ
3. ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการกระตุ้นการเกิด Osteogenic differentiation ของโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์จากสารสกัดจากผิวหนังแต่ละชนิดในสัตว์ทดลอง เพื่อยืนยันผลการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ได้

## รายการอ้างอิง

- Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney, Dennis E. Discher. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell 2006; 126:677–689.
- Alan J. Russell and Timothy Bertram. Moving into the Clinic. In: Lanza, Langer, Vacanti, editors. Principles of Tissue Engineering, 3 rd ed. Elsevier Inc., 2007:81-99.
- Andrew T. Taton. Boning up on biology. Nature 2001; 412:491-492.
- Benjamin L. Beckstead, Sheng Pan, Amit D. Bhrany, Andres M. Bratt-Leal, Buddy D. Ratner, Cecilia M. Giachelli. Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 2005; 26:6217–6228
- David A. Carrino, Patrik Onnerfjord, John D. Sandy, Gabriella Cs-Szabo, Paul G. Scott, J. Michael Sorrell, et al. Age-related Changes in the Proteoglycans of Human Skin: Specific cleavage of Decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278(19):17566–17572
- Dai-Chian Chen, Yu-Lin Lai, Shyh-Yuan Lee, Shan-Ling Hung, Hen-Li Chen. Osteoblastic response to collagen scaffolds varied in freezing temperature and glutaraldehyde crosslinking. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2006; 399-409.
- Dominici M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006. 8(4):315-317.

Donald P. Lennon, Arnold I. Caplan. Mesenchymal stem cell for tissue engineering. In: Gordana Vunjak-Novakovic, R. Ian Freshney, editors. Culture of cells for tissue engineering. John Willey & Sons Inc., 2006:23-59.

Ervin H. Epstein, Neil H. Munderloh. Human Skin Collagen: Presence of type I and type III at all levels of the dermis The Journal of Biological Chemistry 1978; 253(5):1336-1337.

Gilles Pauly, Jean-Luc Contet-Audonneau, Philippe Moussou, Louis Danoux, Vincent Bardey, Olga Freis, et. al. Small proteoglycans in the skin: new targets in the fight against skin aging. IFSCC magazine 2008; 11:21-29.

Jager M., T. Feser, H. Denck, R. Krauspe. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on to three different polymers *in vitro*. Annals of Biomedical Engineering 2005; 33(10):1319-1332.

Joanne E. Stewart, D. N. Wheatley, J. D. Holmes, I. F. K. Muir. Purification and identification of a human dermal extract component inhibitory to fibroblast proliferation. Cell Biology International 2001; 25(7):607-612

John Fabianek, Anthony Herp, Ward Pigman. Comparative study of acid mucopolysaccharides in dermal connective tissue of some mammals. Comparative Biochemistry and Physiology 1965; 14:21-28

Jeffrey A. Hubbell. Matrix effects. In: Lanza, Langer, Vacanti, editors. Principles of Tissue Engineering, 3 rd ed. Elsevier Inc., 2007:297-308.

Joshua R. Mauney, Trang Nguyen, Kelly Gillen, Carl Kirker-Head, Jeffrey M. Gimple, David L. Kaplan. Engineering adipose-like tissue *in vitro* and *in vivo* utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. Biomaterials 2007; 28:5280–5290

- K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner. Collagens-structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews 2003; 55:1531– 1546.
- Kyle R. Legate, Eloi Montanez, Oliver Kudlaced, Reinhard Fassler. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signaling. Nature reviews: Molecular cell biology 2006; 7:20-31.
- Linda G. Griffith, Melody A. Swartz. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. Nature reviews : Molecular cell biology 2006; 7:211-224.
- Nancy J. Boudreau, Peter Lloyd Jones. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. Biochemical Journal 1999; 339:481-488.
- Nicholas D. Evans, Eileen Gentleman, Julia M. Pola. Scaffolds for stem cells. Materials today 2006; 9(12):26-33.
- Nichoas W. Marion, Jeremy J. Mao. Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering. Methods in enzymology 2006; 420:339-361.
- O'Brien F. J., B. A. Harley, I. V. Yannas, L. J. Gibson. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffold. Biomaterials 2005; 26:433-441.
- Paul Bornstein, Karl A. Piez. A Biochemical Study of Human Skin Collagen and the Relation between Intra- and Intermolecular Cross-Linking. Journal of Clinical Investigation 1964; 43(9):1813-1823.
- Petreaca M., Manuela Martins-Green. The Dynamics of Cell–ECM Interactions. In: Lanza, Langer, Vacanti, editors. Principles of Tissue Engineering, 3 rd ed. Elsevier Inc., 2007:81-99.



- Raul Fleischmajer, Jerome S. Perlish, Reza I. Bashey. Human dermal Glycosaminoglycans and Aging. Biochimica et Biophysica acta 1972; 279:265-275.
- Robert J. Hay. Cell quantitation and characterization. In: Anthony Atala, Robert P. Lanza, editors. Methods of tissue engineering. Academic Press, 2002:55-84.
- Rocky S. Tuan, Genevieve Boland, Richard Tuli. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Research and Therapy 2002; 5(1):32-45.
- Ruth Kirschstein, Lana R. Skirboll. Stem cells: Scientific progress and future research directions. Terese Winslow 2001; 3(1):173-181.
- Shingo Tajima, Takeji Nishikawa, Hitoshi Hatano, Yutaka Nagai. Distribution of Macromolecular Components in Human Dermal Connective Tissue. Archives of Dermatological Research 1982; 273:115-120.
- Shoufeng Yang, Kah-Fai Leong, Zhaohui Du, Chee-Kai Chua. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. Tissue engineering 2001; 7(6):679-689.
- Stephen F. Badylak. Extracellular Matrix As a Scaffold for Tissue Engineering in Veterinary Medicine: Applications to Soft Tissue Healing. Clinical Techniques in Equine Practice 2004; 3(2):173-181.
- Stephen F. Badylak, Donald O. Freytes, Thomas W. Gilbert. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. Acta Biomaterialia 2009; 5:1-13.
- Wayne A. Orr, Brian P. Helmke, Brett R. Blackman, Martin A. Schwartz. Mechanisms of mechanotransduction. Developmental Cell 2006; 10:11-20.

Yasuhiro Takeuchi, Konosuke Nakayama, Toshio Matsumoto. Differentiation and Cell Surface Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors Are Regulated by Interaction with Matrix Collagen in Murine Osteoblastic Cells. The Journal of Biological Chemistry 1996; 271(7):3938–3944.

<http://astronomy.swin.edu.au/cosmos/S/Sublimation>

[http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108\\_2007\\_Groups/group12/TEModelLarge](http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/TEModelLarge)

<http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/Image122.gif>

[http://www.azonano.com/images/Article\\_Images/ImageForArticle\\_2267\(2\).jpg](http://www.azonano.com/images/Article_Images/ImageForArticle_2267(2).jpg)

<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/255/255chem/255chemistry.htm>

<http://www.boneandcancer.org/Photos%20since%202001-11-2006/multi-stage%20osteogenic%20differentiation.jpg>

<http://www.jlr.org/content/vol43/issue6/images/medium/JLR436cvf1.gif>

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/>

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นามสกุล นายเกษม ธีรภฤตยากร

วันเดือนปีเกิด 24 มิถุนายน พ.ศ.2526

## ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถานศึกษา	ระยะเวลาการศึกษา
ม.1-3	ร.ร.บ้านบึง"อุตสาหกรรมนุเคราะห์" จ.ชลบุรี	พ.ศ.2538-2541
ม.4-6	ร.ร.สามัคคีวิทยาคม จ.เชียงราย	พ.ศ.2541-2544
ปริญญาตรี วท.บ.(เทคโนโลยีชีวภาพ)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง	พ.ศ.2544-2548

## ประสบการณ์ทำงาน

ระยะเวลาการทำงาน	ตำแหน่ง	สถานที่ทำงาน
1-30 ต.ค. 2546	นศ.ฝึกงาน ฝ่ายการผลิตและตรวจสอบคุณภาพ	บ. พรีเมียร์เดรสส์ฟูดส์ จำกัด, จ.นครราชสีมา
1-30 เม.ย. 2557	นศ.ฝึกงาน ฝ่ายวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์	บ. แอดวานส์ สไปรูลิน่า ไบโอ เทคโนโลยี จำกัด, จ.ลำปาง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย