

การขึ้นรูปและคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนจากพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วย  
เจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอลิตินซัลเฟต



นางสาวสิริรัตน์ เพ็ญศิริกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 1 8 7 3 3 1 6 2 0

**FABRICATION AND PROPERTIES OF GELATIN/HYALURONAN/CHONDROITIN  
SULFATE COATED ON POROUS POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD**



Miss Sirirat Pensirikul

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering  
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

**531643**

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การขึ้นรูปและคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนจาก  
พอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/  
คอนไดรอิตินซัลเฟต

โดย

นางสาวสิริรัตน์ เพ็ญศิริกุล

สาขาวิชา

วิศวกรรมชีวเวช

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ สุภผล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบุญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ สุภผล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ทนตแพทย์ ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ทนตแพทย์หญิง ดร.นیرชา สารชวณะกิจ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อิทธิพล แจ่มชัด)

สิริรัตน์ เพ็ญศิริกุล: การขึ้นรูปและคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนจากพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต (FABRICATION AND PROPERTIES OF GELATIN / HYALURONAN / CHONDROITIN SULFATE COATED ON POROUS POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.ดร. พิชญ์ ศุภผล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภาสันต์, 81 หน้า

โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติได้ถูกพิจารณาว่ามีผลต่อการเจริญและการสร้างสารถประกอบนอกเซลล์ของเซลล์ งานวิจัยจึงได้ขึ้นรูปพอลิคาโพรแลกโตนที่มีรูพรุนด้วยการระเหยตัวทำละลายและชะเอาเกลือออก จากนั้นจึงเคลือบพื้นผิววัสดุด้วยผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิ-ตินซัลเฟตด้วยวิธีการแช่แข็งและทำให้แห้ง จากนั้นให้วัสดุเกิดปฏิกิริยาเชื่อมพันธะกันด้วย 1 - เอทิล - 3 (3 - ไดมethylอะมิโนโพรพิล) เพื่อชะลออัตราการย่อยสลายของวัสดุ ประเมินสมบัติทางสัญญาณวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราดพบโครงสร้างที่มีรูพรุนขนาดของรูอยู่ที่ 265-350 ไมครอน ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเซลล์ การศึกษาสมบัติทางเคมีพื้นผิวด้วยการวิเคราะห์หุ้มสัมผัสของน้ำสามารถยืนยันได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินอยู่บนพื้นผิวมีความชอบน้ำมากขึ้นกว่าวัสดุพอลิคาโพรแลกโตน ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำแสดงให้เห็นถึงการดูดซับน้ำได้มากขึ้นของวัสดุเจลาตินที่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะจากการประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพพบว่าวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิคาโพรแลกโตนและพอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และยังช่วยก่อกวนการเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดโพรงพื้นบนพื้นผิววัสดุได้ดีขึ้นอีกด้วย

สาขาวิชา.....วิศวกรรมชีวเวช.....ลายมือชื่อนิสิต.....สิริรัตน์ เพ็ญศิริกุล  
ปีการศึกษา.....2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....P. S. S.  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....ประสิทธิ์ ภาสันต์

# # 5187331620 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS : GELATIN / POLYCAPROLACTONE / SCAFFOLD / TISSUE  
ENGINEERING

SIRIRAT PENSIRIKUL: FABRICATION AND PROPERTIES OF GELATIN /  
HYALURONAN / CHONDROITIN SULFATE COATED ON POROUS  
POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD. THESIS ADVISOR: PROFESSOR  
PITT SUPAPHOL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR  
PRASIT PAVASANT, Ph.D., 81 pp.

Three dimensional scaffolds have been considered to have certain effects on cell growth and the secretion of extracellular matrices (ECMs). In this study, a porous polycaprolactone (PCL) was fabricated by solvent casting and particulate leaching method which incorporated with gelatin-hyaluronate-chondroitin sulfate on its surface by freeze-drying method. To decline degradation rate, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimine (EDC) was used in crosslink system. Scanning electron microscope (SEM) was used to investigate morphology. The scaffold showed pore size between 265-350  $\mu\text{m}$ , which preferable for cell culturing. Chemical property analysis confirmed greater hydrophilicity than polycaprolactone surface. Scaffold with crosslinked gelatin demonstrated better water absorption. Biocompatibility evaluation by human dental pulp cell indicated no toxicity of porous PCL scaffolds and PCL with gelatin-hyaluronate-chondroitin sulfate. In addition, gelatin-hyaluronate-chondroitin sulfate on PCL scaffold also supported cell attachment.

Field of Study : Biomedical Engineering... Student's Signature ศิริรัต เพ็ญศิริกุล  
Academic Year : 2010..... Advisor's Signature Prasit Pavasant

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยและวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความความกรุณาจาก ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ สุภผล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับ วิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นिरชา สารชวณะกิจ และรองศาสตราจารย์ ดร.อิทธิพล แจ่มชัด ที่ยินดีสละ เวลาในการตรวจทานแก้ไข คำแนะนำเป็นประโยชน์สำหรับวิทยานิพนธ์เป็นประโยชน์สำหรับ วิทยานิพนธ์ และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ สำนักงานกองทุนสนับสนุน การวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ โครงการพัฒนาวัสดุโครงสร้างกระดูกเทียม สำหรับงานทันตกรรมและสัตวภิบาล

ขอขอบคุณ วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการ เอื้ออำนวยความสะดวกที่ทำวิจัยและเครื่องมือต่างๆ เจ้าหน้าที่ดูแลเครื่องมือวิทยาลัยปิโตรเลียมและ ปิโตรเคมีที่ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคการใช้เครื่องมือต่างๆ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก สำหรับการเอื้ออำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ เพื่อนและรุ่นพี่กลุ่มวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ สุภผล ที่คอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และกำลังใจ รุ่นพี่กลุ่ม ปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออินทรีย์คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการ ดูแลและสถานที่ปฏิบัติการ

ขอขอบคุณความช่วยเหลือและเงินทุนสนับสนุนตลอดการวิจัยจากคุณพ่อคุณแม่ ผู้วิจัย ขอระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นและบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีสำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 การทดลอง.....	32
3.1 เครื่องมือ.....	32
3.2 สารเคมีสารเคมีที่ใช้เตรียมวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์.....	32
3.3 สารเคมีใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์.....	33
3.4 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุน.....	33
3.5 การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนที่มี พอลิเมอร์ผสมเจลาติน-ไฮยาลูโรแนน-คอนโตรอลิตินซัลเฟต.....	34
3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ .....	34
3.6.1 อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FTIR).....	34
3.6.2 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุและขนาดของรู .....	35
3.6.3 ความพรุนและปริมาตรของรู.....	35
3.6.4 ทดสอบสมบัติเชิงกล.....	36
3.6.5 สมบัติการชอบน้ำของพื้นผิววัสดุ.....	36
3.6.6 ความสามารถในการดูดซับน้ำ.....	36
3.6.7 ทดสอบการย่อยสลาย.....	36
3.7 การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพ.....	37

3.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน.....	37
3.7.2 ความเป็นพิษของวัสดุต่อเซลล์ .....	38
3.7.3 การเกาะและการเจริญของเซลล์.....	39
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	40
4.1 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนจากพอลิคาโพรแลกโตน ที่มีเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต.....	40
4.2 การวิเคราะห์ทางอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี.....	43
4.3 การตรวจสอบคุณลักษณะของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์.....	48
4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์.....	48
4.3.2 ความสามารถในการชุ่มน้ำของพื้นผิววัสดุ.....	52
4.3.3 การทดสอบสมบัติเชิงกลของวัสดุ.....	55
4.3.4 ความสามารถในการดูดซับน้ำ.....	57
4.3.5 การย่อยสลายของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ .....	58
4.4 การประเมินสมบัติทางชีวภาพ.....	60
4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษ.....	61
4.4.2 การเกาะและการเจริญของเซลล์.....	62
4.4.3 การศึกษารูปร่างของเซลล์บนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์.....	67
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	70
รายการอ้างอิง.....	72
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	81



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของการนำเจลาตินไฮโดรเจลไปแช่แข็ง ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 12
2.2	แสดงขนาดของรูจากการcrosslink โคร่งเลี้ยงเซลล์ด้วย ginipin ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 13
4.1	แสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของโคร่งเลี้ยงเซลล์หลังเคลือบด้วย เจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 43
4.2	ความพรุนของโคร่งเลี้ยงเซลล์และปริมาตรของรูที่หาได้จากการคำนวณ จากค่าความหนาแน่นของโคร่งเลี้ยงเซลล์..... 51
4.3	แสดงค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินในขั้นตอนการขึ้นรูป โคร่งเลี้ยงเซลล์..... 51
4.4	แสดงค่ามุมมองคาของน้ำบนพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตนหลังจากแช่ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หนึ่งโมลาร์..... 53
4.5	แสดงสมบัติทางเชิงกลของวัสดุโคร่งเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตน..... 55

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.4	แผนผังแสดงกระบวนการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ..... 6
2.2	ตัวอย่างการขึ้นรูปโครงเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ..... 9
2.3	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพอลิคาโพรแลกโตน..... 11
2.4	ค่ามุมสัมผัสของ PCL ที่เวลาต่างๆของการไฮโดรไลซ์ด้วย NaOH..... 11
2.5	แสดงสมบัติเชิงกลของ PCL ที่ไฮโดรไลซ์ด้วย NaOH..... 11
2.6	ไฮโดรเจลจากการแช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C..... 12
2.7	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ GTA กับเจลาติน..... 14
2.8	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ EDC กับเจลาติน..... 14
2.9	แสดงปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของพอลิคาโพรแลกโตน..... 17
2.10	กระบวนการผลิตเจลาติน..... 20
2.11	โครงสร้างทางเคมีของเจลาติน..... 20
2.12	โครงสร้างทางเคมีของไฮยาลูโรนิก..... 21
2.13	โครงสร้างของ ECM..... 22
2.14	โครงสร้างของคอนไดรอิตินซัลเฟต..... 23
2.15	โครงเลี้ยงเซลล์รูปพรุนที่ทำจากพอลิเมอรร่วมระหว่างเจลาติน- คอนไดรอิตินซัลเฟต-ไฮยาลูโรแนน..... 24
2.16	โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน-คอนไดรอิตินซัลเฟตจาก SEM..... 25
2.17	โครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน-ไคโตซาน-ไฮยาลูโรแนน จาก SEM..... 26
2.18	โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนจาก SEM..... 27
2.19	กราฟการแสดงออกของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกัน..... 27
2.20	ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ PLLA..... 29
2.21	โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ทำจาก PLGA..... 29
4.1	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพอลิคาโพรแลกโตน..... 40
4.2	(ก) FTIR spectra ของเจลาติน..... 44
	(ข) FTIR spectra ของไฮยาลูโรนิก..... 45

(ค) FTIR spectra ของคอนไดรอินซัลเฟต.....	45
(ง) ATR-FTIR spectra ของโครงพอลิคาโปรแลกโตน.....	46
(จ) ATR-FTIR spectra ของโครงพอลิคาโปรแลกโตนที่ไฮโดรไลซ์ ด้วย NaOH.....	46
(ฉ) ATR-FTIR spectra ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตน เคลือบด้วยเจลาติน.....	47
(ช) ATR-FTIR spectra ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตน เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนไดรอินซัลเฟต.....	47
4.3 แสดงภาพถ่ายจาก SEM ของโครงเลี้ยงที่ขึ้นรูป.....	50
4.4 แสดงมุมมองคาของหยดน้ำที่เกาะบนพื้นผิววัสดุ.....	53
4.5 แสดงกราฟเปรียบเทียบมุมมองคาของน้ำบนพื้นผิววัสดุพอลิคาโปรแลกโตน หลังจากแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลาต่างๆ	54
4.6 แสดงกราฟมุมมองคาของน้ำบนพื้นผิววัสดุพอลิคาโปรแลกโตนที่มีเจลาติน ความเข้มข้นต่างกันอยู่บนพื้นผิวที่ระยะเวลาต่างๆ.....	55
4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตน เคลือบด้วยเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	58
4.8 แสดงปริมาณน้ำหนักที่ลดลงของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตน ที่มีเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในสภาวะที่มีแรงเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	59
4.9 แสดงกราฟจากการทดสอบความเป็นพิษทางอ้อมของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ พอลิคาโปรแลกโตนและพอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยการประเมินจากจำนวนของ Dental Pulp Cell ที่มีชีวิตอยู่เมื่อเลี้ยงใน มีเดียที่แช่วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละตัวอย่าง.....	62
4.10 แสดงกราฟการเกาะของ Dental Pulp Cell ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงและ วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนและพอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบ ด้วยสารละลายเจลาตินเป็นเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง.....	65
4.11 แสดงกราฟการเจริญของ Dental Pulp Cell ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงและ วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนและพอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบ	

- วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนและพอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบ  
ด้วยสารละลายเจลาตินเป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน..... 66
- 4.12 ภาพจาก SEM แสดงการเกาะของ Pulp Cell บนพื้นผิววัสดุ  
โครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตน พอลิคาโปรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์  
ด้วยเบส พอลิคาโปรแลกโตนที่เจลาติน 4%เคลือบอยู่และพอลิคาโปรแลกโตน  
ที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิตินซัลเฟตที่มีรูพรุน  
ในระยะเวลาการหว่านเซลล์ 2, 4 และ 6 ชั่วโมง..... 67
- 4.13 ภาพจากSEM แสดงการเจริญของ Pulp Cell บนพื้นผิววัสดุ  
โครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตน พอลิคาโปรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์  
ด้วยเบส พอลิคาโปรแลกโตนที่เจลาติน 4%เคลือบอยู่ และพอลิคาโปรแลกโตน  
ที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิตินซัลเฟต ที่มีรูพรุน  
ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วัน..... 68

## บทที่ 1

### บทนำ



#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความเสียหายบริเวณเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างของอวัยวะเป็นปัญหาที่พบบ่อย อาจมีสาเหตุมาจากอุบัติเหตุที่มีการบาดเจ็บและฉีกขาดของเนื้อเยื่อ หรืออาจเกิดจากโรคบางชนิดที่ส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดความเสียหาย เนื้อเยื่อที่บกพร่องเพียงเล็กน้อยสามารถซ่อมแซมตัวเองได้โดยใช้เวลาไม่นาน หรือไม่ส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตของผู้ป่วย แต่ผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายมากจนส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตประจำวันและใช้เวลานานมากในการรักษา หรือถ้าปล่อยทิ้งไว้อาจทำให้อาการทรุดหนักมากขึ้นนั้น ต้องการวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ สามารถซ่อมแซมเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการรักษา

หนึ่งในโครงสร้างของอวัยวะที่พบปัญหาความบกพร่องบ่อยได้แก่เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (cartilage) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุหรือผู้ที่มีน้ำหนักมากมักประสบปัญหาโรคข้อเสื่อมหรือโรคไขข้ออักเสบ นอกจากนี้อุบัติเหตุต่างๆ เช่นจากการเล่นกีฬายังก่อให้เกิดปัญหาในผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรงอีกด้วยเนื่องจากโครงสร้างกระดูกอ่อนไม่มีระบบประสาท ระบบนำเลือด และระบบเลือดมาหล่อเลี้ยงทำให้การซ่อมแซมตัวเองและการสร้างเนื้อเยื่อดังกล่าวขึ้นมาใหม่จึงเป็นไปได้ยาก การบาดเจ็บเพียงเล็กน้อยอาจทำให้เนื้อเยื่อเกิดความเสียหายมากขึ้นและเสื่อมไปแพทย์จึงพยายามบำบัดผู้ป่วยจากการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนที่บริเวณข้อต่อด้วยวิธีต่างๆ อย่างเช่น microfracture [1], mosaicplasty [2], autologous chondrocyte transplantation (ACT) [3] หรือ osteochondral allograft transplantation [4] เพื่อชะลอการผ่าตัดเปลี่ยนข้อใหม่ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอายุน้อย และเพื่อให้ผู้ป่วยกลับมาใช้ชีวิตประจำวันได้ตามปกติ แม้ว่าวิธีเหล่านี้จะช่วยลดความเจ็บปวด และช่วยให้ข้อต่อทำงานได้ดีขึ้น แต่ผลลัพธ์ที่ได้จากเทคนิควิธีการรักษาต่างๆ นั้นมีข้อจำกัดบางประการ [5] อย่างเช่นกระดูกอ่อนที่สร้างขึ้นจากเทคนิคเหล่านี้มักจะผลิตคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง (เป็นลักษณะของ fibrocartilage) ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางเชิงกลด้อยกว่าชนิดไฮยาลิน (hyaline) [6] นอกจากนี้ยังไม่สามารถทำให้เนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นมามีลักษณะเหมือนกับโครงสร้างของกระดูกอ่อนที่มีอยู่เดิม ปัญหาอื่นๆ ของเทคนิคการรักษาเหล่านี้รวมถึงกระบวนการผ่าตัดที่ยุ่งยากและเสี่ยงต่อการติดเชื้อ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะเข้ามามีบทบาททางการแพทย์เมื่อไม่นานมานี้ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ การเจริญของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อ และปัจจัยการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่แทนที่เนื้อเยื่อเก่าที่เสียไป ข้อดีของการนำโครงเลี้ยงเซลล์มาใช้ก็คือ ช่วยกึ่งหนุนเซลล์บริเวณที่บกร่อง เนื่องจากเซลล์ต้องการที่ยึดเกาะโครงเลี้ยงเซลล์จึงเป็นบริเวณที่เซลล์มาอยู่รวมกันและเพิ่มจำนวนจนเกิดเป็นเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ เมื่อเซลล์สามารถลั้งของเหลวที่ช่วยค้ำจุนเซลล์ออกมาได้เอง โครงเลี้ยงเซลล์ก็จะค่อยๆ เสื่อมสลายไป นอกจากนี้สารที่ได้จากการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ยังสามารถใช้เป็นระบบนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างโกรทแฟกเตอร์ (growth factor) ได้อีกด้วย

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปในส่วนของการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการทางเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยขั้นตอนการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสม และเทคนิคที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อพัฒนาให้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพ ช่วยกึ่งหนุนเซลล์ได้ วัสดุที่นิยมนำมาใช้ทำโครงเลี้ยงเซลล์เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ซึ่งอาจเป็นวัสดุชีวภาพที่ได้จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนไดรอตินซัลเฟต
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปได้
3. เพื่อศึกษาพฤติกรรมของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปได้

### 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. อัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุที่ใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/ คอนโตรอิตินซัลเฟต
2. ความพรุนของรู ขนาดของรู และความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์
3. สมบัติความชอบน้ำ การดูดซับน้ำ และการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์
4. การเกาะและการเจริญของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์

### 1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนและเคลือบพื้นผิววัสดุด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิตินซัลเฟต
3. ศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้
4. ประเมินสมบัติทางชีวภาพความเข้ากันได้กับเซลล์
5. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. โครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิตินซัลเฟตที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน
2. โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีความเข้ากันได้กับเซลล์ สามารถนำไปพัฒนาและศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้



## บทที่ 2

### ทฤษฎีสำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ

##### 2.1.1 หลักการพื้นฐานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ความก้าวหน้าทางด้านชีวเคมี เซลล์และชีวโมเลกุล พันธุศาสตร์ และวัสดุศาสตร์มารวมกันทำให้เกิดเทคโนโลยีใหม่ขึ้นที่เรียกว่า "วิศวกรรมเนื้อเยื่อ" ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีการนำวัสดุชีวภาพมาใช้ซึ่งอาจเป็นวัสดุจากธรรมชาติหรือวัสดุประเภทสังเคราะห์เพื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือบกพร่องเช่นกระดูก ผิวหนัง และแม้แต่อวัยวะ วัสดุจากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ถูกนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อปลูกใส่เข้าไปในร่างกายเป็นโครงสร้างชั่วคราว มีหน้าที่ช่วยเป็นแม่แบบให้เซลล์ในร่างกายเข้ามาเติบโตและเกิดเป็นเนื้อเยื่อใหม่ขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์จะค่อยๆ สลายและถูกดูดซึมไป ในทางการแพทย์ต้องการให้เทคโนโลยีทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีความก้าวหน้าและพัฒนาเป็นทางเลือกหนึ่งของการรักษาพยาบาลผู้ป่วยเนื่องจากเป็นวิธีที่จะช่วยให้ผู้ป่วยมีโอกาสได้รับการรักษาดีกว่าการรอคอยเปลี่ยนถ่ายอวัยวะเพียงอย่างเดียว เพราะขาดแคลนอวัยวะผู้บริจาคและขาดแคลนค่าใช้จ่ายที่สูง นอกจากนี้การเปลี่ยนถ่ายได้อวัยวะที่ไม่ดียังทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการอยู่รอดต่ำ

##### 2.1.2 สิ่งจำเป็นสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

การพัฒนาศาสตร์แขนงต่างๆ ที่เกี่ยวกับวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างมีประสิทธิภาพทำให้สามารถสร้างเนื้อเยื่อเกิดขึ้นมาใหม่ได้ เทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อต้องการวัสดุชีวภาพเซลล์ ปัจจัยที่ทำให้เซลล์โตและมีพัฒนาการ และสภาวะที่คล้ายกับของจริงตามธรรมชาติเข้ามาช่วยเพิ่มโอกาสในการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ในห้องปฏิบัติการจากการใช้โครงเลี้ยงเซลล์และโมเลกุลออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

##### 2.1.2.1 โครงเลี้ยงเซลล์

โครงร่างเทียมมีหน้าที่เกื้อหนุนการเจริญของเนื้อเยื่อในลักษณะสามมิติวัตถุประสงค์ของการใช้โครงเลี้ยงเซลล์เพื่อประโยชน์ดังนี้ ให้เซลล์เกาะและเคลื่อนที่ ช่วยนำส่ง



สารอาหารที่จำเป็นแก่เซลล์และปัจจัยออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีสมบัติทางชีวภาพและทางเชิงกล ส่งผลต่อพฤติกรรมการพัฒนาของเซลล์เข้าสู่ระยะต่าง ๆ

#### 2.1.2.2 เซลล์

ชนิดของเซลล์ที่นำมาใช้ขึ้นกับความเหมาะสมว่าต้องการให้เจริญไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดใดนอกจากนี้ การนำเซลล์มาใช้ในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อยังมีที่มาของเซลล์ได้จากหลายแหล่งด้วยกัน เช่น เซลล์ได้มาจากอวัยวะส่วนอื่นของตัวอย่างเดียวกัน (autologous) เซลล์ที่มาจากอวัยวะของตัวอย่างต่างกันแต่มีสปีชีส์เดียวกัน (allogeneic) หรือเซลล์ที่มาจากตัวอย่างต่างสปีชีส์กัน (xenogenic)

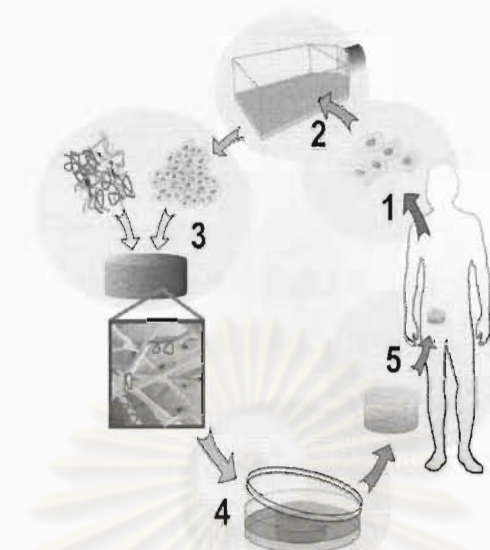
#### 2.1.2.3 ปัจจัยออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารที่มีอยู่ในธรรมชาติ มีหน้าที่ช่วยกระตุ้นให้เซลล์โต เพิ่มจำนวน และ differentiate มักเป็นสารจำพวกโปรตีนหรือฮอร์โมนสเตียรอยด์ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการต่างๆ ของเซลล์

#### 2.1.3 กระบวนการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

กระบวนการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีขั้นตอนคร่าวๆดังต่อไปนี้ (ดูภาพที่ 2.1)

- 1) การสกัดเอาเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างสิ่งมีชีวิต (isolation)
- 2) การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ (monolayer tissue culture)
- 3) การนำเซลล์มาเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปได้ เพื่อให้เซลล์แผ่ขยายเพิ่มจำนวน
- 4) เซลล์เจริญมากขึ้นบนโครงจนมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่มีรูปร่างคล้ายกับโครงที่ใช้เลี้ยงเซลล์
- 5) นำชิ้นวัสดุที่เซลล์เจริญเป็นเนื้อเยื่อเทียมใส่เข้าไปในบริเวณร่างกายผู้ป่วย



ภาพที่ 2.1 แผนผังแสดงกระบวนการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [ภาพจาก Julian, et al., 2006 [7]] จากภาพแสดงถึงขั้นตอนสำคัญของการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อตั้งแต่การสกัดเอาเซลล์ (1) การเพาะเลี้ยงเซลล์ (2) ขยายจำนวนโดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ (3) เพาะเลี้ยงจนเป็นเนื้อเยื่อเทียม (4) และนำไปฝังในร่างกายผู้ป่วย (5) (ดูรายละเอียดข้างต้น)

## 2.2 กระดูกอ่อน

### 2.2.1 ชนิดของกระดูกอ่อน

ภายในโครงสร้างกระดูกอ่อนประกอบด้วยเซลล์คอนโดโรไซต์ (chondrocyte) กระจายอยู่ภายในสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์หนาแน่น (dense extracellular matrix) ประกอบไปด้วย เส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) และเส้นใยอีลาสติน (elastin fiber) กระดูกอ่อนจึงถูกจำแนกตามความแตกต่างของจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบเหล่านี้ได้สามประเภท

2.2.1.1 Hyaline cartilage มีลักษณะค่อนข้างแข็ง โปร่งแสง เต็มไปด้วยคอลลาเจนชนิดที่สอง (collagen type II) และคอนโดโรอิตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) กระดูกอ่อนชนิดนี้ปกคลุมส่วนปลายของกระดูกเป็นผิวเรียบบริเวณข้อต่อ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ที่บริเวณจมูก กล่องเสียง และระหว่างซี่โครงและกระดูกหน้าอก การเจริญของกระดูกจะมีช่วงกลางที่ผ่านระยะนี้

2.2.1.2 Elastic cartilage ประกอบด้วยเส้นใยอีลาสตินจำนวนมากกระจายอยู่ตามเมทริกซ์ (matrix) แต่ยังไม่แข็งเท่าเส้นใย มีความสำคัญในการป้องกันโครงสร้างที่เป็นท่อจากการทรุดตัว กระดูกอ่อนชนิดนี้สามารถพบได้ที่ใบหู โครงสร้างที่เป็นท่อ เช่น ท่อยูสเตเชียน (Eustachian) และในฝาปิดกล่องเสียง

2.2.1.3 Fibrocartilage มีลักษณะเป็นสีขาว เหนียวมากจึงมีแรงในการยืดสูงมาก นอกจากคอลลาเจนชนิดที่สองแล้วยังพบคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งประสานกันอยู่อย่างหนาแน่น เมื่อเทียบกับกระดูกอ่อนชนิด hyaline กระดูกอ่อนชนิดนี้มีปริมาณคอลลาเจนมากกว่า แต่มีโปรติโอไกลแคนน้อยกว่ากระดูกอ่อนชนิดอื่น ดังนั้นมันจึงมีสมบัติใกล้เคียงกับเอ็นและสามารถพบได้ในบริเวณที่มีแรงกดทับอย่างเช่นหมอนรองกระดูกสันหลัง

ภายในโครงสร้างกระดูกอ่อนที่เต็มไปด้วยโมเลกุลโปรติโอไกลแคน (proteoglycan) ซึ่งมีประจุลบจากหมู่ซัลเฟตและคาร์บอกซิลขนาดใหญ่ แรงผลักรันของประจุจะทำให้โมเลกุลโปรติโอไกลแคนทางออกภายในโครงร่างคอลลาเจน เมื่อกระดูกอ่อนถูกกด บริเวณประจุบนโครงร่างโมเลกุลโปรติโอไกลแคนจะถูกผลักเข้าไปใกล้กันมากขึ้น ซึ่งทำให้เพิ่มแรงผลักรันและเพิ่มความแข็งที่อัดแน่นภายในกระดูกอ่อน ยังโมดูลัสของกระดูกอ่อนอยู่ในช่วง 0.45-0.80 MPa [8] ระดับน้ำหนักที่รับได้ในบริเวณข้อต่อขึ้นกับตำแหน่งในร่างกาย สะโพกรับแรงได้อยู่ที่ประมาณ 3.3 เท่าของน้ำหนักตัวบุคคล เข่ารับน้ำหนักได้ประมาณ 3.5 เท่าของน้ำหนักตัว ข้อเท้า 2.5 เท่าของน้ำหนักตัว และไหล่ 1.5 เท่าของน้ำหนักตัว [9] จากการทดลองแรงอัดที่ให้กับสะโพกปกติมีค่า 7-10 เมกะปาสคาล (MPa) และสามารถวัดได้ค่าถึง 18 เมกะปาสคาล [10] ระหว่างการทำกิจกรรมที่เต็มไปด้วยแรงบีบเช่นลุกขึ้นยืน

## 2.2.2 การบาดเจ็บที่กระดูกอ่อนและแนวทางการรักษา

ปัญหาการบาดเจ็บและสูญเสียเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่พบบ่อยได้แก่เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อเข่าซึ่งผู้ป่วยโรคของกระดูกอ่อนที่พบได้บ่อยที่สุดโรคหนึ่งได้แก่ โรคข้อเสื่อมและการบาดเจ็บ แต่เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีข้อจำกัดในการซ่อมแซมตัวเอง เซลล์คอนโดโรไซต์ไม่สามารถเคลื่อนที่มายังบริเวณที่เสียหาย ทำให้เนื้อเยื่อที่บกพร่องถูกรักษาได้ยาก ในผู้ป่วยอายุมากใช้วิธีศัลยกรรมตกแต่งข้อเป็นหนึ่งในแนวทางการรักษา ซึ่งเป็นการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเป็นข้อเทียมที่มักทำจากวัสดุโลหะผสมเหล็กกล้าไร้สนิมหรือพอลิเอทิลีนน้ำหนักโมเลกุลมาก สำหรับวิธีการปลูกถ่ายเซลล์คอนโดโรไซต์จากเนื้อเยื่อตัวเอง Marlovits และคณะ [11] พบว่าให้ผลดีใน

การรักษาโรคของเนื้อเยื่อบาดเจ็บข้อเข่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่าได้ โดยสามารถซ่อมแซม เกิดเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเหมือน hyaline ได้ แต่มีข้อจำกัดในผู้ป่วยที่มีอายุมากและผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม

### 2.3 โครงเลี้ยงเซลล์

เมื่อเนื้อเยื่อถูกทำลายหรือเสียหายมาก เซลล์จำนวนมากและเมทริกซ์ในเนื้อเยื่อซึ่งมักเรียกว่า “Extracellular matrix” (ECM) จะสูญเสียไปด้วย จึงเป็นที่มาของการสร้าง ECM เทียมให้กับเซลล์เพื่อให้เซลล์สร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ได้ เซลล์ที่สกัดแยกออกมาได้มีความสามารถในการสร้างโครงเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ แต่มีข้อจำกัดเมื่อให้เซลล์ลอยอยู่บนเนื้อเยื่อ เพราะเซลล์ต้องการแม่แบบช่วยนำทางให้เซลล์จัดเรียงตัวได้ ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงมีการออกแบบสิ่งที่มาแทนที่ ECM ที่มีอยู่เดิมคือโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นโครงสร้างและรูปแบบของโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีบทบาทสำคัญต่อพฤติกรรมของเซลล์

#### 2.3.1 การขึ้นรูป

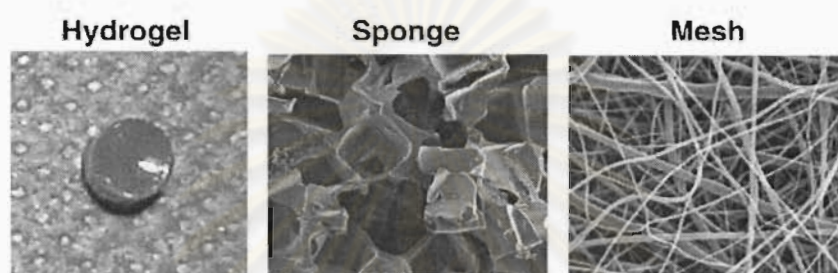
โครงเลี้ยงเซลล์ถูกจำแนกประเภทออกเป็น ไฮโดรเจล, ฟองน้ำ และ เส้นใยตาข่าย (ดูภาพที่ 2.2)

- ไฮโดรเจล (hydrogel) คือโครงสร้างของสายพอลิเมอร์ที่เติมไปด้วยน้ำ เหมาะสำหรับนำส่งเซลล์และสารออกฤทธิ์ชีวภาพ [12] โครงเลี้ยงเซลล์ไฮโดรเจลอาจมีรูปแบบการใช้งานที่สามารถฉีดเข้าไปได้เพราะมันมีคุณสมบัติในการเติมส่วนบกพร่องที่มีรูปร่างและขนาดต่างๆ ได้ง่าย ไฮโดรเจลจะช่วยกีดกันการขนส่งสารอาหารและของเสีย นอกจากนี้ยังช่วยให้เซลล์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวในแนวสามมิติด้วย

- ฟองน้ำ (sponge) เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนมีคุณสมบัติที่ขึ้นกับขนาดของรู ความพรุนของรู และการเชื่อมโยงถึงกันภายในรู ความพรุนของรูเกี่ยวข้องกับพื้นที่ผิวให้เซลล์เกาะ ขณะที่ขนาดของรูและการเชื่อมโยงถึงกันภายในรูส่งผลต่อการเคลื่อนที่และการกระจายตัวของเซลล์ อีกทั้งการแลกเปลี่ยนสารอาหารและของเสียภายในเซลล์ เทคโนโลยีการขึ้นรูปแบบฟองน้ำที่นิยมในปัจจุบันได้แก่ porogen leaching, freeze drying และ gas foaming

- เส้นใยตาข่าย (mesh) คือการเชื่อมโยงของเส้นใยเป็นตาข่ายที่มีรูปแบบการถักทอ (woven) และไม่มีรูปแบบการถักทอ (non-woven) ซึ่งปริมาตรช่องว่างและเส้นผ่านศูนย์กลาง

ของเส้นใยจะส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ เส้นใยที่ไม่มีรูปแบบการไม่ถักทอจะมีปริมาตรช่องว่างและพื้นที่ผิวมาก เหมาะแก่การเจริญของเนื้อเยื่อ ขณะที่เส้นใยที่มีรูปแบบถักทอจะมีความแข็งแรงมากกว่า เทคโนโลยีการขึ้นรูปเส้นใยตาข่ายในปัจจุบันได้แก่ อิเล็กโตรสปิน (electrospinning) โครงเลี้ยงเซลล์จากอิเล็กโตรสปินจะมีเส้นใยขนาดนาโน มีสัดส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง และมีรูภายในเชื่อมถึงกัน



ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างการขึ้นรูปโครงเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ (ภาพจาก Chung and Burdick, 2008 [13]) ภาพซ้าย: ไฮโดรเจล ภาพกลาง: แบบฟองน้ำมีรูพรุน ภาพขวา: แบบเส้นใยตาข่าย

### 2.3.2 ลักษณะที่จำเป็นของโครงเลี้ยงเซลล์

อันดับแรกโครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีโครงสร้างให้เซลล์มารวมตัวกันเพื่อจัดเรียงตัวเกิดเป็นโครงสร้างเนื้อเยื่อโดยการสร้างสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เซลล์เจริญแบบสามมิติและเกิดเป็นเนื้อเยื่อ เมื่อเซลล์ที่เกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ถูกนำไปใส่ในร่างกาย จะต้องเข้ากันได้กับร่างกาย การเกาะของเซลล์เป็นพื้นฐานอันดับแรกที่ทำให้เซลล์โตและพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อใหม่ วัสดุชีวภาพจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ถูกนำมาใช้ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีพื้นฐานการเลือกวัสดุมาโดยการพิจารณาจากความเข้ากันได้กับร่างกาย สามารถดูดซึมได้ และสมบัติเชิงกลเป็นส่วนใหญ่ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีโดยทั่วไปควรมีคุณลักษณะดังต่อไปนี้

- เป็นโครงสามมิตีมี่รูพรุนเพื่อที่จะมีสัดส่วนของปริมาตรพื้นที่ผิวมากเหมาะสำหรับใส่เซลล์ลงไปได้จำนวนมาก
- มีโครงสร้างทางเคมีกายภาพช่วยเกื้อหนุนให้เซลล์เกาะ เจริญเติบโต differentiate และสร้าง ECM
- มีรูที่เชื่อมต่อกันเพื่อช่วยส่งผ่านสารอาหารและขี้ถ่ายของเสีย

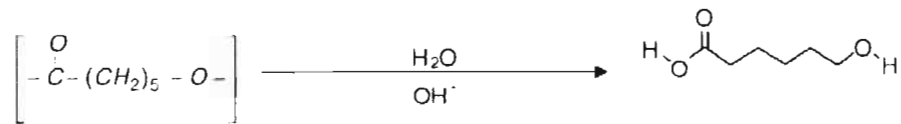
- เป็นวัสดุที่ไม่เป็นพิษสามารถย่อยสลายและถูกดูดซึมได้ในร่างกายโดยสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายให้เหมาะกับการโตของเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย และไม่เหลือผลิตภัณฑ์ตกค้างจากการย่อยสลายที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย
- สมบัติเชิงกลสอดคล้องกับเนื้อเยื่อบริเวณที่จะใส่โครงเลี้ยงเซลล์
- เป็นตัวนำพาที่ดี สามารถทำหน้าที่เป็นระบบนำส่งสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เช่น โกรทแฟกเตอร์
- ขึ้นรูปง่าย สามารถผลิตซ้ำได้ ในรูปทรงและขนาดที่ต้องการนำไปใช้ในการรักษา
- มีความเสถียรและคงทนเพียงพอต่อการเก็บไว้ใช้งาน การเคลื่อนย้าย และการนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ
- ราคาวัสดุที่ใช้ กระบวนการผลิต การทำให้สะอาดปราศจากเชื้อ มีความสมเหตุสมผล

## 2.4 เทคโนโลยีการขึ้นรูปเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติโครงเลี้ยงเซลล์

การใช้เทคโนโลยีทางวัสดุศาสตร์เข้ามาช่วยปรับปรุงคุณสมบัติต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์ เป็นส่วนหนึ่งของขั้นตอนการออกแบบและการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

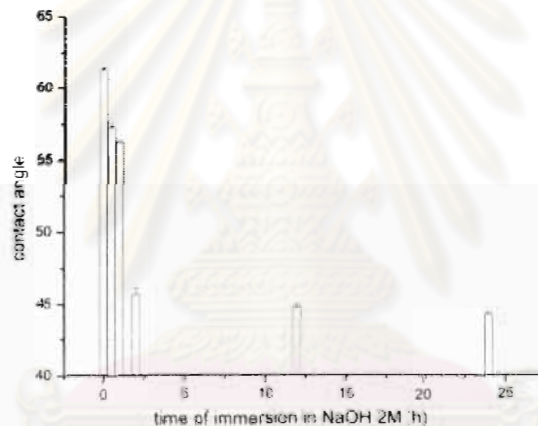
### 2.4.1 ความชอบน้ำของพื้นผิว

เนื่องวัสดุชีวภาพจำพวกพอลิเอสเทอร์มีสมบัติเคมีพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทำให้ไม่เอื้อต่อการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิววัสดุ จึงมีการศึกษาวิธีต่างๆ ที่จะพยายามปรับปรุงสมบัติพื้นผิวของวัสดุเหล่านี้ [14-16] "Alkaline treatment" เป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าง่ายและประหยัดในการเพิ่มสมบัติความชอบน้ำ (hydrophilicity) ของพื้นผิวเพราะทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่มีสมบัติชอบน้ำ (หมู่คาร์บอกซีและไฮดรอกซิล) ภาพที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อวัสดุพอลิคาโพรแลกโตน (PCL) ถูกทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หมู่  $\text{OH}^-$  ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะไปไฮโดรไลซ์ PCL ให้เป็นไฮดรอกซีคาโพรอิก (hydroxycaproic acid) เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส สายโซ่ของ PCL จะมีหมู่ที่ถูกไฮโดรไลซ์เพิ่ม จึงช่วยเพิ่มสมบัติความชอบน้ำ เมื่อขึ้นวัสดุ PCL ชุ่มน้ำมากขึ้นจะช่วยให้การเกาะของเซลล์และโปรตีนง่ายขึ้น

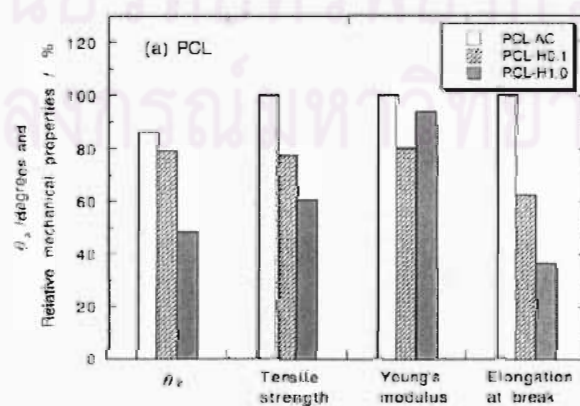


ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพอลิคาโพรแลกโตน (ภาพจาก Tan and Teoh, 2007 [17]) แสดงโครงสร้างทางเคมีของพอลิคาโพรแลกโตนเมื่ออยู่ในสารละลายเบสเกิดโครงสร้างที่มีหมู่คาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล

จากภาพที่ 2.4 Juan Pena [18] แซ่ชิ้นวัสดุ PCL ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล (N) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้วัสดุมีความชอบน้ำมากขึ้น โดยสังเกตได้จากค่ามุมสัมผัสของน้ำลดลงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 แสดงกราฟค่ามุมสัมผัสของ PCL ที่ลดลงของการไฮโดรไลซ์ด้วย NaOH 2 โมลาร์ ตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึง 24 ชั่วโมง (Pena et al, 2006 [18])



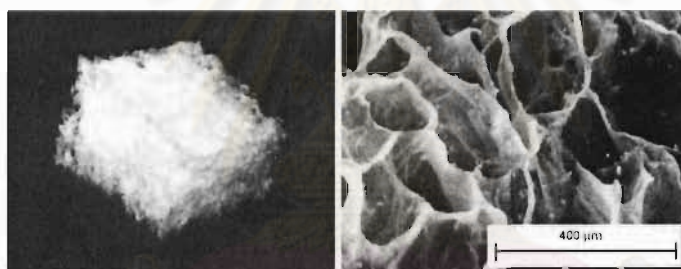
ภาพที่ 2.5 แสดงสมบัติเชิงกลของ PCL (กราฟสีขาว) PCL ที่ไฮโดรไลซ์ด้วย NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (กราฟสีเทาอ่อน) และ 1.0 โมลาร์ (กราฟสีเทาเข้ม) (Tsuji, 2003 [19])

Hideto Tsuji [19] ทำ alkaline treatment โดยจุ่มแผ่นฟิล์ม PCL ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 N ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทำให้สมบัติเชิงกลของวัสดุเปลี่ยนไป (ดูผลการทดลองจากภาพที่ 2.5)

#### 2.4.2 ขนาดของรู

การขึ้นรูปแบบฟองน้ำด้วยเทคนิค porogen leaching สามารถควบคุมขนาดของรูได้จากขนาด porogen ที่ใช้ ซึ่งที่นิยมได้แก่ เกลือ และน้ำตาล ส่วนการขึ้นรูปแบบฟองน้ำด้วยเทคนิค freeze-drying โครงสร้างและขนาดของรูจะขึ้นกับอุณหภูมิการแช่แข็งที่ใช้

Kang, Tabata และ Ikada [20] เตรียมไฮโดรเจลจากเจลาตินความเข้มข้น 3% แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C และ -80 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ขณะที่ไฮโดรเจลอีกหนึ่งตัวอย่างนำไปทำให้แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 20 นาที (ดูภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 ภาพซ้ายเป็นภาพเจลาตินไฮโดรเจลจากการแช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C ภาพขวาเป็นภาพตัดขวางของเจลาตินไฮโดรเจลจาก Scanning Electron Microscope สเกล 400 ไมครอน (ภาพจาก Kang et al., 1999 [20])

จากตารางที่ 2.1 จะพบว่าอุณหภูมิในการแช่แข็งต่ำลงทำให้ความหนาแน่นของวัสดุเจลาตินแบบฟองน้ำเพิ่มขึ้น ขณะที่ขนาดของรูกลับลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่ต่ำมากจะทำให้ผลึกของน้ำแข็งเล็กกว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำน้อยกว่า

Freezing condition	-20 °C	-80 °C	N <sub>2</sub> (l)
Density (μg mm <sup>-3</sup> )	9.00 ± 0.16	11.03 ± 0.56	29.13 ± 0.71
Pore size (μm)	250 ± 120	85 ± 35	45 ± 5
Mechanical properties	Weak, brittle	Brittle	Elastic
Inner structure	Three-dimensional	Two-dimensional with interconnections	Two-dimensional
Wall thickness	Thin	Thin	Thick

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของวัสดุเจลาตินแบบฟองน้ำหลังจากนำเจลาตินไฮโดรเจลไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C, -80 °C และไนโตรเจนเหลว (Kang et al., 1999 [20])



Lien, Ko และ Huang [21] ศึกษาผลขนาดของรูต่อการโตและหลัง ECM ของเซลล์คอนไดรโรไซต์ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน จากเจลาตินเข้มข้น 5% (w/v) แล้วเชื่อมขวางพันธะด้วยจินิปีน (genipin) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 10, 15, 20 และ 25 °C จากนั้นจึงนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -80 °C ได้ผลดังตารางที่ 2.2

Crosslinking temperature (°C)	Pore size (µm) dry state	Pore size (µm) cell cultured for 2 weeks
10	50-150	60-180
15	100-200	120-300
20	250-350	270-450
25	350-500	370-600

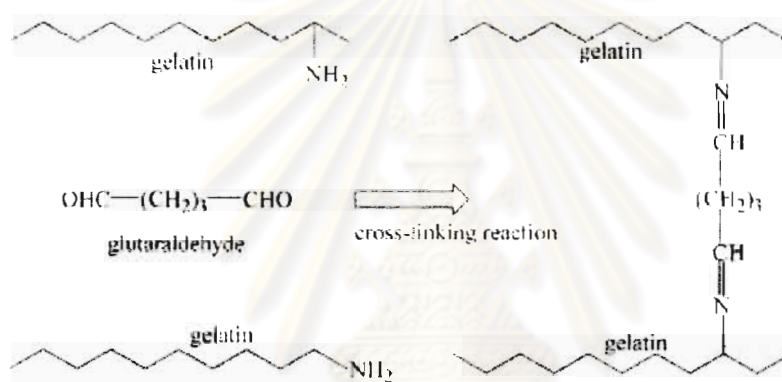
ตารางที่ 2.2 แสดงขนาดของรูวัสดุเจลาตินเข้มข้น 5% แบบฟองน้ำขณะแห้งและหลังจากนำไปเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 สัปดาห์เมื่อผ่านการเชื่อมขวางพันธะโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยจินิปีนที่อุณหภูมิ 10, 15, 20 และ 25 °C (Lien, 2009 [21])

พบว่าขนาดรูใหญ่ขึ้นทำให้อัตราการเจริญของเซลล์และจำนวนการสร้างไกลโคสะมิโน-ไกลแคน (GAG) เพิ่มมากขึ้นนอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของยีน aggregan คอลลาเจนชนิดที่ 1, คอลลาเจนชนิดที่ 2, และคอลลาเจนชนิดที่ 10 เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้เซลล์ที่เลี้ยงในโครงที่มีขนาดรูใหญ่กว่ายังมีลักษณะทางสรีรวิทยาดีกว่า จึงสรุปได้ว่าเซลล์คอนไดรโรไซต์ขนาดขอบโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดของรูอยู่ระหว่าง 250-500 µm เพราะทำให้เซลล์เจริญและผลิต ECM ได้ดีกว่า [21]

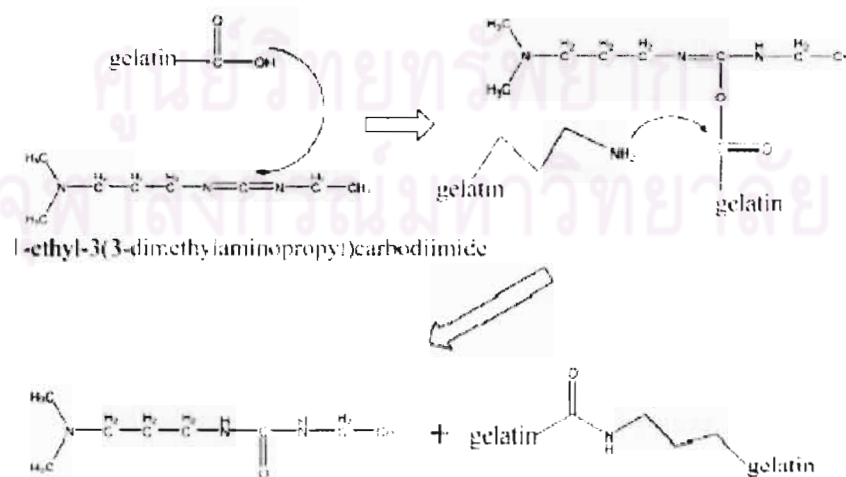
#### 2.4.3 การเชื่อมขวางพันธะ (crosslinking)

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปจากพอลิเมอร์บางชนิดเช่นคอลลาเจน เจลาติน มักมีความแข็งแรงทางเชิงกลที่ไม่ดีและย่อยสลายอย่างรวดเร็ว จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้วัสดุชีวภาพเหล่านี้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ การเชื่อมพันธะ จึงเป็นกลายเป็นขั้นตอนสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ เพราะช่วยเพิ่มความแข็งแรงทางเชิงกลและชะลอการย่อยสลายของวัสดุดังกล่าว วิธีการเชื่อมพันธะแบ่งออกเป็น 2 วิธีได้แก่ การเชื่อมพันธะ ด้วยวิธีทางเคมีและทางกายภาพ วิธีทางกายภาพมีข้อดีคือไม่มีสารเคมีตกค้างที่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งได้แก่ photooxidation, uv irradiation และ dehydrothermal treatment (DHT) ส่วนวิธีทางเคมีได้แก่ glutaraldehyde (GTA), water soluble carbodiimide (WSC) เช่น 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

กลูตารอลดีไฮด์เป็นสารที่นิยมมากที่สุดในการเชื่อมพันธะคอลลาเจนและเจลาติน เพราะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง มีราคาถูก แม้ว่าจะเป็นพิษต่อเซลล์ก็ตาม โดยจะเข้าไปเชื่อมหมู่อะมิโนสองหมู่บนสายพอลิเปปไทด์ที่อยู่ติดกันดังภาพที่ 2.7 นอกจากกลูตารอลดีไฮด์แล้ว EDC ยังเป็นสารที่ได้รับความนิยมเช่นกัน การใช้ EDC เป็นตัวเชื่อมขวางพันธะจะเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกับการใช้กลูตารอลดีไฮด์ โดย EDC จะเข้าไปเชื่อมหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ที่อยู่ติดกัน จากนั้น EDC ก็จะหลุดออกมาจากปฏิกิริยาเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงดังภาพที่ 2.8 ทั้งสองวิธีนี้จึงต้องมีขั้นตอนการล้างผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ออกให้หมดหลังจากเสร็จกระบวนการเชื่อมขวางพันธะแล้ว



ภาพที่ 2.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมพันธะของกลูตารอลดีไฮด์กับเจลาติน (Chen et al., 2005 [22]) กลูตารอลดีไฮด์จะเข้าไปเชื่อมหมู่  $\text{NH}_2$  ของโครงสร้างเจลาตินสองโมเลกุล



ภาพที่ 2.8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมพันธะของ EDC กับเจลาติน (Chen et al., 2005 [22]) EDC จะเข้าไปเชื่อมหมู่  $\text{COOH}$  บนโครงสร้างเจลาตินกับหมู่  $\text{NH}_2$  ของเจลาตินอีกโมเลกุลหนึ่ง

Chen และคณะ [17] ศึกษาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับการย่อยสลาย และความ เป็นพิษต่อเซลล์ของเจลาติน 15% ที่เชื่อมพันธะด้วยกลูตาโรลดีไฮด์และ EDC ที่ความเข้มข้น ต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น EDC 0.8% (w/v) เจลาตินมีความเสถียรมากที่สุด ค่าอุณหภูมิใน การย่อยสลาย ( $T_d$ ) ของเจลาตินเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น EDC ตั้งแต่ 0.2-0.8% แต่การเพิ่ม ความเข้มข้นของ GTA ตั้งแต่ 0.05-0.6% (v/v) กลับทำค่า  $T_d$  ลดลง เพราะความเข้มข้นมาก เกินไปที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ จากการวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตบนเจลาติน ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) พบว่าที่ความเข้มข้น EDC 0.8% มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยสุด และมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (เลี้ยงบนจานเปล่า) ขณะที่ความเข้มข้นของกลูตาโรลดีไฮด์ ต้องลดลงเหลือ 0.05% หรือ 0.1% จึงจะมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

## 2.5 วัสดุชีวภาพ

การเลือกวัสดุที่ใช้ทำโครงเลี้ยงเซลล์เป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งก่อนที่จะขึ้นรูป โครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับวัสดุชีวภาพที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นมักเป็น วัสดุพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งแบ่งออกเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์จาก ธรรมชาติ

### 2.5.1 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากพอลิเมอร์สังเคราะห์

พอลิเมอร์สังเคราะห์เป็นวัสดุที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากพอลิเมอร์สังเคราะห์มีสมบัติทางเคมีและทางเชิงกลที่ดีเยี่ยมในขณะที่พอลิเมอร์ ธรรมชาติบดพร่องคุณสมบัติข้อนี้ ข้อดีที่เด่นชัดอีกประการคือพอลิเมอร์สังเคราะห์สามารถถูก นำมาผ่านกระบวนการต่างๆ ให้มีคุณสมบัติทางเคมี ทางเชิงกล (ความแข็งแรง และค่าโมดูลัส) และอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสมต่อการใช้งานได้ ในขณะที่พอลิเมอร์ธรรมชาติมีโครงสร้าง โมเลกุลขนาดใหญ่ มีมวลโมเลกุลสูง นำไปผ่านกระบวนการต่างๆ ได้ยาก

#### 2.5.1.1 Aliphatic *alpha*- polyester or poly(*alpha*-hydroxy ester)

พอลิเมอร์กลุ่ม *alpha*-hydroxyl ester เช่น พอลิไกลโคลิกแอซิด (PGA), พอลิแลกติกแอซิด (PLA) และ พอลิแลกติกโกลิโกลิ (PLGA) เป็นวัสดุที่พบบ่อยใน งานวิจัย ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกอ่อน [23-27] เนื่องจากได้รับการยอมรับจากองค์การอาหาร

และยาของสหรัฐอเมริกาในการใช้งานทางคลินิก โคร่งเลี้ยงเซลล์เส้นใยที่ทำจาก PGA ถูกนำมาใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอย่างกว้างขวางเพราะมีอัตราการย่อยสลายสูงและมีรูพรุนทำให้เจริญได้ดีช่วยให้คอนโดรไซต์เกิดการ differentiate และหลัง ECM เหมือนกับที่ผลผลิตออกมาจากกระดูกอ่อนชนิด hyaline ที่ปกติ [28]

PLA และ PLGA ก็นิยมนำมาใช้ศึกษาการซ่อมแซมกระดูกอ่อนเช่นกัน เนื่องจากเป็นวัสดุที่ย่อยสลายได้และเข้ากันได้กับร่างกาย นอกจากนี้ยังมีความแข็งแรงเชิงกลที่ดี พอลิเมอร์เหล่านี้ย่อยสลายได้ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ที่ตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ (ester bond) บนสายโซ่พอลิเมอร์ ลักษณะทางกายภาพของโคร่งเลี้ยงเซลล์ เช่น ขนาดของรู เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยและความเป็นผลึก (crystallinity) สามารถควบคุมการสลายของโคร่งเลี้ยงเซลล์ได้ PGA และ PCL ที่มีรูพรุนเริ่มสลายพันธะเอสเทอร์หลังจาก 6 สัปดาห์ [29] ในขณะที่ PLA ที่มีความเป็นผลึกสูง จึงมีอัตราการสลายช้ากว่า ดังนั้นการนำ PLA มาเกิดโครงสร้างโคพอลิเมอร์กับ PGA จะช่วยชะลออัตราการสลายตัวของ PGA ได้ และอัตราการสลายตัวจะน้อยลงเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ PLA [30] เช่นเดียวกับกับสมบัติเชิงกลของโคร่งเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมตามการใช้งานได้ [31] และยังขึ้นรูปได้ง่าย จึงเป็นข้อดีของการขึ้นรูปวัสดุเหล่านี้เป็นโคร่งเลี้ยงเซลล์

PLA และ PLGA ที่ขึ้นรูปเป็นเหมือนฟองน้ำและโฟมมีความแข็งแรงตามธรรมชาติมากกว่า และขึ้นรูปได้ง่ายกว่าโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ทำจาก PGA เนื่องจากมันสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้

Nam Kyoung Lee และคณะ [32] เลี้ยงเซลล์คอนโดรไซต์ในโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ทำจาก PLA และ PLGA พบว่า อัตราการเจริญของเซลล์บนโคร่งเลี้ยงเซลล์ที่ทำจาก PLGA ต่ำกว่าใช้ PLA เป็นโคร่งเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากการย่อยสลายของ PLGA ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมในโคร่งเลี้ยงเซลล์เป็นกรด จึงส่งผลกระทบต่อดำรงชีวิตและการเจริญของเซลล์ แม้ใน 4 สัปดาห์แรกจะมีการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ใน PLA น้อยกว่า แต่หลังจาก 7 สัปดาห์ เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในโคร่งเลี้ยงเซลล์ PLGA ผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 2 ออกมารอบๆ พื้นผิวของโคร่งเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมาก ขณะที่เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในโคร่งเลี้ยงเซลล์ PLA ผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 2 ออกมาที่ขอบของพื้นผิวโคร่งเลี้ยงเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีเหตุผลหลายประการที่ทำให้ PLGA ดูเหมือนเข้ากันได้กับเซลล์มากกว่า PLA ประการแรกคือการย่อยสลายของ PLGA ทำให้เกิดรูพรุนมาก จึงช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวให้เซลล์เกาะและเคลื่อนที่ ประการที่สองคือ PLGA ขอบน้ำ

(hydrophilic) มากกว่า PLA ทำให้เซลล์เกาะได้ดีกว่า Kota Uematsu และคณะ [33] ทำโครงเลี้ยงเซลล์ PLGA สามมิติที่มีรูพรุน พร้อมกับเลี้ยง marrow stromal cells อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์แล้วนำไปฝังบริเวณที่บกร่องขนาดใหญ่ของเข่ากระต่าย จากนั้น 12 สัปดาห์ พบเนื้อเยื่อเรียบสีขาวและมีลักษณะเหมือน hyaline

อย่างไรก็ตามการใช้วัสดุเหล่านี้มีข้อบกพร่องบางประการ เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาฉับพลันตรงบริเวณที่ใส่วัสดุเข้าไปแล้วก่อให้เกิดการอักเสบขึ้น [34] สารที่ได้จากการอักเสบ เช่น interleukin-1 จะไปยับยั้งการสร้างกระดูกอ่อนและสลาย ECM ของกระดูกอ่อน [35] แม้ในภาวะที่ไม่เกิดการอักเสบ ผลผลิตทันทีที่ได้จากการสลายพันธะของวัสดุเหล่านี้มีความเป็นกรด ทำให้ค่า pH ที่บริเวณนั้นต่ำลง ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) เนื่องจากคอนโดโรไซต์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของสภาพแวดล้อม [36]

### 5.1.2 พอลิคาโพรแลกโตน (PCL)

เป็นวัสดุพอลิเอสเทอร์อีกชนิดหนึ่งที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ในสภาวะทางสรีรวิทยาเช่นในร่างกายของมนุษย์ มีจุดหลอมเหลวต่ำอยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส และค่า  $T_g$  (glass transition temperature) อยู่ที่ประมาณ -60 องศาเซลเซียส พอลิคาโพรแลกโตนเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงของ  $\epsilon$ -caprolactone โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาและความร้อน แสดงได้ดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 แสดงปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงโครงสร้างของ  $\epsilon$ -caprolactone ไปเป็นพอลิคาโพรแลกโตน (ภาพจาก Wikipedia, 2011 [37])

พอลิคาโพรแลกโตนได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้เป็นวัสดุที่สามารถใช้ได้ในร่างกายเช่นระบบนำส่งยาหรือไหมเย็บแผล (ชื่อทางการค้า Monocryl) [38] และยังเป็นวัสดุที่ถูกนำมาใช้ทำเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพราะเป็นวัสดุชีวภาพที่เข้ากันได้กับร่างกาย ขึ้นรูปได้ง่าย สามารถปรับเปลี่ยนสมบัติเชิงกล

อัตราการย่อยสลาย และลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ได้จากการควบคุมขนาดของรู เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยและความเป็นผลึก (crystallinity) การย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ ไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดเหมือนกับวัสดุพอลิเอสเทอร์ชนิดอื่น เช่น พอลิแลกติกแอซิด พอลิไกลโคลิกแอซิด และพอลิแลกติกโกลไกลโคลิกพอลิคาโพรแลกโตนจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสม ระยะยาวสำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะนำไปฝังยังบริเวณที่มีการเสียหายของ เนื้อเยื่อในผู้ป่วย

Izquierdo [39] พบว่าเซลล์คอนโดโรไซต์จากคนสามารถเกาะอยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ PCL ที่มีรูพรุน 70% มีขนาดของรู 200 ไมโครเมตร ได้คล้ายคลึงกับเซลล์ที่เลี้ยงบนพอลิสไตรีน ซึ่งคอนโดโรไซต์ที่อยู่ในรูของโครงเลี้ยงเซลล์ PCL มีลักษณะกลมและยังคงสภาพลักษณะทาง สรีรวิทยาของเซลล์คอนโดโรไซต์ได้ดีเหมือนกับที่อยู่ในกระดูกอ่อน

Wan-Ju Li [40] ศึกษาการตอบสนองของเซลล์คอนโดโรไซต์ที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยง เซลล์เส้นใยขนาดนาโนจากการอิเล็กโตรสปินพอลิคาโพรแลกโตนพบว่า เซลล์แสดงลักษณะ ทางสรีรวิทยาที่เป็นคอนโดโรไซต์ ด้วยการแสดงออกของยีน ECM ที่จำเพาะกับกระดูกอ่อน รวมถึงคอลลาเจนชนิดที่ 2 นอกจากนี้เซลล์ที่เลี้ยงบนเส้นใยขนาดนาโนยังสร้างโปรติโอไกลแคน ที่เป็นซัลเฟตได้มาก เซลล์ที่เลี้ยงแบบ monolayer นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยขนาดนาโน ที่ทำจากพอลิคาโพรแลกโตนที่มี TGF- $\beta$  สามารถช่วยให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSC) เกิด differentiate ไปมีลักษณะที่เป็นคอนโดโรไซต์ จากการแสดงออกยีนที่จำเพาะกับคอนโดโรไซต์ และสังเคราะห์โปรตีนที่เป็น ECM ของกระดูกอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [41]

Garcia-Giralt และคณะ [42] พบว่าเซลล์คอนโดโรไซต์ที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ พอลิคาโพรแลกโตนที่มีรูพรุนในสารอาหารเลี้ยงเซลล์อินซูลิน-ทรานเฟอร์ริน-เซเลเนียม มีการ แสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่สองมากกว่าคอนโดโรไซต์ที่เลี้ยงแบบ monolayer

## 2.5.2 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ

วัสดุชีวภาพที่ได้จากธรรมชาติหลายชนิดจึงถูกนำมาใช้เพื่อช่วยการเจริญของเซลล์ เพราะมีเคมีพื้นผิวที่เหมาะสมให้เซลล์เกาะและเข้ากันได้ดีกับร่างกาย วัสดุทางชีวภาพที่นิยมใช้ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ วัสดุชีวภาพจำพวกคาร์โบไฮเดรต หรือพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) เช่น อัลจีเนต (alginate) อะกาโรส (agarose) ไฮยาลูโรแนน (hyaluronan) และ ไคโตซาน (chitosan) อีกกลุ่มหนึ่งคือวัสดุพอลิเมอร์จำพวกโปรตีน หรือพอลิเปปไทด์

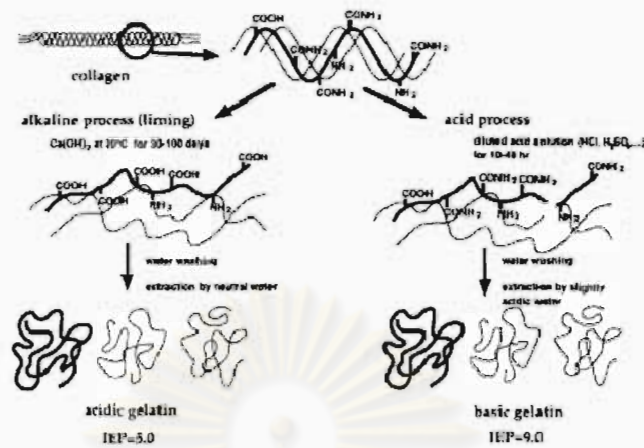
(polypeptide) เช่น คอลลาเจน (collagen) เจลาติน (gelatin) และ ไฟบริน (fibrin) เนื่องจากใน ECM ของกระดูกอ่อนประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดที่สอง 15-20% คอนโดรตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) 5-10% และไฮยาลูโรแนน 0.05-0.25% [43] ดังนั้นวัสดุชีวภาพที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้แก่ คอลลาเจน เจลาติน และ ไฮยาลูโรนิก อย่างไรก็ตามวัสดุกลุ่มนี้ก็มีข้อพร่องหลายประการ เช่น นำไปผ่านกระบวนการต่างๆ ได้ยาก มีความแข็งแรงทางเชิงกลที่ไม่ดีนัก ย่อยสลายเร็ว และอาจเกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้าน

### 2.5.2.1 เจลาติน

เนื่องจากเจลาตินเป็นโปรตีนที่มาจากการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สายคอลลาเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบโปรตีนที่สำคัญของกระดูกอ่อน กระดูก ผิวหนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยพันธะที่เชื่อมระหว่างสายคอลลาเจนจะแตกออกแล้วจัดเรียงโครงสร้างใหม่ องค์ประกอบทางเคมีของเจลาตินจะคล้ายกับคอลลาเจนชนิดที่สลายมาเป็นเจลาติน เจลาตินโดยทั่วไปได้มาจาก triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากผิวหนังและกระดูก การเตรียมเจลาตินจากคอลลาเจนทำได้ 2 วิธีด้วยกัน (ดูภาพที่ 2.10) ได้แก่ กระบวนการใช้กรด (acid treatment) และกระบวนการใช้เบส (alkaline treatment) กระบวนการใช้กรดจะเร็วกว่ากระบวนการที่ใช้เบสเหมาะสำหรับคอลลาเจนที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนนัก เช่น คอลลาเจนจากผิวหนังของหมู ส่วนกระบวนการใช้เบสจะใช้ระยะเวลาานกว่าเพื่อทำลายพันธะเคมีในสายคอลลาเจน จึงเหมาะสำหรับคอลลาเจนที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น คอลลาเจนในหนังวัว

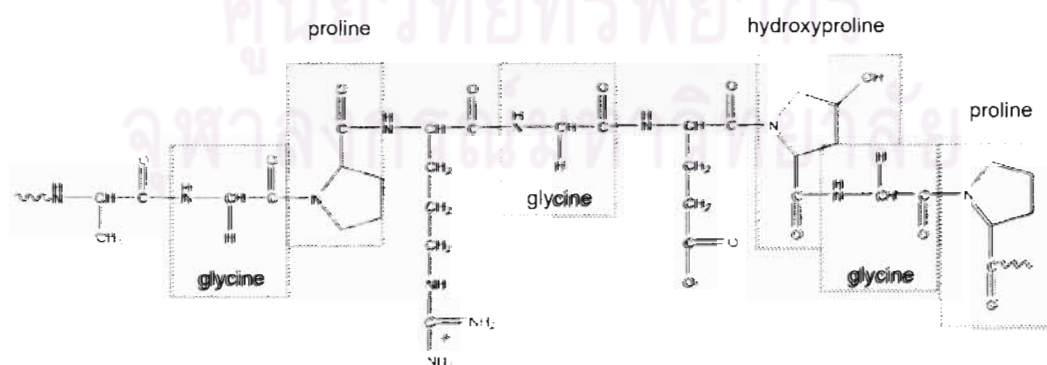
- เจลาตินที่ได้จากจากกระบวนการที่เป็นกรด (acidic process) เรียกว่า basic gelatin หรือเจลาตินชนิด A มีความรุนแรงของปฏิกิริยาน้อย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่หมู่อะมิโน ( $\text{NH}_2$ ) มากกว่าและมีลักษณะคล้ายคอลลาเจนมากกว่ามีค่า isoelectric point สูงกว่า 7 ที่ pH 7.5 จะมีความเป็นประจุบวกมากกว่าชนิด B ทำให้เจลาตินชนิดนี้เข้ากันได้กับเซลล์มากกว่า

- เจลาตินที่ได้จากกระบวนการที่เป็นเบส (alkaline process) เรียกว่า acidic gelatin หรือเจลาตินชนิด B หมู่แอสพาราจีนและกลูตามีนถูกไฮโดรไลซ์กลายเป็นกรดคาร์บอกซิล ทำให้มีค่า isoelectric point ต่ำกว่า 7 มีความเป็นประจุลบสูงที่ pH 7.5 เนื่องจากมีหมู่คาร์บอกซิล ( $-\text{COOH}$ ) อยู่มากกว่า นิยมนำมาใช้อยู่ในรูปไฮโดรเจล หรืออนุภาคทรงกลมขนาดเล็กสำหรับนำส่งโปรตีนที่มีประจุบวกและโกรทแฟกเตอร์



ภาพที่ 2.10 กระบวนการผลิตเจลาติน (ภาพจาก Tabata and Ikada, 1998 [44]) แสดงโครงสร้างคอลลาเจนผ่านกระบวนการที่เป็นเบสและเป็นกรดเกิดเป็นเจลาตินชนิดที่เป็นกรดและเป็นเบสตามลำดับ (ดูรายละเอียดข้างต้น)

ด้วยสมบัติการเปลี่ยนประจุตามค่า pH ของเจลาติน ทำให้นำโครงสร้างเจลาตินไปเกิดเป็นสารประกอบกับโมเลกุลที่มีประจุตรงข้ามได้ เกิดเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเสถียรมากขึ้น อาจทำให้อยู่อนุภาคทรงกลมขนาดเล็กสำหรับนำส่งสารที่มีประจุตรงข้ามอย่างโปรตีนและโกรทแฟกเตอร์ในแง่การใช้งาน เจลาตินมีราคาค่อนข้างถูกเมื่อเทียบกับคอลลาเจน เจลาตินจะเกิดเป็นเป็นเจลด้วยพันธะไฮโดรเจนเมื่ออุณหภูมิเย็นลงต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง เมื่อให้ความร้อนไปสลายพันธะไฮโดรเจนจะทำให้เจลาตินละลายน้ำ โครงสร้างของเจลาตินมักประกอบด้วยหมู่ของอะมิโนไกลซีน โพรลีน และ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน โดยจะพบไกลซีนแทบทุกหมู่ อะมิโนสามหมู่ที่ติดกันตั้งโครงสร้างตามภาพที่ 2.11

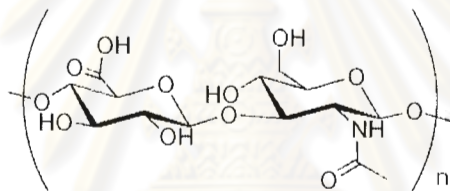


ภาพที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของเจลาตินประกอบด้วยหมู่ของอะมิโนไกลซีน โพรลีน และ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน (ภาพจาก Chaplin, 2009 [45])



### 2.5.2.2 ไฮยาลูโรนิก

ไฮยาลูโรแนน หรือไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ เส้นตรงมีหน่วยเป็น เอ็น-อะซิติล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) และกรดกลูโคโรนิก (glucuronic acid) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก ( $\beta$  1-4 glycosidic) และเชื่อมระหว่างหน่วยไดแซ็กคาไรด์ด้วยพันธะ  $\beta$ 1-4 เป็นสายโซ่โมเลกุลขนาดใหญ่(ภาพที่ 2.12) มีมวลโมเลกุลเฉลี่ยสูงถึง 10,000 กิโลดาลตัน (kDa) มีความสำคัญในฐานะเป็นไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) ชนิดที่ไม่มีหมู่ซัลเฟตที่พบเป็นส่วนใหญ่ใน ECM ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทุกชนิด มีบทบาทในการรักษาแผลและมีความสำคัญในฐานะเป็นเสมือนโครงให้เซลล์เกาะ เป็นสื่อกลางที่ช่วยให้เซลล์เคลื่อนที่และเจริญเติบโตนอกจากนี้ไฮยาลูโรนิกยังเป็นสารหล่อลื่นที่พบได้ระหว่างข้อต่อกระดูก



ภาพที่ 2.12 โครงสร้างหน่วยไดแซ็กคาไรด์พื้นฐานของไฮยาลูโรนิก (Wikipedia, 2011 [37])

Hyuk Sang Yoo [46] ใส่ไฮยาลูโรนิกเข้าไปที่บริเวณพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อเพื่อเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเพิ่มจำนวน และหลังคอลลาเจนได้มากกว่าเซลล์ที่อยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีไฮยาลูโรนิก

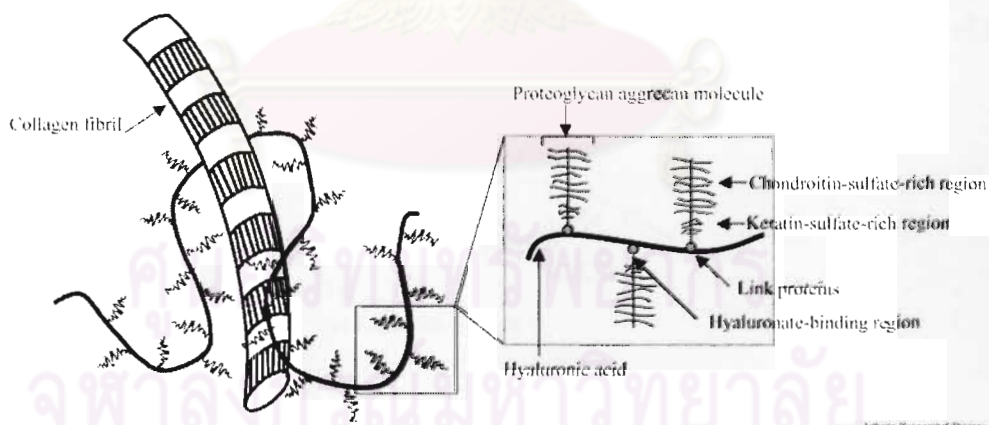
Radice และคณะ [47] ใส่เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเข้าไปที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไฮยาลูโรนิกเพื่อฝังเข้าไปยังบริเวณที่บกร่องของกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ พบว่าเซลล์ดังกล่าวเจริญได้ดีและให้ผลการรักษาที่เร็วกว่าและดีกว่าบริเวณที่ไม่ได้ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นวัสดุดังกล่าวจึงย่อยสลายไปในเวลา 4 เดือน โดยไม่ทำให้เกิดการอักเสบในตำแหน่งที่ใส่วัสดุเข้าไป

HaiFeng Liu และคณะ [48] ศึกษาผลของปริมาณไฮยาลูโรนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0% - 1% ต่อคุณสมบัติของแผ่นวัสดุที่เตรียมจากไคโตซาน 2% และเจลาติน 4% พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไฮยาลูโรนิกมีส่วนช่วยให้พื้นผิววัสดุชอบน้ำมากขึ้น ช่วยลดการย่อยสลายของโครงวัสดุเมื่อเวลาผ่านไป และช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของชั้นวัสดุ เมื่อนำชั้นวัสดุมาทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์เซลล์ ไฟโบรบลาสต์ของคนพบว่า เซลล์เกาะบนพื้นผิววัสดุที่มี

ปริมาณไฮยาลูโรนิก 0.01% 0.05% และ 0.1% มากกว่าบนพื้นผิววัสดุที่มีปริมาณไฮยาลูโรนิก 0.5% และ 1% จำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากเลี้ยงบนชั้นวัสดุเป็นเวลา 11 วันจาก MTT assay พบว่าไฟโบรบลาสต์ที่เลี้ยงบนชั้นวัสดุปริมาณไฮยาลูโรนิก 0.5% และ 1% มีจำนวนน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นปริมาณไฮยาลูโรนิกที่เหมาะสมต่อการเกาะและการเจริญของเซลล์ควรอยู่ระหว่าง 0.01-0.1% ขณะที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.1% อาจไปลดหรือยับยั้งพฤติกรรมเหล่านี้ของเซลล์ เพราะเมื่อเซลล์สามารถหลังไฮยาลูโรนิกได้เอง ปริมาณไฮยาลูโรนิกที่เกินมาจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์

### 2.5.2.3 โครงสร้างเซลล์จากพอลิเมอร์ธรรมชาติผสมกันและ ECM

ECM เป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยโปรตีนเป็นพื้นฐานอยู่รอบๆ เซลล์ภายในเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ภายใน ECM มีโปรตีนที่ช่วยให้เซลล์เกาะ ควบคุมการเจริญและการทำงานต่างๆ ของเซลล์ด้วยโกรทแฟกเตอร์หลายชนิด ส่วนประกอบหลักของ ECM มีลักษณะเป็นโครงสร้างของโปรตีน ไกลโคโปรตีน และโปรติโอไกลแคนจัดเรียงตัวในแนวสามมิติที่มีความจำเพาะดังภาพที่ 2.13 ซึ่งเนื้อเยื่อแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวและปริมาณของสารชีวโมเลกุลเหล่านี้เป็นเอกลักษณ์



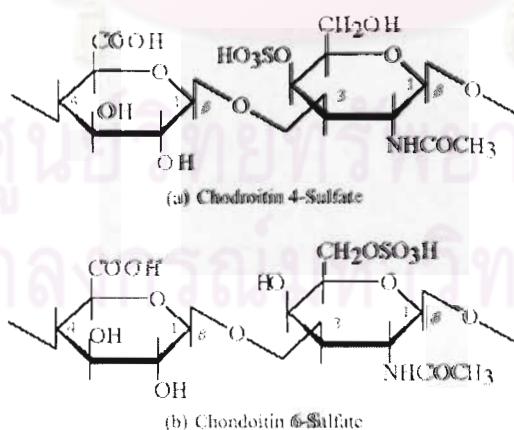
ภาพที่ 2.13 โครงสร้างของ ECM กระดูกอ่อนซึ่งประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibril) กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และสารองค์ประกอบที่ติดอยู่กับโมเลกุลกรดไฮยาลูโรนิก ได้แก่ โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) คอนโดรอิตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) และเคราตินซัลเฟต (keratin sulfate) (ภาพจาก Moreland, 2003 [49])

ไกลโคสะมิโนไกลแคนหรือ GAGs เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ติดกับโปรตีนของ ECM อยู่ในรูปโปรติโอไกลแคน (ยกเว้นไฮยาลูโรนิก) โปรติโอไกลแคนมีประจุสุทธิเป็นลบซึ่งดึงดูดโมเลกุลน้ำ ทำให้ ECM และเซลล์ที่อาศัยอยู่ชุ่มน้ำ นอกจากนี้โปรติโอไกลแคนยังช่วยดักจับและเก็บโกรทแฟกเตอร์ไว้ภายใน ECM โปรติโอไกลแคนชนิดต่างๆที่พบใน ECM ได้แก่เฮพารันซัลเฟต (heparan sulfate) คอนโดรอิตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) และ เคราแทนซัลเฟต (keratan sulfate) โดยชนิดที่จำเพาะพบในกระดูกอ่อนคือ คอนโดรอิตินซัลเฟต และ เคราแทนซัลเฟต

คอนโดรอิตินซัลเฟต เป็นไกลโคสะมิโนไกลแคนอีกชนิดหนึ่งที่มักพบใน ECM ของกระดูกอ่อน ประกอบด้วยหน่วยไดแซคคาไรด์ระหว่าง น้ำตาล เอ็น-อะซีติลกาแลคโตซามีน (*N*-acetylgalactosamine) และกรดกลูโคโรนิกจากตำแหน่งการเกาะของหมู่ซัลเฟต ทำให้แบ่งคอนโดรอิตินซัลเฟตออกเป็นอีก 4 ชนิดตามโครงสร้าง (ดูภาพ 2.14)

คอนโดรอิตินซัลเฟต A	=	chondroitin-4-sulfate
คอนโดรอิตินซัลเฟต C	=	chondroitin-6-sulfate
คอนโดรอิตินซัลเฟต D	=	chondroitin-2,6-sulfate
คอนโดรอิตินซัลเฟต E	=	chondroitin-4,6-sulfate

ส่วนคอนโดรอิติน B คือชื่อเก่าของเดอร์มาแทน (dermatan sulfate) ซึ่งไม่จัดเป็น คอนโดรอิตินซัลเฟตอีกต่อไป



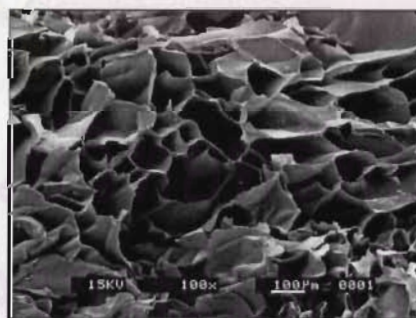
ภาพที่ 2.14 โครงสร้างของคอนโดรอิตินซัลเฟต (a): chondroitin-4-sulfate หรือคอนโดรอิตินซัลเฟตชนิด A (b): chondroitin-6-sulfate หรือคอนโดรอิตินซัลเฟตชนิด C (ภาพจาก Suh and Matthew, 2000 [50])

เนื่องจากคอนไดรตินซัลเฟตมีมวลโมเลกุลต่ำ ทำให้มีสมบัติการเป็นเจลได้ไม่ดีนักจึงไม่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในการเป็นวัสดุชีวภาพสำหรับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อย่างไรก็ตามโมเลกุลเหล่านี้สามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไฮโดรเจลกับพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกได้

#### 2.5.2.4 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากพอลิเมอร์ธรรมชาติผสมกัน (natural polymer composite)

การทำโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนจากพอลิเมอร์ธรรมชาติค่อนข้างเป็นที่นิยม คุณสมบัติพื้นผิวที่ชอบน้ำทำให้เอื้อต่อการเกาะของเซลล์ จึงจัดได้ว่าพอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นวัสดุที่เข้ากันได้กับเซลล์ได้ดี การผสมระหว่างพอลิเมอร์ธรรมชาติแต่ละชนิดรวมถึงการใส่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive) ไม่ว่าจะเป็นไกลโคสะมิโนไกลแคนหรือโกรทแฟกเตอร์เข้าไปด้วยอาจช่วยให้เซลล์เจริญได้ดี สามารถผลิต ECM ออกมาเองได้เร็วขึ้น และพร้อมจะเป็นเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ข้อดีจากการขึ้นรูปพอลิเมอร์ธรรมชาติผสมอาจมีส่วนช่วยให้โครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติเชิงกลที่ดีขึ้นและชะลอการย่อยสลายได้

ปี 2003 Chih-Hung และคณะ [43] ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจาก เจลาติน 7% คอนไดรตินซัลเฟต (chondroitin-6-sulfate) 1.4% และไฮยาลูโรแนน 0.07% (w/v) โดยมีขนาดของรูประมาณ 180 ไมโครเมตรมีความพรุนของรู 75% ดังรูปภาพที่ 2.15

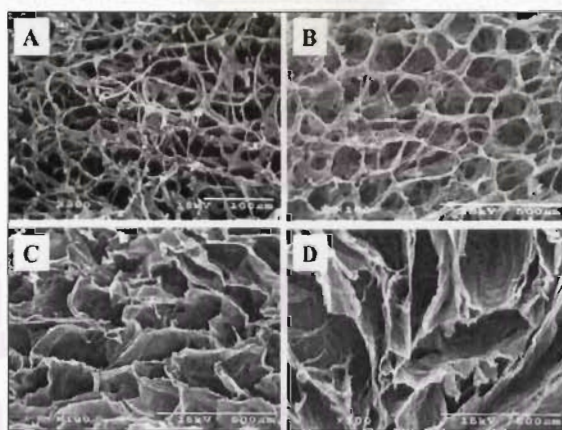


ภาพที่ 2.15 ภาพถ่ายโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนที่ทำจากพอลิเมอร์ร่วมระหว่างเจลาติน-คอนไดรตินซัลเฟต-ไฮยาลูโรแนนด้วยเครื่อง scanning electron microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า ขนาดของรูประมาณ 180 ไมโครเมตรมีความพรุนของรู 75% (ภาพจาก Chang et al., 2003 [43])

เมื่อนำเซลล์คอนโดโรไซต์จากหมุ่ใส่ในโครงเลี้ยงเซลล์นี้ พบว่าคอนโดโรไซต์กระจายตัวบนโครงที่เลี้ยงอยู่ใน spinner flask ดีกว่าตัวในโครงเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงจากนั้นจึงเลี้ยง ECM ในสัปดาห์ที่ 4 และคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 5 อย่างไรก็ตามปริมาณการสังเคราะห์ ECM ยังคงไม่เพียงพอที่จะเกิดเป็นกระดูกอ่อน เพราะจากการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่าต้องใช้เวลามากกว่า 6 สัปดาห์จึงจะสามารถซ่อมแซมกระดูกอ่อนได้ [51]

ปี 2005 Hongbin Fan และคณะ [52] ใช้โครงเลี้ยงเซลล์โพลีเมอร์ระหว่างเจลาติน คอนโดโรอิติินซัลเฟต (chondroitin-6-sulfate) และไฮยาลูโรแนนที่มีขึ้นรูปตามวิธีการของ Chih-Hung โดยมีขนาดของรูประมาณ 230  $\mu\text{m}$  มีความพรุนของรู 79% มาบรรจุอนุภาคทรงกลมขนาดเล็กสำหรับควบคุมการปลดปล่อย TGF- $\beta$ 1 ขณะที่ฝังเข้าไปในเข้าของกระดูก ผลที่ได้คือเนื้อเยื่อบริเวณนั้นมีการซ่อมแซมได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมในระยะเวลา 24 สัปดาห์

Jong Eun Lee [53] ศึกษาพฤติกรรมของคอนโดโรไซต์จากกระดูกที่เลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน-ไกลโคสะมิโนไกลแคนที่มีปริมาณไคโตซานแตกต่างกัน (ดังรูปที่ 2.16) พบว่าการเพิ่มปริมาณไคโตซาน ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีค่าโมดูลัสแรงกดเพิ่มมากขึ้น และขนาดของรูใหญ่ขึ้น



รูปที่ 2.16 ภาพตัดขวางโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซานที่มีคอนโดโรอิติินซัลเฟตจาก SEM ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า (ภาพจาก Lee, 2005 [53])

(A) คอลลาเจน

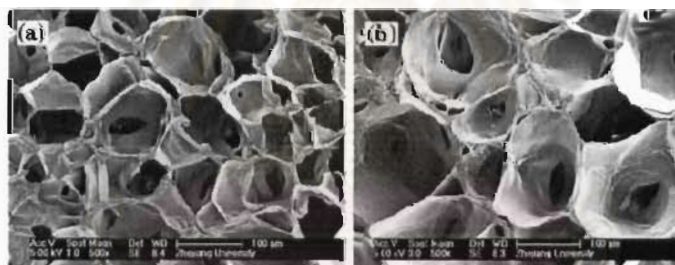
(B) คอลลาเจน : ไคโตซาน 20:1 มีขนาดรู 164  $\mu\text{m}$

(C) คอลลาเจน : ไคโตซาน 5:1 มีขนาดรู 353  $\mu\text{m}$

(D) คอลลาเจน : ไคโตซาน 1.25:1 มีขนาด 567  $\mu\text{m}$

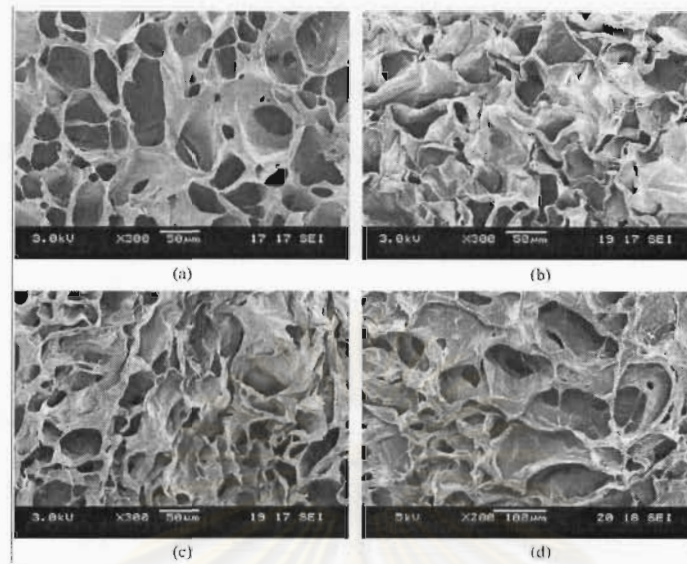
โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน-ไคโตซาน-คอนไดรตินซัลเฟตยังแสดงให้เห็นการสังเคราะห์ไกลโคสะมิโนไกลแคนและอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน : ไคโตซาน 20:1 ซึ่งแสดงอัตราการเจริญและหลังไกลโคสะมิโนไกลแคนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 14

ปี 2007 Huaping Tan และคณะ [54] ศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ที่บรรจุ basic fibroblast growth factor (bFGF) โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากเจลาติน 5% ไคโตซาน 5% ปริมาณ 2 มิลลิกรัม และไฮยาลูโรแนน 0.05% (w/v) เป็นกลุ่มควบคุม (ดูภาพที่ 2.17) และเพิ่มกระบวนการสร้างกระดูกอ่อน ด้วยการติดเฮพาริน (heparin) เข้าไปที่โครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว จากนั้นจึงใส่ bFGF ซึ่งรู้จักกันว่าเป็น heparin-binding growth factor เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเฮพารินสามารถชะลอการสลายเจลาตินไปได้ จากการวิเคราะห์ด้วย MTT พบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเฮพารินและ bFGF มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9



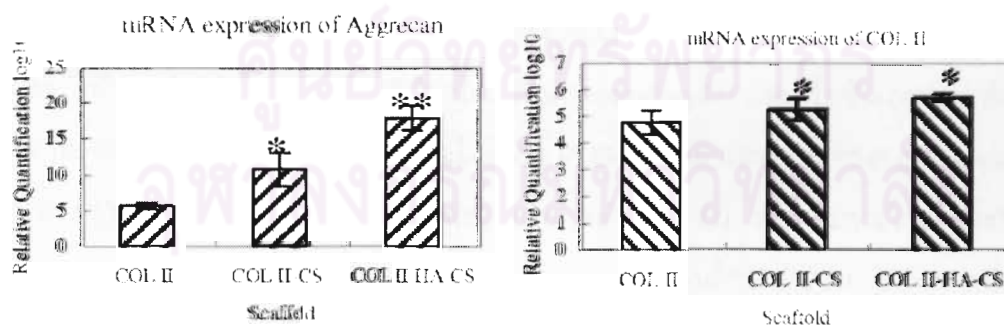
ภาพที่ 2.17 โครงเลี้ยงเซลล์ (a) เจลาติน-ไคโตซาน-ไฮยาลูโรแนนแสดงโครงสร้างรูพรุนขนาดประมาณ 100  $\mu\text{m}$  (b) หลังจากใส่เฮพารินลงไป มีขนาดรู 120  $\mu\text{m}$  ถ่ายภาพจากเครื่อง SEM ด้วยกำลังขยาย 500 เท่า สเกลภาพ 100  $\mu\text{m}$  (ภาพจาก Tan et al., 2007 [54])

ปี 2009 Chih-Sheng Ko และคณะ [55] ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากคอลลาเจนชนิดที่ 2 ด้วยความเข้มข้น 1% (w/v) แบบที่มีและไม่มี 2% ไฮยาลูโรนิก (HA) และ 1% คอนไดรตินซัลเฟต (CS) แล้วเชื่อมขวางพันธะด้วย ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดของรูประมาณ 140  $\mu\text{m}$  ความพรุนของรู 92-95% ดังภาพที่ 2.18



ภาพที่ 2.18 ภาพจากโครงเลี้ยงเซลล์จาก scanning electron microscope ถ่ายด้วยกำลังขยาย 300 เท่า สเกลภาพ 50  $\mu\text{m}$  ของ (ภาพจาก Ko et al., 2009 [55])

- (a) โครงคอลลาเจนที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางพันธะมีขนาดของรูเฉลี่ยประมาณ 160  $\mu\text{m}$  ความพรุน 94-98%
- (b) โครงคอลลาเจนที่ผ่านการเชื่อมขวางพันธะ
- (c) โครงคอลลาเจนที่มีคอนไดรอิตินซัลเฟตที่ผ่านการเชื่อมขวางพันธะ
- (d) โครงคอลลาเจนที่มีคอนไดรอิตินซัลเฟตและไฮยาลูโรนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางพันธะ (กำลังขยาย 200 เท่า สเกลภาพ 100  $\mu\text{m}$ )



ภาพที่ 2.19 กราฟการแสดงปริมาณการสร้าง ECM บนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนชนิดที่ 2 (COL II) คอลลาเจนที่มีคอนไดรอิตินซัลเฟต (COL II-CS) และคอลลาเจนที่มีทั้งไฮยาลูโรนิกและคอนไดรอิตินซัลเฟต (COL II-HA-CS) (ภาพผลการทดลองจาก Ko et al., 2009 [55])

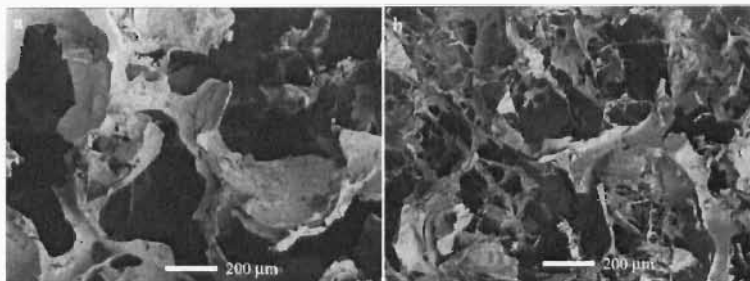
หลังจากการเลี้ยงเซลล์ 14 วัน พบคอนไดรไรต์แสดงรูปร่างกลมกระจายเป็นเนื้อเดียวอยู่ตามโครงเลี้ยงเซลล์ การแสดงออกของยีน aggrecan คอลลาเจนชนิดที่ 2 และ cartilage oligomeric matrix protein (COMP) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มี CS และ HA มากกว่าไม่มี CS และ HA (ดูผลการทดลองภาพที่ 2.19)

#### 2.5.2.5 โครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างพอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติ

เนื่องจากพอลิเมอร์ธรรมชาติขาดสมบัติความแข็งแรงทางเชิงกล การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมระหว่างพอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน เพราะนอกจากจะเพิ่มความแข็งแรงทางเชิงกลแล้วยังทำให้เซลล์ชอบเกาะบนโครงเลี้ยงเซลล์มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุพอลิเมอร์สังเคราะห์ตามลำพัง

ปี 2001 Takashi Sato และคณะ [56] ทำโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างพอลิแลกติกโกลโคลิก (PLGA) 75:25 กับคอลลาเจน ด้วยเทคนิคการล้างอนุภาค (particulate-leaching) เกลือโซเดียมคลอไรด์ขนาด 355-425  $\mu\text{m}$  จะได้โครง PLGA ที่มีรูพรุนแบบฟองน้ำ จากนั้นจึงนำไปจุ่มสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัว 0.5% ในสารละลายกรด ตามด้วยการแช่แข็งที่  $-80^{\circ}\text{C}$  และทำให้แห้ง ทั้งโครงแบบฟองน้ำจาก PLGA-คอลลาเจน และคอลลาเจนถูกนำไปใช้เลี้ยงเซลล์คอนไดรไรต์จากกระดูกอ่อนผิวข้อของวัวการใส่เซลล์ลงไปเลี้ยงในโครง PLGA-คอลลาเจนและโครงคอลลาเจนค่อนข้างง่าย เพราะพื้นผิววัสดุชอบน้ำ แต่การใส่เซลล์ลงไปเลี้ยงในโครง PLGA นั้น ต้องทำใส่พื้นผิววัสดุชุ่มน้ำก่อน นอกจากนี้เซลล์ยังเกาะติดบนพื้นผิวโครง PLGA-คอลลาเจนมากกว่าบนโครง PLGA เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ฝังเข้าไปในหนู แล้วตรวจสอบโดยการย้อมสีฮีมาโตไซลีน (hematoxylin) และอีโอซิน (eosin) สังเกตเห็นจำนวนเซลล์คอนไดรไรต์ที่มีรูปร่างกลมในโครง PLGA-คอลลาเจนและโครงคอลลาเจนมากกว่าในโครง PLGA และจากการย้อมสีซาฟรานินโอ (safranin O) พบปริมาณไกลโคสะมีโนไกลแคนในโครง PLGA-คอลลาเจนและโครงคอลลาเจนมากกว่าในโครง PLGA นอกจากนี้ยังพบว่าโครง PLGA-คอลลาเจนที่ใส่เข้าไปในหนู คงรูปร่างเดิมเหมือนกับโครง PLGA ในขณะที่โครงคอลลาเจนทรุดตัวลงเช่นเดียวกัน ในปี 2004 Takashi Sato [57] ทำโครงเลี้ยงเซลล์ poly L-lactic acid (PLLA) กับสารละลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากวัว 0.5% ด้วยวิธีลักษณะเดียวกัน แต่ใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ขนาด 600-710  $\mu\text{m}$  (ดูภาพที่ 2.20)

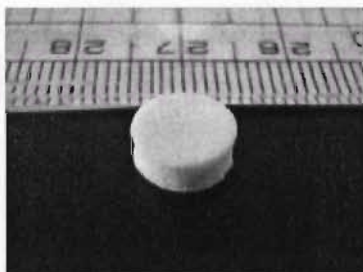




ภาพที่ 2.20 ภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนแบบฟองน้ำของ ช้าย: PLLA sponge  
 ขวา: PLLA-คอลลาเจน ถ่ายด้วยเครื่อง SEM สเกลของภาพ 200  $\mu\text{m}$  (ภาพจาก Sato, 2004  
 [57])

ทั้งโครง PLLA และ PLLA-คอลลาเจนถูกนำไปเลี้ยงเซลล์คอนโทรล การใส่เซลล์  
 ลงไปเลี้ยงในโครง PLGA นั้นต้องทำให้พื้นผิววัสดุชุ่มน้ำก่อน แต่การใส่เซลล์ลงไปโครง  
 PLLA-คอลลาเจน ไม่ต้องผ่านกระบวนการใด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่คอลลาเจนลงไปโครง  
 ของ PLLA ทำให้วัสดุมีความชอบน้ำมากขึ้น จึงมีปริมาณเซลล์ที่เกาะบนพื้นผิวมากกว่า ดังนั้น  
 เนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นเป็นกระดูกอ่อนกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวบนโครง PLLA-คอลลาเจนมากกว่า  
 บนโครง PLLA เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์พบว่าโครง PLLA-คอลลาเจน คงรูปร่างเดิมเหมือนกับ  
 ตอนแรกเช่นเดียวกับโครง PLLA ในขณะที่โครงคอลลาเจนเสียรูปทรงไป

ปี 2008 Munirah Sha'ban และคณะ [58] ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ PLGA (ดูภาพที่  
 2.21) แล้วจุ่มในสารละลายที่มีไฟบรินและคอนโทรลกระจายอยู่ พบว่าเซลล์เจริญบนโครง  
 เลี้ยงเซลล์ PLGA/ไฟบริน และผลิตไกลโคสะมีโนไกลแคนมากกว่าเซลล์ที่อยู่บน PLGA อย่างมี  
 นัยสำคัญ



ภาพที่ 2.18 โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ทำจาก PLGA (ภาพจาก Shaban, 2008 [58])

## 2.6 แหล่งของเซลล์

### 2.6.1 คอนโดโรไซต์ (chondrocyte)

เซลล์คอนโดโรไซต์ เป็นเซลล์ที่พบได้ในโครงสร้างของกระดูกอ่อน จึงมีการนำมาศึกษาอย่างกว้างขวางเพื่อให้เซลล์ผลิต ECM ของกระดูกอ่อน พฤติกรรม differentiate ของคอนโดโรไซต์ตรวจสอบได้จากการมีรูปร่างกลม และการผลิตโมเลกุล ECM อย่างเช่น คอลลาเจนชนิดที่ 2 และไกลโคสะมิโนไกลแคน หนึ่งในสิ่งที่เป็นปัญหาใหญ่สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนคือการได้จำนวนเซลล์ที่มีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้ ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนพบเซลล์คอนโดโรไซต์เพียงแค่ 5-10% เท่านั้น ดังนั้นการสกัดเอาเซลล์คอนโดโรไซต์จากอวัยวะมาใช้ ต้องมีการเพิ่มจำนวนก่อน ซึ่งการขยายจำนวนแบบ monolayer ทำให้คอนโดโรไซต์ dedifferentiate สูญเสียพฤติกรรมของการเป็นคอนโดโรไซต์ ซึ่งตรวจสอบได้จาก การสังเคราะห์โปรติโอไกลแคน และการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ลดลง แต่มีการการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มขึ้น การใช้โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้คอนโดโรไซต์ redifferentiate กลับมามีพฤติกรรมแบบคอนโดโรไซต์อีกครั้ง [52]

### 2.6.2 ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast)

เป็นเซลล์ที่เพิ่มจำนวนง่าย สามารถแสดงลักษณะเด่นทางกายภาพของเซลล์คอนโดโรไซต์เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม French [59] ให้โกรทแฟกเตอร์ IGF-1 แก่เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังคนก่อนนำไปเลี้ยงในสภาวะที่มี aggrecan พบผลบวกในการย้อมสีติด GAGs และ คอลลาเจนชนิดที่ 2 Lee [60] ฉีดไฟโบรบลาสต์ และ TGF- $\beta$ 1 เข้าไปยังบริเวณกระดูกอ่อนที่บกพร่อง หลังจาก 6 สัปดาห์พบกระดูกอ่อนชนิด hyaline เกิดขึ้นมาใหม่

### 2.6.3 Stem cell

ปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เพราะเป็นเซลล์ที่มีศักยภาพหลากหลายสามารถ differentiate ไปเป็นเซลล์หลายชนิด เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSCs) พบอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งมีความสามารถที่จะแปรเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกอ่อน (chondrocyte) เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เซลล์สร้างไขมัน (adipocyte) ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ [61,62] โดยอาศัยปัจจัยกระตุ้นภายนอกที่จำเพาะของเซลล์ที่ต้องการให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์พัฒนาไปเป็นเซลล์

นั้นๆ เช่น โกรทแฟกเตอร์ที่มีบทบาทต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงฟัน (dental pulp stem cell) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ กล่าวคือ เซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงฟันสามารถที่จะมีพฤติกรรมเปลี่ยนไปเป็นเซลล์อื่นไม่ว่าจะเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อนหรือเซลล์ไขมันได้ โดยการเลี้ยงในสารตัวกลางที่ต้องการให้แปรเปลี่ยนไปเป็นเซลล์นั้นๆ [30] กระบวนการนำเซลล์มาใช้ ต้องผ่านกระบวนการผ่าตัดและแยกเซลล์ออกมาจากอวัยวะที่ต้องการเซลล์ ซึ่งอาจส่งผลถึงปัญหาทางจริยธรรม ทว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงฟันสามารถได้จากฟันที่จำเป็นต้องถอน เช่น ฟันคุด จึงไม่ส่งผลถึงปัญหาทางจริยธรรม



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 3

### ขั้นตอนการทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1 เครื่องเคลือบทอง (JEOL JFC-1100E)
- 3.2.2 เครื่อง scanning electron microscope; SEM (JEOL JSM-5200)
- 3.2.3 เครื่อง FT-IR; attenuated total reflection (Thermo Nicolet Nexus<sup>®</sup> 670)
- 3.2.4 เครื่องวิเคราะห์มุมของน้ำ Contact angle goniometer (KRUSS GmbH Germany; Model: DSA10 Mk2T1C)
- 3.2.5 ชุดเครื่องมือวัดความหนาแน่น (Sartorius YDK01)
- 3.2.6 เครื่อง freeze-dry (LABCONCO)
- 3.2.7 อ่างน้ำร้อนแบบเขย่า (MODEL: VS1205SW1)
- 3.2.8 เครื่องทดสอบพอลิเมอร์ Universal Testing Machine (INSTRON 4206)
- 3.2.9 Thermospectronic Genesis10 UV-visible spectrophotometer
- 3.2.10 Microplate reader (TECAN: infinite M200)
- 3.2.11 เครื่องทดสอบความหนืด (Brookfield)

#### 3.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์

- 3.3.1 พอล리카โพรแลกโตน (Polycaprolactone, PCL; 80,000 g mol<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.2 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl; Ajax Finechem, Australia)
- 3.3.3 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, DCM; Labscan; Asia, Thailand)
- 3.3.4 ไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (Dimethylformamide, DMF; Labscan; Asia, Thailand)
- 3.3.5 เจลาติน (Gelatin from porcine skin; Fluka, Switzerland)
- 3.3.6 ไฮยาลูรอน (Hyaluronan; Coach Industries Inc., Japan)
- 3.3.7 คอนโดรอิตินซัลเฟต (Chondroitin sulfate; Sigma, China)

3.3.8 อีดีซี (1- ethy- 3- (3- dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC; Fluka Switzerland)

### 3.3 สารเคมีใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์

3.3.1 ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Adrish,USA)

3.3.2 ซีรัม (FBS, fetal bovine serum; BIOCHROM AG, Germany)

3.3.3 กลูตามีน (L- Glutamine; Invitrogen Corp.,USA)

3.3.4 ยาปฏิชีวนะ และยาต้านเชื้อรา (Invitrogen Corp., USA)

### 3.4 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุน

ละลายพอลิคาโพรแลกโตนในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 4 ส่วนและไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 3 ส่วน (DCM/DMF = 4/3) ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักของพอลิคาโพรแลกโตน 14 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรของตัวทำละลาย คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทเกลือโซเดียมคลอไรด์ขนาดอนุภาค 400-500 ไมครอน ในอัตราส่วนของเกลือ 9 ส่วนโดยน้ำหนัก ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (PCL/NaCl = 1/9) จากนั้นเทสารของผสมเหลวหนึ่งกลงบนแบบทรงกระบอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1 เซนติเมตรแล้วนำไปตั้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป แช่ชิ้นวัสดุทรงกระบอกในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน และเปลี่ยนน้ำทุกๆ 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงแช่ในน้ำกลั่นอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อละลายเกลือออกจากชิ้นวัสดุ จะได้วัสดุทรงกระบอกที่มีรูพรุน ชับน้ำส่วนเกินออกและทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze-dry เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่โครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติ ที่มีรูพรุนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อปรับปรุงพื้นผิววัสดุให้ชอบน้ำมากขึ้นตามการศึกษาของ Pen<sup>a</sup> และคณะ [18] ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งและทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze-dry เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.5 เตรียมโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ผสมเจลาติน-ไฮยาลูโรน-คอนไดรอิตินซัลเฟต

ละลายเจลาติน ไฮยาลูโรนิก และคอนไดรอิตินซัลเฟตในน้ำกลั่น โดยมีปริมาณน้ำหนักกรัมของเจลาตินที่ใช้ศึกษาเท่ากับ 2%, 4% และ 8% ของปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) ซึ่งน้ำหนักไฮยาลูโรนิกและคอนไดรอิตินซัลเฟตโดยให้มีสัดส่วนของสารเป็นกรัมเท่ากับ 0.1% และ 1% ตามลำดับเทียบกับปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Chang และคณะ [43] จากนั้นคนให้สารละลายที่ประกอบด้วยเจลาติน ไฮยาลูโรนิก และคอนไดรอิตินซัลเฟตให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิสารละลายเย็นลงถึง 30 °C แล้วจึงจุ่มชิ้นวัสดุทรงกระบอกพอลิคาโพรแลกโตนที่มีรูพรุนลงในสารละลายเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนไดรอิตินซัลเฟตให้สารละลายท่วมวัสดุเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่สารละลายเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก /คอนไดรอิตินซัลเฟตแทรกซึมเข้าไปเกาะบนชิ้นวัสดุได้ดีโดยไม่ไปอุดตันรู จากนั้นนำชิ้นวัสดุทรงกระบอกพอลิคาโพรแลกโตนที่มีรูพรุนเคลือบด้วย เจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนไดรอิตินซัลเฟตไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้เป็นเจลก่อนนำไปผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะตามการศึกษาของ Lien และคณะ [21] แล้วจึงแช่ชิ้นวัสดุทรงกระบอกพอลิคาโพรแลกโตนที่มีรูพรุนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนไดรอิตินซัลเฟตในสารละลาย EDC ความเข้มข้น 0.8% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดพิษตามการศึกษาของ Chen และคณะ [22] ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ -40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป lyophilize ที่ -40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.6 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนจากพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนไดรอิตินซัลเฟต

#### 3.6.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (IR)

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีของวัสดุด้วยเครื่อง Thermo Nicolet Nexus<sup>®</sup> 670 fourier-transformed infrared spectrophotometer (FTIR) โดยติดตั้งอุปกรณ์เสริม attenuated total reflectance (ATR) จากการสแกน 32 ครั้งต่อการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ด้วยค่า resolution เท่ากับ 4 cm<sup>-1</sup>

### 3.6.2 ลักษณะพื้นผิวของวัสดุและขนาดของรู

นำชิ้นส่วนวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ติดบน stub ทองแดง เคลือบชิ้นวัสดุด้วยทองเป็นเวลา 4 นาที โดยใช้เครื่อง JEOL JFC-1100E sputtering device และนำไปส่องดูโครงสร้างวัสดุด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM) รุ่น JEOL JSM-5200 แล้วหาค่าเฉลี่ยของรูจากการวัดบนชิ้นวัสดุ 30 รู ทั้งแนวตั้งและแนวนอนด้วยโปรแกรม UTHSCSA Image Tool version 3.0

### 3.6.3 ความพรุนและปริมาตรของรู

ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ ( $\rho_{\text{scaffold}}$ ) หาได้จากเครื่องวัดความหนาแน่น Sartorius YDK01 โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการดังต่อไปนี้

$$\rho_{\text{scaffold}}^* (\text{g/cm}^3) = \frac{W_a \times \rho_w}{W_a - W_{\text{fl}}}$$

$W_a$  คือน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ในอากาศ

$W_{\text{fl}}$  คือน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ขณะลอยในน้ำ

$\rho_w$  คือความหนาแน่นของน้ำ (ที่ 25°C,  $\rho_w \approx 1 \text{ g/cm}^3$ )

ความพรุนของรูคำนวณจากสมการดังนี้ [63]

$$\text{Porosity}^* (\%) = \left( 1 - \frac{\rho_{\text{scaffold}}}{\rho_{\text{pcl}}} \right) \times 100$$

ปริมาตรของรูคำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{Pore volume}^* (\text{cm}^3/\text{g}) = \frac{1}{\rho_{\text{scaffold}}} - \frac{1}{\rho_{\text{pcl}}}$$

$\rho_{\text{scaffold}}$  คือความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน

$\rho_{\text{pcl}}$  คือความหนาแน่นของพอลิคาโพรแลกโตนที่ไม่มีรู

หมายเหตุ \*แต่ละค่าใช้จำนวนตัวอย่างทำซ้ำทั้งหมด 10 ครั้ง

### 3.6.4 ทดสอบสมบัติเชิงกล

ตัดชิ้นส่วนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนทั้งที่เคลือบด้วยเจลาตินและไม่ได้เคลือบจากแผ่นโครงเลี้ยงเซลล์ทรงกลมที่ขึ้นรูปบนจานเพาะเชื้อให้มีความยาว 50 มิลลิเมตร กว้าง 10 มิลลิเมตร หนา 3 มิลลิเมตร ( $50 \times 10 \times 3 \text{ mm}^3$ ) จุ่มใน PBS แล้วซับน้ำส่วนเกินออก วัดค่า tensile strength, Young' modulus และ elongation at break ของชิ้นวัสดุด้วยเครื่อง Universal Testing Machine (Instron) ค่า load cell 0.01 นิวตันที่ความเร็ว 2.5 มิลลิเมตรต่อนาที ทำซ้ำทั้งหมด 5 ครั้งต่อตัวอย่างแต่ละชนิดแล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

### 3.6.5 สมบัติการชอบน้ำของพื้นผิววัสดุ

วางชิ้นวัสดุบนกล่องวางตัวอย่าง หยดน้ำกลั่นเพียงหนึ่งหยดจากปลายเข็มขีดยา คำนวณ ของน้ำที่สัมผัสกับพื้นผิววัสดุหาได้จากเครื่องวิเคราะห์มุมสัมผัสของน้ำ (water contact angle analysis) ด้วยระบบ sessile drop ทำซ้ำสองครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

### 3.6.6 ความสามารถในการดูดซับน้ำ

ชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ขณะแห้ง นำไปแช่ในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS pH 7.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นวัสดุขึ้นมาวางบนกระดาษกรองเป็นเวลา 10 วินาทีเพื่อซับน้ำส่วนเกินออก แล้วนำชิ้นวัสดุไปชั่งน้ำหนัก ค่าการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์คำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Water absorption* (\%)} = \frac{(W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}})}{W_{\text{dry}}} \times 100$$

$W_{\text{dry}}$  น้ำหนักแห้งของชิ้นวัสดุ (ก่อนแช่ใน PBS)

$W_{\text{wet}}$  น้ำหนักเปียกของชิ้นวัสดุ (หลังแช่ใน PBS)

3.6.7 ทดสอบการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนไดรอิตินซัลเฟตในห้องปฏิบัติการ

ชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ขณะแห้ง แช่ชิ้นวัสดุในสารละลาย phosphate buffer saline pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในอ่างเขย่า (shaking bath) ด้วย



ความเร็ว 70 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำชิ้นตัวอย่างไปแช่แข็งที่ -40 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปเข้าเครื่อง freeze-dry ซึ่งน้ำหนักชิ้นส่วนของโครงเลี้ยงเซลล์ขณะแห้ง

$$\text{Remaining weight* (\%)} = \frac{W_{\text{หลัง}}}{W_{\text{ก่อน}}} \times 100$$

$W_{\text{ก่อน}}$  น้ำหนักแห้งของชิ้นวัสดุก่อนแช่ใน PBS

$W_{\text{หลัง}}$  น้ำหนักแห้งของชิ้นวัสดุหลังแช่ใน PBS

หมายเหตุ \*ใช้ตัวอย่าง 5 ชิ้นต่อการวัดแต่ละกลุ่ม แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

### 3.7 การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพ

#### 3.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

dental pulp stem cells (DPSCs) จะเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของฟันที่ถูกถอนเนื่องจากเป็นฟันคุดหรือเพื่อการจัดฟันโดยฟันนั้นจะต้องไม่มีรอยโรคของฟันหรือเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue) และได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยในการนำมาใช้ในงานวิจัย วิธีการเพาะเลี้ยงจะทำตามที่เคยรายงานไว้แล้วของ Pavasant และคณะ [64] ซึ่งมีวิธีโดยย่อคือ ฟันที่ได้จะถูกนำมาผ่าเป็นสองส่วนเพื่อดึงเอาเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมาจากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปหว่านในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตรอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อหรือคือ ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS ร้อยละ 10 กลูตามีน (glutamine) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์สร้างเส้นใยคลานออกจากชิ้นเนื้อจากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้งเมื่อเซลล์ที่คลานออกจากชิ้นเนื้อเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-5 โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 5% ของความชื้นในบรรยากาศ

### 3.7.2 ความเป็นพิษของวัสดุต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษทางอ้อม (Indirect cytotoxicity test) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปจากพอลิคาโปรแลกโตน และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบพื้นผิวด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตด้วยด้วย DPSCs เป็นเซลล์อ้างอิง เตรียม extraction media โดยแช่ชิ้นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิกรัมใน serum free media 1 มิลลิลิตร [ISO 10993-12] (SFM; ประกอบด้วย DMEM, 1% antibiotics และ antimycotics, 1% L- glutamine และ 1% L- lactabumin) เป็นเวลา 3 วัน ซึ่ง extraction media จะถูกนำมาใช้ทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ภายหลัง DPSCs ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 48 หลุม ด้วยจำนวนของเซลล์ 20,000 เซลล์ต่อหลุม ใน DMEM ที่มีซีรัม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะลงบนพื้นผิวจาน จากนั้นทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตด้วยการใส่ SFM ลงไปแทนที่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเปลี่ยนเป็น extraction media โดยทำซ้ำสามหลุมต่อตัวอย่าง extraction media หนึ่งชนิด หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงจึงนำมาหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay

MTT เป็นสารมีสีเหลือง จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของเกลือเตตราโซเลียม (tetrazolium salt) กลายเป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งมีสีม่วง เมื่อถูกรีดิวซ์ (reduced) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ที่หลั่งออกมาจากไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ที่มีกิจกรรม จำนวนผลึกฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต MTT assay ทำได้โดยใส่สาร MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปแทนที่มีเดียในปริมาณ 300 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปอบในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที ใช้สารของละลายของ dimethylsulfoxide (DMSO) 720 ไมโครลิตรต่อหลุม และ glycine buffer (pH=10) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน เขย่า 10 นาที เพื่อให้ได้สารละลายสีม่วงเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายสีม่วงไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Thermospectronic Genesis 10 uv/visible spectrophotometer ที่ 570 นาโนเมตร สร้างกราฟเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีกับกลุ่มควบคุม (ใช้ DMEM เลี้ยงเซลล์)

3.7.3 การเกาะและการเจริญของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิติตินซัลเฟต

วางโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชั้นที่ถูกตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางพอดีกับหลุมเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ทำซ้ำ 5 หลุมต่อตัวอย่างแต่ละชนิด (ตัวอย่างมีดังนี้ พอลิคาโพรแลกโตนพอลิคาโพรแลกโตนที่แช่เบส พอลิคาโพรแลกโตนเคลือบเจลาติน 4% พอลิคาโพรแลกโตนเคลือบเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิติตินซัลเฟต) แช่ด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำความสะอาดโครงเลี้ยงเซลล์ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave แล้ว 2 ครั้ง ตามด้วย PBS 1 ครั้ง แช่โครงเลี้ยงเซลล์ด้วย SFM ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนดูดทิ้งแล้วใส่ DPSCs ลงไปบนผิวของโครงเลี้ยงเซลล์จำนวน 10,000 เซลล์ต่อโครงเลี้ยงเซลล์หนึ่งชั้น ใส่ DMEM 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปใส่ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ของความชื้นในบรรยากาศ การศึกษาการยึดเกาะ จะดูที่เวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการหว่าน สำหรับการศึกษาการเจริญของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ ทำโดยปล่อยให้เซลล์เจริญบนโครงเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS 1 รอบเพื่อล้างเซลล์ที่ไม่เกาะบนโครงวัสดุออก จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตบนโครงเลี้ยงเซลล์หาได้จาก MTS cell proliferation assay โดยใช้ Cell Titer 96 Aqueous One Solution ซึ่งในสารละลายประกอบด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, innersalt (MTS) และ phenazine ethosulfate ซึ่งทำหน้าที่เป็น electron coupling reagent สารประกอบ MTS ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ที่หลั่งออกมาจากไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ที่มีการทำงานเกิดเป็นฟอร์มazan ที่ละลายน้ำได้ให้สารที่มีสีส้มซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร สร้างกราฟเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

สำหรับการศึกษารูปร่างของเซลล์ที่เกาะบนโครงช่วงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงสามารถติดตามได้จากการส่องดูด้วย SEM วัสดุตัวอย่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตรถูกนำมาเลี้ยงในหลุมเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุม เมื่อครบเวลาต่างๆที่กำหนดจึงดูดมีเดียเลี้ยงเซลล์ออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้ว fix เซลล์ด้วย สารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 3% ที่เจือจางมาจากกลูตาโรลดีไฮด์ 50% ด้วย PBS ในปริมาณ 300 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 30 นาทีจึงล้างออกด้วย PBS จากนั้นเอาน้ำออกจากชิ้นวัสดุ (dehydrate) ด้วยสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 30%, 50%, 70% และ 90%

ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 2 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย hexametyldisilazane (HMDS) 5 นาที ดูดเอา HMDS ออก ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท นำชิ้นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ติดลงบน stub เคลือบด้วยทองคำก่อนนำไปส่องดูด้วย SEM

### 3.8 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

มีการรายงานค่าในรูปแบบค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้โปรแกรม SPSS ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูล ทดสอบการกระจายตัวแบบปกติของข้อมูล แล้วจึงวิเคราะห์ข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบกลุ่มข้อมูลด้วย unpaired *t*-test โดยพิจารณาระดับนัยสำคัญที่  $p < 0.05$



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

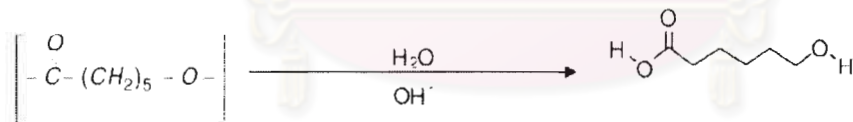


## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

#### 4.1 การขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนจากพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต

พอลิคาโพรแลกโตน (PCL, Mn = 80,000 กรัม/โมล) ที่มีรูพรุนเตรียมได้ด้วยเทคนิคการระเหยตัวทำละลายออกจากสารละลายพอลิคาโพรแลกโตนในสัดส่วนความเข้มข้นตามที่ระบุในบทที่แล้ว และละลายอนุภาคของเกล็ดออก จะได้ชิ้นวัสดุที่มีรูพรุนและมีรูปร่างทรงกระบอกตามภาชนะที่ใส่ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร สูง 2.5 มิลลิเมตร เทคนิคการขึ้นรูปแบบระเหยตัวทำละลายและชะล้างเอาอนุภาคออกนี้เป็นอีกเทคนิคหนึ่งนิยมในวิศวกรรมเนื้อเยื่อสำหรับใช้ขึ้นรูปโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการให้มีรูพรุน [63, 65] เพราะเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน การควบคุมรูปร่างและขนาดของรูทำได้ไม่ยาก ด้วยการคัดเลือกรูปร่าง ชนิด และขนาดของตัวที่ทำให้เกิดรู เกล็ดโซเดียมคลอไรด์เป็นอนุภาคทำให้เกิดรูที่มีราคาถูก หาได้ง่ายและไม่เป็นพิษ นอกจากนี้ยังกำจัดออกได้ง่ายเพียงแค่นำไปละลายน้ำ รูปร่างของวัสดุยังออกแบบได้ตามแบบของภาชนะที่ใส่สารละลายเหลวชั้นพอลิคาโพรแลกโตนและตัวที่ทำให้เกิดรู จากนั้นชิ้นวัสดุดังกล่าวถูกนำไปผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อเพิ่มความชอบน้ำให้กับพื้นผิววัสดุ [13]



ภาพที่ 4.1 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายเบสของพอลิคาโพรแลกโตน (Tan and Teoh, 2007 [17]) แสดงโครงสร้างทางเคมีของพอลิคาโพรแลกโตนเมื่ออยู่ในสารละลายเบสเกิดโครงสร้างที่มีหมู่คาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล

กระบวนการดังภาพที่ 4.1 เกิดขึ้นโดยมีเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้าร่วมปฏิกิริยา ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (-COOH) และไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำมากกว่าพันธะเอสเทอร์ ชิ้นวัสดุหลังจากผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสแล้ว นำไปจุ่มในสารละลายผสมเจลาตินชนิด A ที่ความเข้มข้นต่างซึ่งในที่นี้ศึกษาที่ 2%, 4% และ 8% ไฮยาลูโรนิก 0.1% (w/v) คอนไดรอิตินซัลเฟต 1% (w/v) ในเวลาที่พอเหมาะเนื่องจากพอลิเมอร์จากธรรมชาติกลุ่มนี้เป็นสารละลายพอลิเมอร์ที่มีประจุ โดยเจลาตินละลายน้ำ

ให้ประจุบวก ไฮยาโลโรนิกและคอนโตริตินซัลเฟตมีประจุลบ ทำให้โมเลกุลเหล่านี้สามารถรวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนด้วยแรงทางประจุ และอาจเกาะบนผิววัสดุพอลิเมอร์สังเคราะห์บางชนิดอย่างพอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซ์แล้ว ทั้งนี้สารละลายเจลาตินไฮยาโลโรนิก คอนโตริตินซัลเฟต เมื่อลดอุณหภูมิลงจะมีลักษณะจับตัวเป็นเจล ซึ่งอาจปกคลุมรูพรุนของวัสดุ การนำไปแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้น เมื่อผ่านกระบวนการระเหิดน้ำแข็งออก (lyophilization) จะทำให้มีรูพรุนขนาดเล็กเกิดขึ้นอีกครั้ง และแห้งเป็นของแข็งเคลือบอยู่บนผิววัสดุของพอลิคาโพรแลกโตน เทคนิคการทำให้เกิดรูพรุนโดยการแช่แข็งนี้ (freeze-drying) เหมาะสมสำหรับวัสดุที่ละลายน้ำได้เพราะภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์จะมีโมเลกุลน้ำแทรกอยู่เมื่อแช่เย็นต่ำกว่าศูนย์องศาเซลเซียสจึงเกิดผลึกน้ำแข็งได้ ทั้งนี้การใช้พอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ทำให้เกิดข้อจำกัดการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะสมบัติการเป็นเจลที่ผันกลับได้ตามอุณหภูมิของเจลาติน ดังนั้นกระบวนการเชื่อมพันธะจึงเข้ามามีบทบาทในการลดข้อด้อยที่มีอยู่นี้ สารละลาย EDC ในปริมาณที่พอเหมาะช่วยให้เกิดกระบวนการเชื่อมโมเลกุลได้ ที่ความเข้มข้นสารละลาย EDC 0.8% (w/v) ทำให้เจลาตินมีเสถียรภาพที่สุดและไม่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากกระบวนการเชื่อมพันธะที่เป็นพิษต่อเซลล์เหมือนกับกลูตาโรลดีไฮด์ [22] ในการศึกษาทดลองนี้มีขั้นตอนการปรับปรุงเสถียรภาพของเจลาตินโดยการทำให้เป็นเจลก่อนนำไปแช่ในสารละลาย EDC จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งและระเหิดน้ำแข็งออก เนื่องจากวิธีนี้ทำให้ผนังของรูที่ได้บางกว่าและมีจำนวนรูพรุนมากกว่าวิธีการผสมตัวเชื่อมพันธะลงไปกับสารละลายเจลาตินตั้งแต่แรกก่อนนำไปแช่แข็ง ดังนั้นจะมีพื้นที่ให้เซลล์เกาะได้มากกว่า [51] การเกาะของสารละลายเจลาติน ไฮยาโลโรนิก คอนโตริตินซัลเฟตบนพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตน สามารถตรวจสอบเบื้องต้นได้จากปริมาณน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหลังจากขึ้นรูปเสร็จแล้วเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนขณะแห้ง จากตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าวิธีการอย่างง่ายด้วยเพียงจุ่มวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนลงในสารละลายเจลาตินสามารถทำให้สารละลายเจลาตินเกาะบนพื้นผิววัสดุได้ ยังมีความเข้มข้นของเจลาตินมากก็ยังมีปริมาณเจลาตินมาเกาะมาก การตรวจสอบนี้สามารถยืนยันด้วยหุ่ฟุ้งอีกครั้้งด้วยเทคนิค FTIR

ความเข้มข้นของเจลาติน (%w/v)	ปริมาณน้ำหนัที่เพิ่มขึ้น (%) *
2	10.88 ± 4.2
4	29.14 ± 4.0
8	52.80 ± 4.2

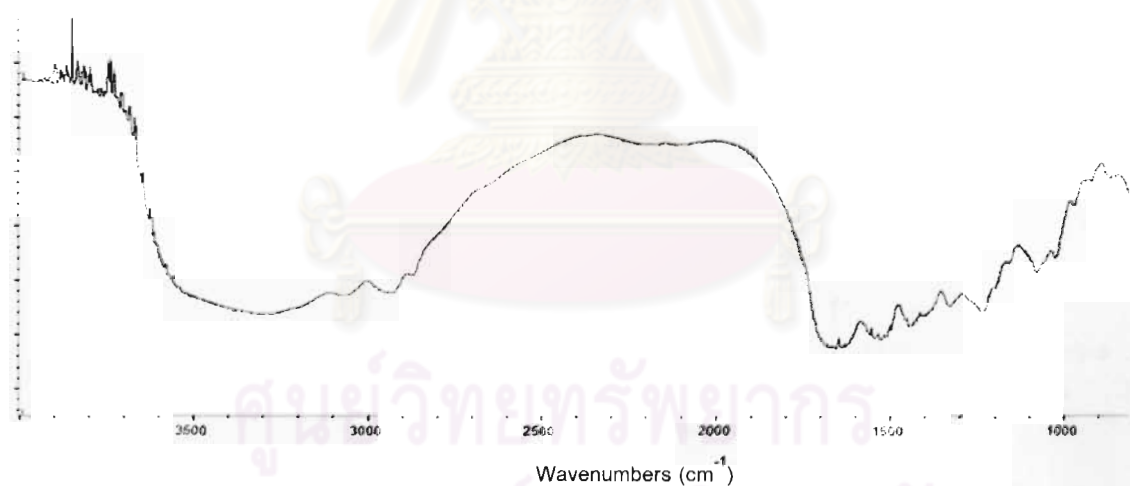
ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนหลังเคลือบด้วยเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ (\*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบ 4 ครั้ง ครั้งละ 5 ชั้น)

#### 4.2 การวิเคราะห์ทางอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

ชั้นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนหลังจากเคลือบผิววัสดุด้วยสารละลายเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิติตินซัลเฟตแล้ว ถูกนำมาตรวจวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีเพื่อยืนยันการเกาะของสารละลายเจลาตินบนผิววัสดุ ภาพที่ 4.2 ก – 4.2 ค แสดงสเปกตรัม FTIR ของเจลาติน ไฮยาลูโรนิก และคอนโตรอิติตินซัลเฟตตามลำดับ ภาพที่ 4.2 ง – 4.2 ช แสดงสเปกตรัม ATR-FTIR ในช่วง  $3500-1000\text{ cm}^{-1}$  ของชั้นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิคาโพรแลกโตนก่อนและหลังไฮโดรไลซ์ พอลิคาโพรแลกโตนเคลือบเจลาตินและเคลือบด้วยสารละลายผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิติตินซัลเฟต ภาพที่ 4.2 ง – 4.2 ช แสดงสเปกตรัมช่วง  $2950-2750\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งตรงกับการสั่นแบบยืดออกจากคาร์บอนไปยังไฮโดรเจนของ  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$  และ  $-\text{CH}_3$  ในภาพที่ 4.2 ง พบพีกของคาร์บอนิล ( $\text{C}=\text{O}$ ) ที่  $1718\text{ cm}^{-1}$  โครงสร้างทางเคมีของพอลิคาโพรแลกโตน ทั้งก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์ด้วยเบสไม่พบความแตกต่าง รูป 4.1 ฉ และ 4.2 ซ พบสเปกตรัมการดูดกลืนเป็นช่วงกว้างพีก  $3100-3500$  ของซึ่งตรงกับการสั่นแบบยืดออกของหมู่  $1^\circ$  เอไมด์ ( $-\text{NH}_2$ ) ในโครงสร้างของเจลาติน สเปกตรัมที่  $1630\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงหมู่เอไมด์คาร์บอนิล ( $-\text{CONH}$ ) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่พบได้ในโปรตีนทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบพีกที่  $1655$ ,  $1546$ ,  $1450$  และ  $1235\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงพันธะเอไมด์ ซึ่งยืนยันถึงโครงสร้างของเจลาตินที่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะแล้ว [66,67] ขณะเดียวกันพีกเกลือคาร์บอกซิเลต (carboxylate salts) ที่  $1412\text{ cm}^{-1}$  และพันธะเอสเทอร์ที่  $1076\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงหน่วยซ้ำของกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และอะซิติลกลูโคซามีน (acetylglucosamine) ของโครงสร้างไฮยาลูโรนิก

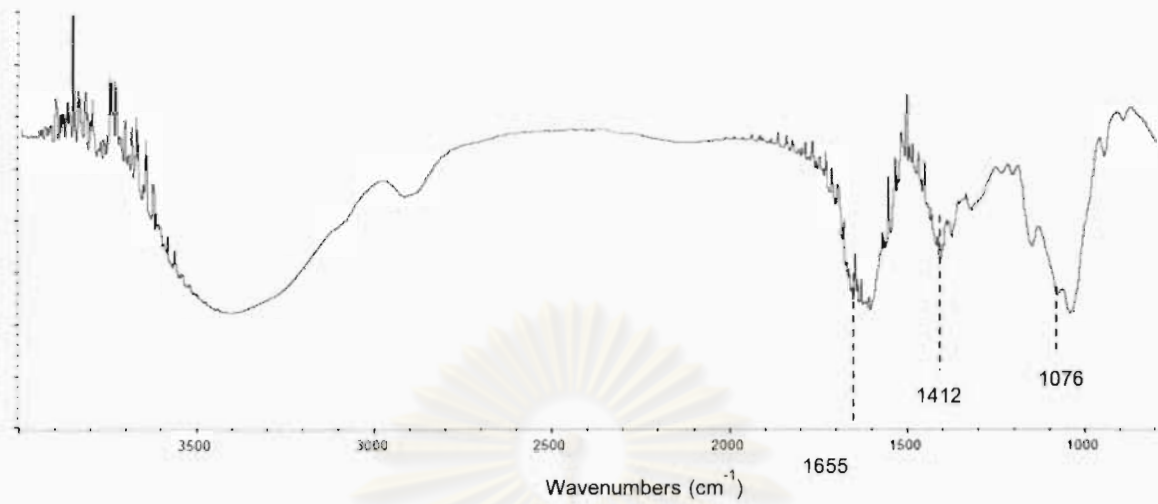
การเชื่อมพันธะด้วย EDC ทำให้โครงสร้างทางโมเลกุลเชื่อมพันธะกันเป็นหมู่ฟังก์ชันเอไมต์และเอสเทอร์ (-COO) พันธะเอไมต์เกิดขึ้นได้จากการรวมพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของเจลาตินและกับหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) ของเจลาติน หรือกรดกลูคูโรนิกในไฮยาลูโรนิกกับหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) ของเจลาติน ส่วนพันธะเกิดเอสเทอร์อาจเกิดจากการรวมพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล (-OH) ของเจลาตินหรือไฮยาลูโรนิก [68]

การตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีนี้สามารถยืนยันได้ดีถึงการเกาะอยู่บนพื้นผิวของโครงสร้างเจลาตินและไฮยาลูโรนิก ดังนั้นการปรับปรุงคุณสมบัติโครงสร้างเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนด้วยการจุ่มวัสดุในสารละลายเจลาตินจึงเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจในท่ามกลางเทคนิคการปรับปรุงคุณสมบัติพื้นผิวอื่นๆ [69-70] เพราะทำได้ง่าย ประหยัดเวลา มีตัวกลางเป็นน้ำจึงไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หรือเทคนิคพิเศษใดมาช่วย สามารถนำไปใช้กับวัสดุที่มีรูปร่างแบบใดก็ได้ เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้กับวัสดุพอลิเอสเทอร์ชนิดอื่น

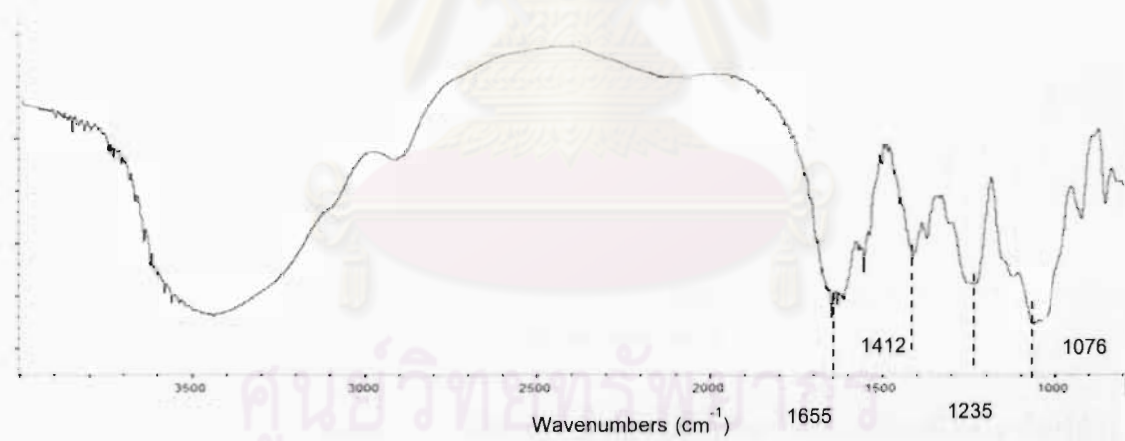


ภาพที่ 4.2 ก FTIR spectra ของเจลาตินชนิด A แสดงสเปกตรัมของ -NH<sub>2</sub> ที่ 3100-3500 cm<sup>-1</sup>

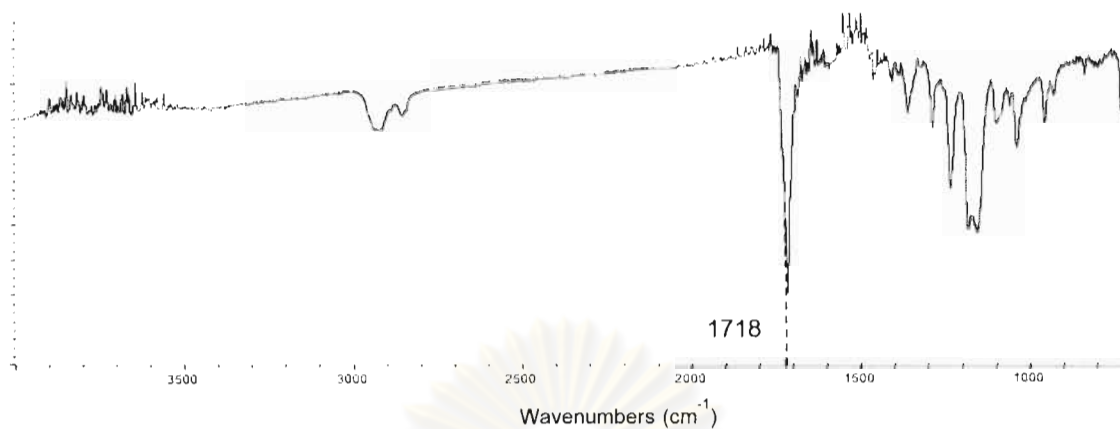




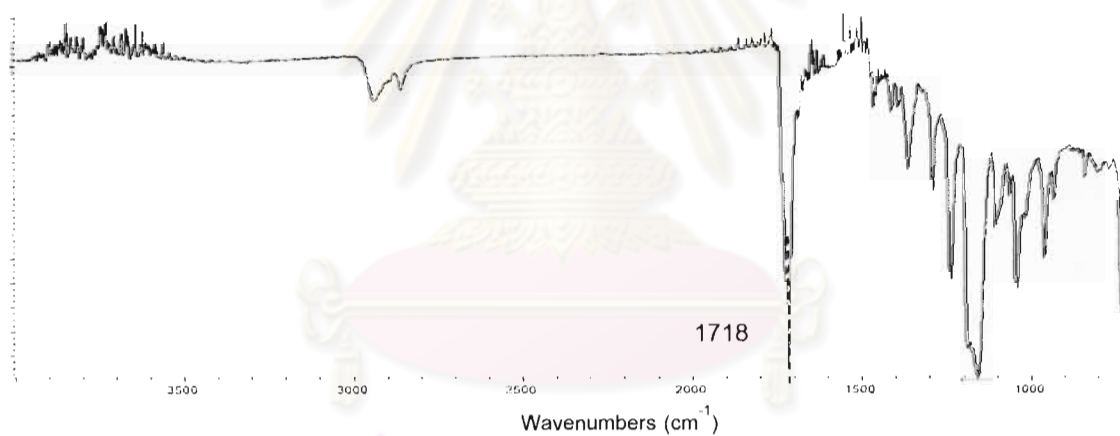
ภาพที่ 4.2 ข FTIR spectra ของไฮยาลูโรนิก แสดงสเปกตรัมของ  $\text{-NH}_2$  ที่  $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  และพีคของหมู่  $\text{-CONH}$ ,  $\text{-COO}^-$  และพันธะเอสเทอร์ที่  $1655$ ,  $1412$  และ  $1076\text{ cm}^{-1}$



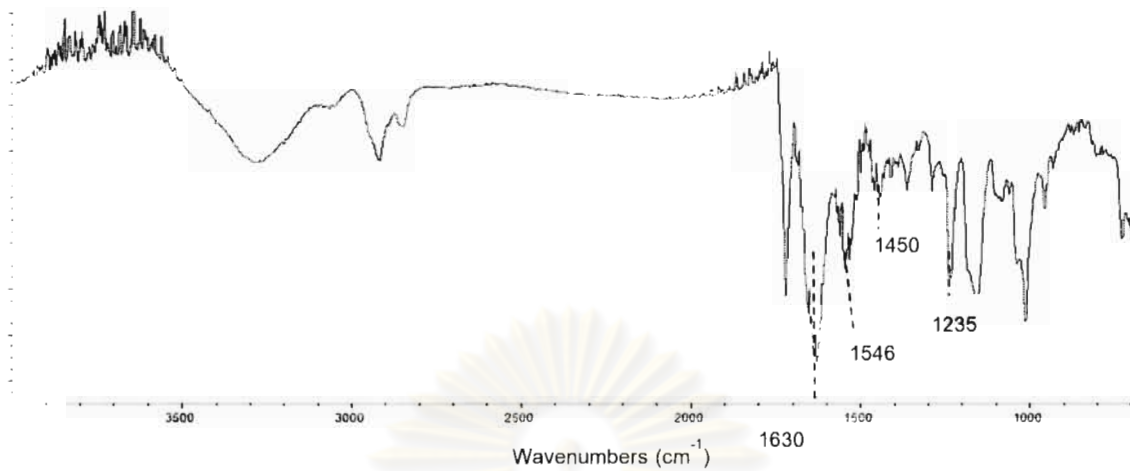
ภาพที่ 4.2 ค FTIR spectra ของคอนไดรอินซัลเฟต แสดงสเปกตรัมของ  $\text{-NH}_2$  ที่  $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  และพีคของหมู่  $\text{-CONH}$  ที่  $1655$  และ  $1235\text{ cm}^{-1}$   $\text{-COO}^-$  ที่  $1412$  และ  $1076\text{ cm}^{-1}$



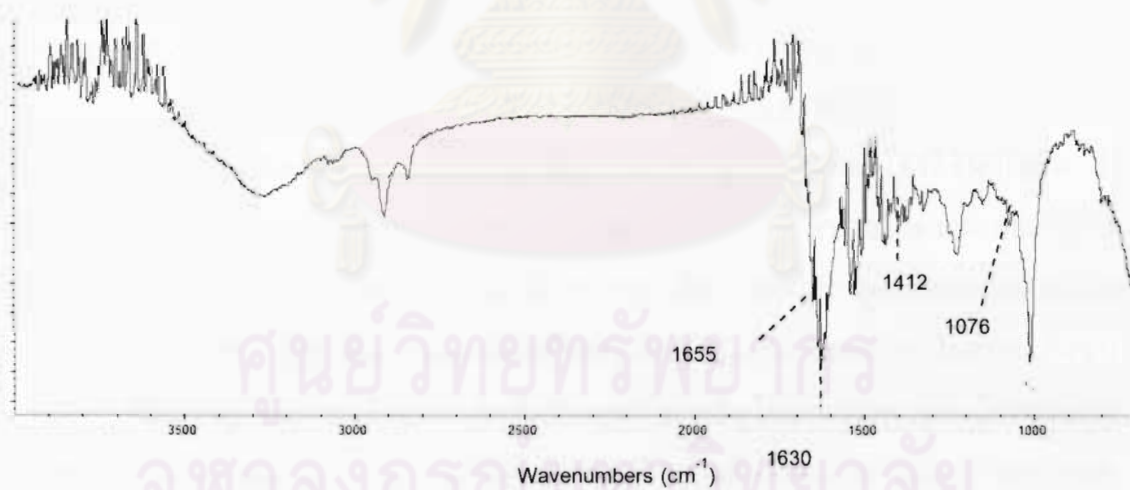
ภาพที่ 4.2 ง ATR-FTIR spectra ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตน แสดงพีด  $\text{-C=O}$  ที่  $1718 \text{ cm}^{-1}$



ภาพที่ 4.2 จ ATR-FTIR spectra ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนที่ไฮโดรไลซ์ด้วย NaOH แสดงพีด  $\text{-C=O}$  ที่  $1718 \text{ cm}^{-1}$



ภาพที่ 4.2 ฉ ATR-FTIR spectra ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วย เจลาติน แสดงสเปกตรัมของ  $\text{-NH}_2$  ที่  $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  พีคของ  $\text{-CONH}$  ที่  $1630\text{ cm}^{-1}$  และพีค ของหมู่  $\text{-CO-NH}$  ที่  $1546, 1450$  และ  $1235\text{ cm}^{-1}$



ภาพที่ 4.2 ช ATR-FTIR spectra ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วย เจลาติน/ไฮยาลูโรนิก/คอนโดรอิติซัลเฟต แสดงสเปกตรัมของ  $\text{-NH}_2$  ที่  $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  พีค ของหมู่  $\text{-CO-NH}$  ที่  $1655\text{ cm}^{-1}$   $\text{-CONH}$  ที่  $1630\text{ cm}^{-1}$  และ  $\text{-COO}^-$  ที่  $1412$  และ  $1076\text{ cm}^{-1}$

### 4.3 การตรวจสอบคุณลักษณะของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์

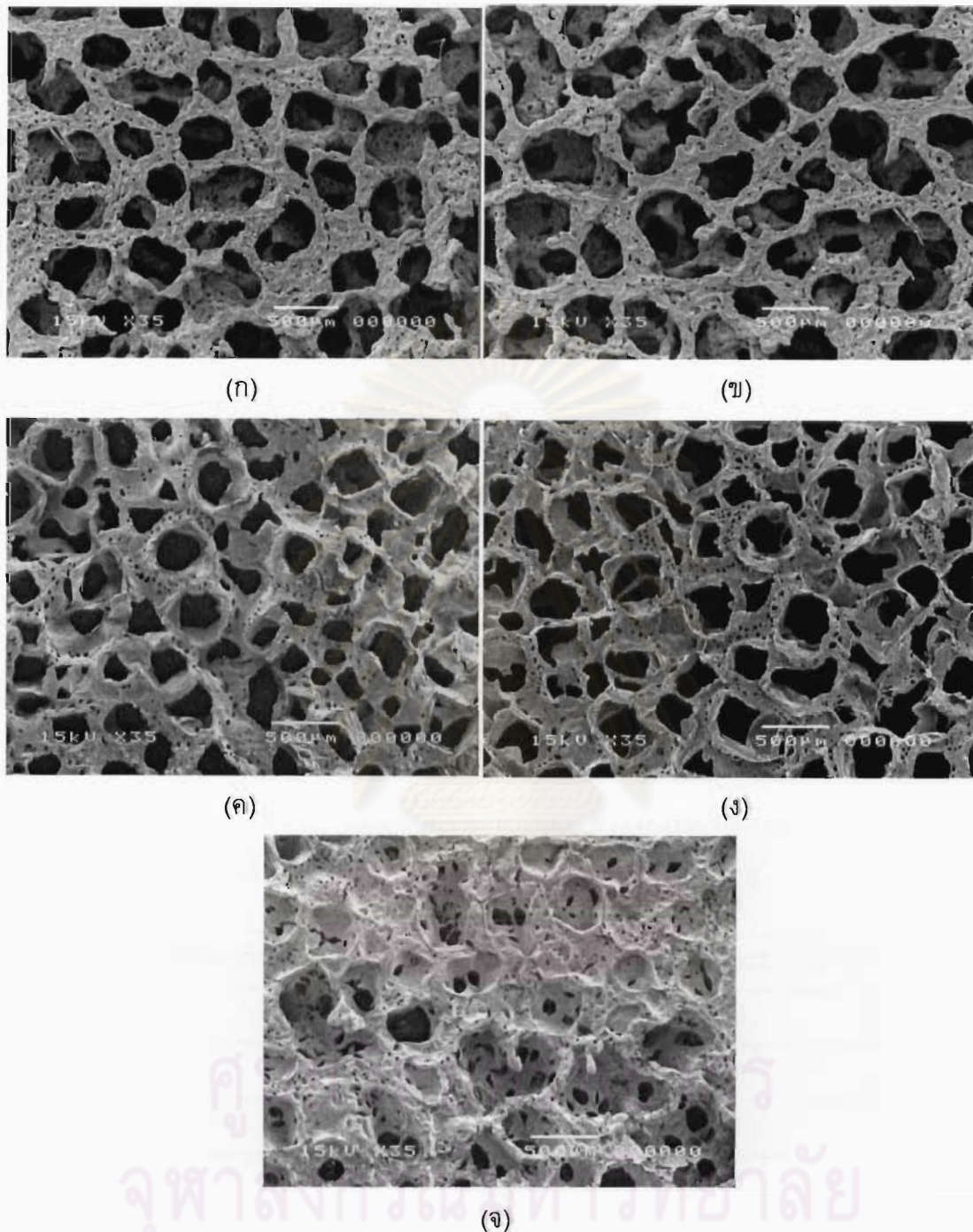
#### 4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์และขนาดของรูพรุนตรวจสอบจาก JOEL JSM 5200 scanning electron microscope ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของวัสดุของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนและพอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต จากภาพแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนและพอลิคาโปรแลกโตนที่มีเจลาติน 2% และ 4% มีลักษณะเป็นรูพรุนเชื่อมถึงกันซึ่งเป็นลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกและกระดูกอ่อน [71] ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนที่มีเจลาติน 8% ถูกสารละลายเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตปกคลุมพื้นผิวเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเจลาตินมีความเข้มข้นสูงทำให้เมื่อระเหิดผลึกน้ำแข็งออกไปแล้วจึงเกิดเป็นรูพรุนขนาดเล็กเพียงบางส่วนบนพื้นผิว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงพอลิคาโปรแลกโตนหลังจากผ่านการแช่เบสยังคงมีลักษณะที่ไม่แตกต่างจากโครงพอลิคาโปรแลกโตนที่ไม่ผ่านการแช่เบส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและขนาดพื้นที่ของรูพรุนวิเคราะห์จากโปรแกรม UTHSCSA Image Tool version 50 ครั้งต่อภาพ โครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนมีขนาดของรู 270-370 ไมครอน มีพื้นที่ของรูตั้งแต่ 59,373 – 91,274 ตารางไมครอน หลังจากเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน 2%/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต วัดขนาดของรูได้ 215-310 ไมครอน มีพื้นที่ของรู 24,907 – 45,741 ตารางไมครอน ขณะที่โครงพอลิคาโปรแลกโตนหลังจากเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน 4%/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตมีขนาดรู 265 – 350 ไมครอนและมีพื้นที่ของรู 29,145 – 51,390 ตารางไมครอน ซึ่งจากการศึกษาที่มีมาก่อนพบว่าเซลล์คอนไดรไซต์หรือเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นกระดูกอ่อนมักชอบเจริญและสร้างโปรตีนในโครงที่มีขนาดรูค่อนข้างใหญ่เพราะต้องการพื้นที่ในการลำเลียงสารอาหารและสร้างสารโมเลกุลใหญ่อย่างคอลลาเจนและโปรติโอไกลแคน ซึ่งขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ควรอยู่ที่ 250-500 ไมครอน [21] จากภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีสารละลายเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตอยู่บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนแล้วทำให้ขนาดของรูแคบลงเพราะมีสารละลายเจลาตินไปเคลือบอยู่บนพื้นผิวของโครง บนพื้นผิวที่มีสารละลายเจลาติน 2% แสดงให้เห็นถึงการเกิดโพรงรูขนาดเล็กกระจายทั่วบริเวณโครงเลี้ยงเซลล์จึงวัดขนาดของรูโดยเฉลี่ยได้น้อยกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายเจลาติน 4% ขณะที่โครงพอลิคาโปรแลกโตนหลังจากเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน

8%/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิดินซัลเฟตมีลักษณะเป็นหลุมเนื่องจากยังไม่เกิดเป็นโพรงที่ชัดเจน แต่มีรูขนาดเล็กเกิดขึ้น

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนหลังจากเคลือบพื้นผิวด้วยสารละลายเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิดินซัลเฟตแล้วมีความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มมากขึ้น แต่มีความพรุนของรูและปริมาตรของรูน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายเจลาตินไปเคลือบอยู่บนโครงพอลิคาโพรแลกโตนทำให้วัสดุมีความหนาแน่นมากขึ้นและขนาดรูของแคบลงซึ่งสังเกตได้จากภาพที่ 4.3 และการคำนวณขนาดของรูที่กล่าวไปก่อนหน้านี้ เมื่อขนาดของรูแคบลงจึงส่งผลให้ปริมาตรรูน้อยลง นอกจากนี้สารละลายเจลาตินบางส่วนอาจไปปกคลุมรูที่มีขนาดเล็กจึงทำให้มีความพรุนของรูลดลงเช่นกัน สำหรับตัวอย่างที่มีเจลาตินความเข้มข้น 2% และ 4% มีค่าไม่แตกต่างกันนัก ทั้งนี้ความพรุนของรูมากหมายความว่าพื้นที่ผิวให้เซลล์เกาะมาก ขณะที่ความหนาแน่นและปริมาตรของรูมีค่ามากแสดงถึงพื้นที่การเกาะน้อยลง ทั้งนี้ควรพิจารณาขนาดของรูพรุนประกอบ จากการใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความพรุนรู 74% ของ Fan และคณะ [52] พบการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

ตาราง 4.3 แสดงค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินที่เตรียมได้ในขั้นตอนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่อง viscometer โดยใช้เข็มสปินเดิลเบอร์ 3 หมุนด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยวัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเดียวกับที่ใช้ในขั้นตอนการขึ้นรูป เนื่องจากสารละลายมีการไหลได้ดียังไม่เป็นเจล ที่ความเข้มข้นเจลาตินเพียง 2% มีค่าความหนืดน้อย ทำให้สารละลายไหลเข้าไปแทรกและเคลือบบนพื้นผิวภายในได้ดี การเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินส่งผลให้สารละลายมีความหนืดมากขึ้น ทำให้การแทรกเข้าไปอยู่ตามพื้นผิวข้างในโพรงเป็นไปได้ไม่ดีนัก สารละลายเจลาติน 4% เมื่อผสมไฮยาลูโรนิก 0.1% และ คอนโตรอิดินซัลเฟต 1% ค่าความหนืดเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ซึ่งอาจส่งผลให้การแทรกตัวเข้าไปเกาะบนพื้นผิวเปลี่ยนไป ส่วนสารละลายเจลาติน 8% มีความหนืดมากกว่าสารละลายเจลาตินถึง 3 เท่า ซึ่งสนับสนุนผลการตรวจสอบด้วย SEM ข้างต้นว่าสารละลายเจลาตินที่มีความเข้มข้นมากจะมีความหนืดสูงขึ้นส่งผลให้การไหลของสารละลายไม่ดี จึงทำให้สารละลายไปปกคลุมรูของวัสดุ



ภาพที่ 4.3 แสดงภาพถ่ายจาก SEM บริเวณพื้นผิวหน้าตัดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปแบบสามมิติมีรูพรุนด้วยเทคนิค salt-leaching ของ (ก) พอลิคาโปรแลกโตน (ข) พอลิคาโปรแลกโตนที่แช่สารละลาย NaOH และเทคนิค freeze-drying หลังจากเชื่อมขวางพันธะด้วย EDC ของวัสดุพอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบด้วยวัสดุผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟตในสัดส่วน น้ำหนักสารในสารละลายดังนี้ (ค) 2%/0.1%/1% (ง) 4%/0.1%/1% (จ) 8%/0.1%/1% ถ่ายด้วยกำลังขยาย 35 เท่าที่สเกลของภาพ 500 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4.2 ความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์และปริมาตรของรูที่หาได้จากการคำนวณจากค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 10 ค่า  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โครงเลี้ยงเซลล์	ความหนาแน่น (g/cm <sup>3</sup> )	ความพรุนของรู (%)	ปริมาตรของรู (cm <sup>3</sup> /g)
พอลิคาโปรแลกโตน	0.1816 $\pm$ 0.0145	84.14 $\pm$ 1.27	4.67 $\pm$ 0.46
พอลิคาโปรแลกโตน+เจลาติน 2%/ ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิติตินซัลเฟต	0.2875 $\pm$ 0.0164	75.20 $\pm$ 1.86	2.45 $\pm$ 0.31
พอลิคาโปรแลกโตน+เจลาติน 4%/ ไฮยาลูโรนิก/คอนโตรอิติตินซัลเฟต	0.2966 $\pm$ 0.0185	74.09 $\pm$ 1.61	2.50 $\pm$ 0.22

หมายเหตุ ค่าความหนาแน่นหาจากการชั่งน้ำหนักตัวอย่างด้วยชุดวัดความหนาแน่น Satorius

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยความหนืดของสารละลายเจลาติน 3 ครั้งของแต่ละตัวอย่าง  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในขั้นตอนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยเครื่อง viscometer ใช้เข็มสปินเดิลเบอร์ 3 หมุนด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของเจลาติน (%w/v)	ค่าความหนืดของสารละลาย (cP)*
2	14.9 $\pm$ 0.46
4	23.0 $\pm$ 0.38
8	68.1 $\pm$ 0.31
4 + HA + CS	46.8 $\pm$ 0.35

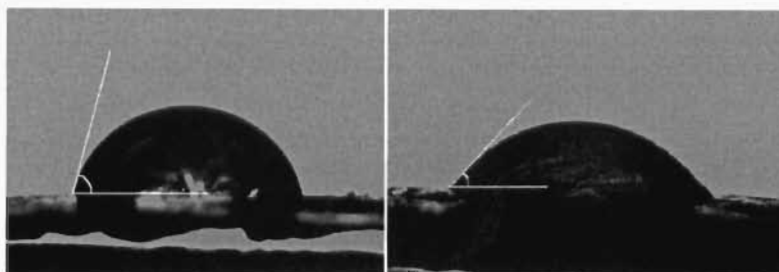
\* centipoises

หมายเหตุ HA = ไฮยาลูโรนิก CS = คอนโตรอิติตินซัลเฟต

### 4.3.2 ความสามารถในการชุ่มน้ำของพื้นผิววัสดุ

การทดสอบความสามารถในการชุ่มน้ำนี้ถูกเป็นออกเป็นสองส่วน โดยวัสดุที่นำมาทดสอบจะอยู่ในรูปของแผ่นบาง ในส่วนแรกเป็นการทดสอบเพื่อศึกษาความชอบน้ำของพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนเมื่อผ่านการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นหนึ่งโมลาร์เปรียบเทียบที่ระยะเวลาต่างๆ ส่วนที่สองเพื่อศึกษาความชอบน้ำของพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาตินเกาะอยู่บนพื้นผิวหลังจากจุ่มในสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ การทดสอบนั้นทำได้โดยหยดน้ำกลั่นจากปลายเข็มฉีดยาลงบนพื้นผิววัสดุผิวเรียบที่วางระนาบกับพื้นโต๊ะ แล้วอ่านค่ามุมของน้ำที่สัมผัสกับพื้นผิววัสดุจากเครื่องวิเคราะห์มุมสัมผัสของน้ำด้วยระบบ sessile drop เมื่อหยดน้ำลงไป หยดน้ำจะเกาะบนพื้นผิวและทำมุมองศา ดังภาพที่ 4.4 พื้นผิววัสดุที่ไม่ชอบน้ำ จะเห็นหยดน้ำมีรูปร่างกลมมากเนื่องจากพื้นที่ผิวของน้ำที่สัมผัสกับพื้นผิววัสดุน้อย ทำให้มีมุมองศาที่กว้าง ในขณะที่พื้นผิววัสดุที่ชอบน้ำจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างวัสดุกับน้ำมากกว่ารูปทรงหยดน้ำจึงเป็นทรงรีมากกว่า ทำให้มีมุมองศาแคบ ดังภาพที่ 4.4 และภาพที่ 4.5 แสดงค่ามุมองศาของหยดน้ำบนพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตนหลังจากแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หนึ่งโมลาร์ พื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตนตามปกติที่เตรียมได้จัดว่าเป็นวัสดุที่ไม่ค่อยชอบน้ำเนื่องจากมุมองศาที่กว้างเป็นมุมป้านถึง 105.2 องศา แต่หลังจากผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเบสแล้ว อาจทำให้โครงสร้างทางเคมีบางส่วนเกิดโครงสร้างที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (-COOH) และไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำมากกว่าพันธะเอสเทอร์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปมุมองศาของน้ำมีค่าค่อยๆ ลดลงจนถึง 73.7 องศา เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปถึง 24 ชั่วโมงมุมองศา ลดลงไม่มากนักและมีค่าอยู่ที่ 67.0 องศา จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการไฮโดรไลซิสวัสดุพอลิเอสเทอร์อย่างพอลิคาโพรแลกโตนด้วยสารละลายเบสช่วยให้พื้นผิวของวัสดุมีความชอบน้ำมากขึ้น แต่การใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นอาจไม่ทำให้วัสดุชอบน้ำมากขึ้นจากเดิมมากเท่าไรนัก จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการแช่วัสดุพอลิคาโพรแลกโตนในเบสหรือการไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการอย่างง่ายที่สามารถช่วยเพิ่มความชุ่มน้ำให้กับพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตนได้ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดที่ตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (-COOH) และไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำมากกว่าพันธะเอสเทอร์ [17] ทั้งนี้ความสามารถในการชุ่มน้ำของวัสดุยังเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่วัสดุถูกไฮโดรไลซ์





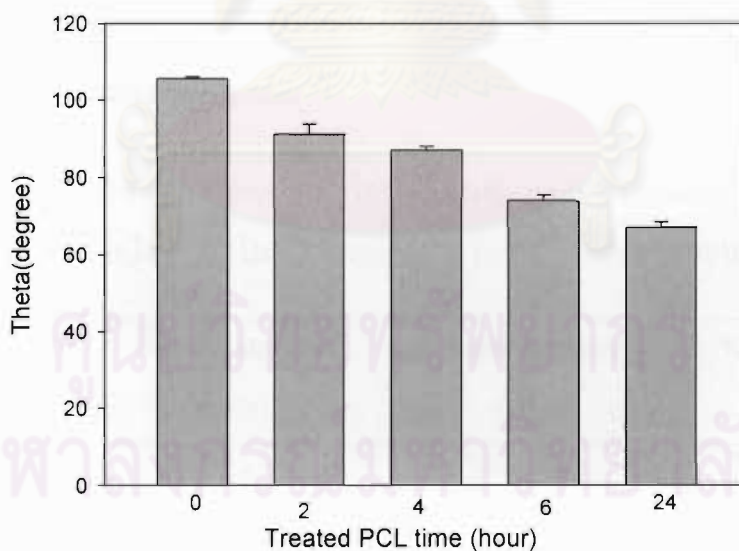
ภาพที่ 4.4 แสดงมุมมองของหยดน้ำที่เกาะบนพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 ชั่วโมง (ซ้าย) และพอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน 4%/ไฮยาลูโรแนน 0.1%/คอนไดรตินซัลเฟต 1% เกาะบนพื้นผิว (ขวา)

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยมุมมองของน้ำที่ลดลง บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างพอลิคาโพรแลกโตนแบบแผ่นฟิล์มหลังจากแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ที่ระยะเวลาต่างๆ (จากการวัด 2 ซ้ำครั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

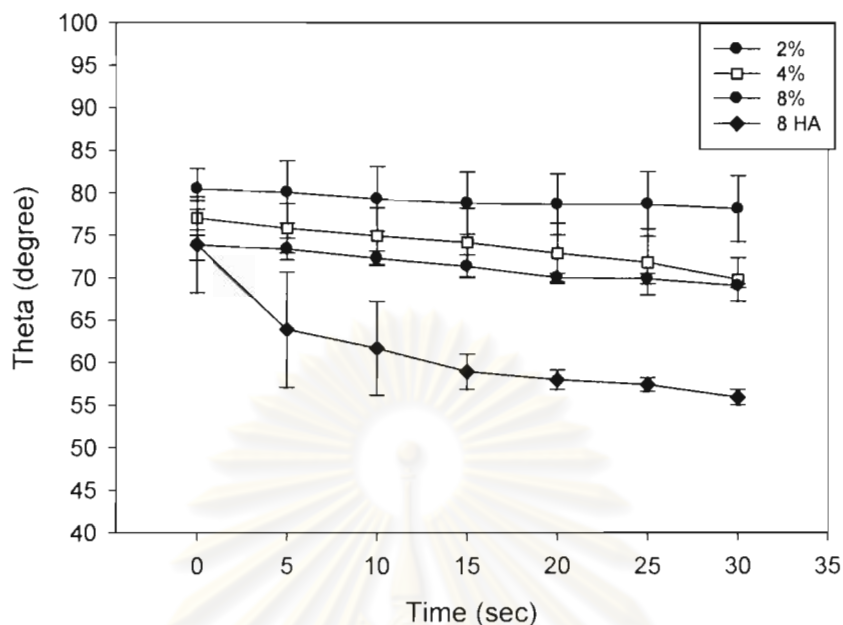
เวลาที่พอลิคาโพรแลกโตนอยู่ในสารละลายเบส (ชั่วโมง)	มุมสัมผัสของน้ำ (องศา)
0	105.2 ± 0.51
2	91.2 ± 2.59
4	86.9 ± 0.90
6	73.7 ± 1.68
24	67.0 ± 1.39

หลังจากการปรับปรุงพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตนให้ชอบน้ำมากขึ้นแล้วยังนำชั้นวัสดุไปเคลือบด้วยพอลิเมอร์ธรรมชาติอย่างเจลาติน เพื่อเพิ่มให้พื้นผิววัสดุชุ่มน้ำได้ดียิ่งขึ้น จากการทดลองในส่วนแรก ส่งผลให้ในการทดลองนี้เลือกใช้พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซิสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงในการเตรียมโครงที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรตินซัลเฟต เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ช่วยเพิ่มสมบัติความชอบน้ำได้พอสมควรและไม่สิ้นเปลืองระยะเวลาในการเตรียมวัสดุ ภาพที่ 4.6 แสดงค่ามุมสัมผัสของน้ำบนแผ่นวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน ความเข้มข้นต่างกันอยู่บนพื้นผิว สำหรับพื้นผิวที่มีเจลาติน มุมของน้ำที่สัมผัสจะเปลี่ยนไปเมื่อระยะเวลาผ่านไป เนื่องด้วยคุณสมบัติที่เป็นไฮโดรเจลทำให้น้ำถูกดูดซึมเข้าไปในโครงสร้างของ

วัสดุ พื้นผิววัสดุที่มีความเจลาตินเข้มข้น 2% มีมุมสัมผัสของน้ำทันทีที่หยดน้ำสัมผัสกับพื้นผิวอยู่ที่ 80.5 องศา เมื่อเวลาผ่านไป 30 วินาทีมีค่ามุมอยู่ที่ 78.2 องศา ซึ่งไม่ต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่าพื้นผิววัสดุที่มีความเข้มข้นเจลาตินน้อยๆ เพียง 2% ดูดซึมน้ำได้ไม่เร็วมากนัก ส่วนพื้นผิวที่มีความเข้มข้นของเจลาติน 4% มีมุมสัมผัสของน้ำเริ่มแรก 77.0 องศาเมื่อเวลาผ่านไป 30 วินาทีเหลือ 69.8 องศา และพื้นผิวที่มีความเข้มข้นของเจลาติน 8% มีมุมสัมผัสของน้ำเริ่มแรก 73.9 องศาเมื่อเวลาผ่านไป 30 วินาทีเหลือ 69.0 องศา จะเห็นได้ว่าพื้นผิววัสดุที่มีความเข้มข้นเจลาติน 4% และ 8% ดูดซึมน้ำได้ดีกว่าจึงมีมุมสัมผัสของน้ำน้อยกว่า ขณะที่วัสดุที่ใส่ไฮยาลูโรนิกลงไปเพียง 0.1% ในสารละลายเจลาติน 8% พบมุมสัมผัสของน้ำเริ่มแรก 78.9 องศา ช่วง 5 วินาทีแรกให้ผลใกล้เคียงกับการทดสอบแผ่นเจลาตินของ Mohan ที่มีก่อนหน้านี้ [72] แต่เมื่อเวลาผ่านไป 30 วินาที กลับมีค่ามุมสัมผัสลดลงถึง 56.0 องศา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่ไฮยาลูโรนิกเพียงเล็กน้อยลงในสารละลายเจลาตินช่วยให้พื้นผิววัสดุดูดซึมน้ำได้ดียิ่งขึ้น เพราะไฮยาลูโรนิกมีหมู่ฟังก์ชันที่มีสมบัติชอบน้ำอย่างคาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล และเอไมด์



ภาพที่ 4.5 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยมุมองศาของน้ำ (แสดงค่าไว้ในตารางที่ 4.4) บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างพอลิคาโปรแลกโตนแบบแผ่นฟิล์มจากการวัดซ้ำ 2 ครั้งต่อแต่ละตัวอย่างหลังจากแช่ในสารละลายไฮยาลูโรนิก 1.0 โมลาร์ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง (แกนนอน)



ภาพที่ 4.6 แสดงกราฟเฉลี่ยมุมองศาของน้ำที่เปลี่ยนไป บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างพอลิคาโปรแลกโตนแบบแผ่นฟิล์มที่เคลือบด้วยเจลาตินเข้มข้น 2%, 4%, 8% และ 8% ที่มีไฮยาโลโรนิก (8 HA) ในเวลาที่เปลี่ยนไป 30 วินาที (จากการวัดซ้ำ 2 ครั้ง)

#### 4.3.3 การทดสอบสมบัติเชิงกลของวัสดุ

ตารางที่ 4.5 แสดงสมบัติทางเชิงกลของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนที่ผ่านการแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยเครื่องทดสอบพอลิเมอร์

ตัวอย่าง	Tensile strength (kPa)	Modulus of elasticity (kPa)	% elongation at break
0 ชั่วโมง	<sup>a</sup> 10.7 ± 2.4	<sup>a</sup> 241.0 ± 54	<sup>a</sup> 35.84 ± 2.49
4 ชั่วโมง	<sup>b</sup> 2.44 ± 3.8	<sup>b</sup> 112.4 ± 10	<sup>b</sup> 24.63 ± 3.76
6 ชั่วโมง	<sup>b,c</sup> 1.86 ± 4.3	<sup>c</sup> 95.8 ± 8	<sup>c</sup> 18.15 ± 1.26
24 ชั่วโมง	<sup>c</sup> 1.48 ± 2.2	<sup>c</sup> 88.7 ± 8	<sup>c</sup> 16.25 ± 1.39
4 ชั่วโมง+เจลาติน 4%	<sup>d</sup> 7.08 ± 1.9	<sup>a</sup> 245.3 ± 36	<sup>b</sup> 27.05 ± 2.33

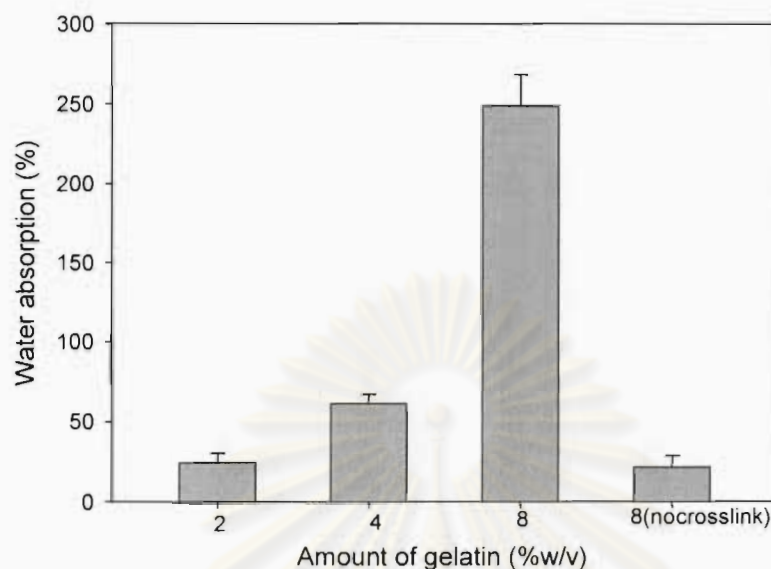
หมายเหตุ a, b, c, d แสดงการจำแนกในการเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการแช่เบสที่ระยะเวลาต่างๆ  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA (แสดงค่าเฉลี่ย 5 ครั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สมบัติทางเชิงกลของวัสดุของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนหลังจากการแช่ในเบสไฮเดียมไฮดรอกไซด์เป็นระยะเวลาต่างๆ และวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน 4% หลังจากผ่านการแช่เบสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้ว แล้วแสดงค่าในลักษณะของความต้านทานแรงดึง (tensile strength) โมดูลัสของสภาพยืดหยุ่น (modulus of elasticity) และค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาด (% elongation at break) ที่สภาวะชื้นวัสดุชุ่มน้ำ เพื่อเป็นการจำลองสภาวะการใช้งานจริง โครงเลี้ยงเซลล์ที่นำไปใส่ในบริเวณของร่างกายต้องชุ่มน้ำ การทดลองสรุปค่าไว้ในตารางที่ 4.5 ปกติแล้วพอลิคาโพรแลกโตนมีสมบัติทางเชิงกลที่ดีแต่มีความไม่ชอบน้ำสูงดังนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเบส ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจส่งผลให้สมบัติทางเชิงกลของวัสดุเปลี่ยนไปขึ้นกับความเข้มข้นของเบสและระยะเวลา จากการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงให้เห็นว่าเมื่อแช่วัสดุในเบสแค่เพียง 4 ชั่วโมงส่งผลให้ความต้านทานต่อแรงดึงของวัสดุลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นวัสดุจะค่อยๆ มีค่าความต้านทานต่อแรงดึงน้อยลงตามระยะเวลาการแช่ในเบสที่นานขึ้น ในทำนองเดียวกันโมดูลัสสภาพยืดหยุ่นของวัสดุก็มีค่าน้อยลงเช่นกันหลังจากการแช่ในเบส 4 ชั่วโมงและลดลงอีกเมื่อใช้เวลาไฮโดรไลซ์ 6 ชั่วโมง แต่ที่ระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงกลับแสดงถึงการสูญเสียสมบัติทางเชิงกลไม่แตกต่างจากวัสดุที่แช่เบสเพียง 6 ชั่วโมง ส่วนเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาดของวัสดุก็มีค่าน้อยลงเช่นเดียวกันและมีค่าไม่แตกต่างกันที่ 6 และ 24 ชั่วโมง แต่เมื่อมีการเคลือบผิววัสดุด้วยเจลาตินเพียงแค่ 4% วัสดุมีความต้านทานต่อแรงดึงเพิ่มมากขึ้นและมีค่าเกือบใกล้เคียงกับโครงวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนที่ไม่ไฮโดรไลซ์ นอกจากนี้ยังมีค่าโมดูลัสยืดหยุ่นไม่แตกต่างกันกับโครงพอลิคาโพรแลกโตน และช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาดได้เทียบเท่ากับวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนที่แช่ในเบสเพียง 4 ชั่วโมง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนเมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเบสแล้วทำให้คุณสมบัติทางเชิงกลเสียไป เนื่องจากที่สภาวะดังกล่าวอาจไปทำลายพันธะเอสเทอร์จึงส่งผลให้โครงสร้างทางเคมีบางส่วนเสียไป ดังที่แสดงไว้ในภาพที่ 4.1 ดังนั้นสำหรับในขั้นตอนการขึ้นรูป จึงเลือกที่ระยะเวลาไฮโดรไลซิสโครงพอลิคาโพรแลกโตน 4 ชั่วโมงก่อนนำไปเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟต เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ช่วยเพิ่มคุณสมบัติความชอบน้ำได้ดีจากการทดลองก่อนหน้า แต่ไม่ทำให้เสียความแข็งแรงทางเชิงกลไปมาก นอกจากนี้เมื่อโครงวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนถูกเคลือบด้วยสารละลายเจลาตินแล้วทำให้ช่วยเพิ่มความแข็งแรงเชิงกลได้เพราะเจลาตินที่เคลือบอยู่บนผิวของพอลิคาโพรแลกโตนทำให้ชั้นวัสดุมีความหนาขึ้น และเจลาตินที่มีการเชื่อมพันธะแล้วทำให้โครงวัสดุเหนียวมีความแข็งแรงมากขึ้น

แม้ว่าการทดสอบจะแสดงค่าของวัสดุที่ไม่แข็งแรงนักเมื่อเทียบกับการทดสอบเจลลาตินที่มีรูปทรงของ Mohan [72] ซึ่งมีค่าความเค้นแรงกดที่ 0.251 เมกะปาสคาล ทั้งนี้เนื่องจากเจลลาตินแห้งจะมีความแข็งกระด้างมากกว่าเจลลาตินที่ชุ่มน้ำซึ่งมีความยืดหยุ่นมากกว่า วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่นำไปใช้งานควรมีความยืดหยุ่นดี และไม่ควรมีลักษณะที่แข็งกระด้าง อย่างไรก็ตามความแข็งแรงทางเชิงกลของวัสดุอาจถูกนำไปปรับปรุงเมื่อมีการทดสอบในสัตว์ เนื่องจากยังมีค่าน้อยกว่าที่ยอมดูลัสของกระดูกอ่อนซึ่งอยู่ในช่วง 0.45 - 0.80 MPa [8] อยู่พอสมควร

#### 4.3.4 ความสามารถในการดูดซับน้ำ

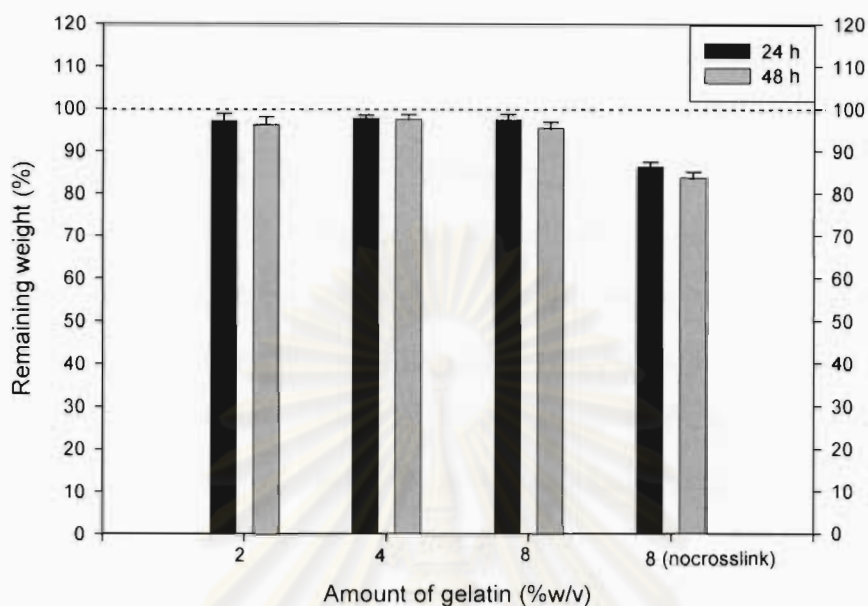
ความสามารถในการดูดซับน้ำซึ่งในที่นี้ใช้สารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนที่มีสารประกอบเจลลาตินความเข้มข้น 2%, 4%, 8% และ 8% ที่ไม่ผ่านการเชื่อมพันธะ ที่เคลือบอยู่บนผิวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แสดงดังภาพที่ 4.6 เจลาตินมีความเข้มข้นมากขึ้น สามารถดูดซับน้ำได้ดีขึ้นเพราะปริมาณเจลลาตินมากขึ้นทำให้วัสดุอุ่มน้ำได้ดี เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเจลลาตินที่มีความเข้มข้น 8% เท่ากันผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะกับไม่ผ่านการเชื่อมพันธะ แสดงให้เห็นว่าเจลลาตินที่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะแสดงค่าการดูดซับน้ำได้ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัดหรือแม้ความเข้มข้นของเจลลาตินจะน้อยกว่า แต่เมื่อผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะ กลับทำให้เจลลาตินที่มีความเข้มข้น 4% ดูดซับน้ำได้ดีกว่าเจลลาตินที่มีความเข้มข้น 8% ที่ไม่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะ ทั้งนี้เกิดจากโครงสร้างของเจลลาตินที่ไม่เชื่อมพันธะมีความไม่เสถียรทำให้โครงสร้างบางส่วนมีการละลายหรือหลุดออกมาจากชิ้นวัสดุ ทำให้น้ำไม่ถูกดูดซับไว้ ขณะที่กระบวนการเชื่อมพันธะทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเจลลาตินเกิดพันธะเอไมด์ซึ่งค่อนข้างแข็งแรง ส่งผลให้เจลลาตินมีสมบัติเหนียวแน่นแข็งแรงมากขึ้นและยืดหยุ่นดี เมื่อโมเลกุลน้ำผ่านเข้ามาในโครงสร้างของเจลลาติน จึงกักเก็บปริมาณน้ำไว้ได้มากขึ้น วัสดุนี้จึงดูดซับและอุ่มน้ำไว้ได้ดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของวัสดุไฮโดรเจลอย่างเจลลาตินและไฮยาลูโรนิก เมื่อวัสดุดูดซับน้ำ สภาพแวดล้อมภายในโครงเลี้ยงเซลล์จะเต็มไปด้วยน้ำซึ่งช่วยปกป้องเซลล์ที่อยู่ภายในและสิ่งที่เซลล์สร้างขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเอื้อต่อการขนส่งลำเลียงสารอาหารและขับของเสียออกจากเซลล์ [73]



ภาพที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาตินที่ความเข้มข้นของน้ำหนัkJเจลาตินในสารละลาย 2%, 4%, 8% ที่ผ่านการเชื่อมพันธะด้วย EDC และ เจลาติน 8% ที่ไม่ผ่านการเชื่อมพันธะ หลังจากแช่ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 5 ครั้งต่อตัวอย่าง  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

#### 4.3.5 การย่อยสลายของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์

การย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์เกิดขึ้นได้ด้วยทั้งทางกายภาพและทางเคมี การย่อยสลายทางกายภาพมักเกี่ยวข้องกับการละลายและปฏิกิริยาไฮโดรซิสซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของวัสดุ ขณะที่การย่อยสลายทางเคมีเน้นถึงการย่อยสลายพันธะด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ [74] ในการทดลองนี้ศึกษาถึงการละลายและการย่อยสลายด้วยน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนที่มีสารประกอบเจลาตินความเข้มข้น 2%, 4%, 8% และ 8% ที่ไม่ผ่านการเชื่อมพันธะ จากการแช่ในสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงในสภาวะที่มีแรงสั่นสะเทือนตลอดเวลา ซึ่งก็คืออยู่ในอ่างเขย่าที่ 70 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เหลืออยู่ของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาตินที่ความเข้มข้นของน้ำหนักเจลาตินในสารละลาย 2%, 4%, 8% ที่ผ่านการเชื่อมพันธะด้วย EDC และเจลาติน 8% ที่ไม่ผ่านการเชื่อมพันธะ ในสารละลาย PBS ในสถานะที่มีแรงเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 5 ครั้งต่อตัวอย่าง  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

จากกราฟแสดงค่าปริมาณน้ำหนักที่เหลืออยู่ของเจลาตินเปรียบเทียบกับน้ำหนักเจลาตินเริ่มต้นคิดเป็นร้อยละเปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำหนักของเจลาตินหายไปเพียงเล็กน้อยซึ่งแทบไม่แตกต่างจากวันแรกคือหลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีเจลาตินเพียงส่วนหนึ่งที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวจากน้ำหนักวัสดุทั้งหมด น้ำหนักที่เหลือส่วนใหญ่เป็นโครงพอลิคาโพรแลกโตน จึงอาจทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักได้ชัดเจนนัก ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Hariraksapita [75] ที่ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์รูพรุนด้วยพอลิเมอร์ผสมระหว่างเจลาตินและไฮยาลูโรแนนพบว่าน้ำหนักลดลงต่ำกว่า 80% ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ก็พบว่าคงเหลือปริมาณน้ำหนักไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุที่มีเจลาติน 8% เท่ากันที่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะกับไม่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะ จะเห็นว่าเจลาตินแบบไม่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะเริ่มมีน้ำหนักลดลงต่ำกว่า 90% เพราะโครงสร้างเจลที่ยังไม่เสถียรอาจ

หลุดละลายไปกับสารละลาย ส่งผลให้น้ำหนักลดลง ซึ่งต่างจากโครงสร้างเจลที่ผ่านการเชื่อมพันธะ ทำให้โครงสร้างมีลักษณะเชื่อมกันเป็นตาข่ายหนาแน่น ทำให้เป็นเจลที่แข็งแรง มีสมบัติอุ้มน้ำและไม่ละลายออกมา จากการทดลองนี้จึงยืนยันได้ว่าการแช่วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย EDC เป็นเวลา 30 นาที ทำให้โครงสร้างเจลาตินเกิดการเชื่อมพันธะเป็นตาข่าย

ในกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อต้องการให้วัสดุคงรูปอยู่ในเวลาที่เหมาะสมเพื่อเกื้อหนุนต่อการเจริญของเซลล์และสร้างขึ้นมาเป็นเนื้อเยื่อ ดังนั้นวัสดุที่ย่อยสลายได้ง่ายอย่างวัสดุพวกไฮโดรเจลจึงอาจเป็นวัสดุที่ไม่คงทนนานพอในการช่วยเกื้อหนุนกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อได้ กระบวนการเชื่อมพันธะจึงเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สำคัญของวัสดุประเภทไฮโดรเจล เพราะช่วยทำให้วัสดุคงอยู่ได้นานพอต่อการนำไปใช้งานจริง อย่างไรก็ตามการสร้างเนื้อเยื่อเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลา โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติมักเสีรูปร่างและย่อยสลายไปได้ง่ายกว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ [56] สำหรับวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้มีพอลิเมอร์จากธรรมชาติอย่างเจลาติน ไฮยาลูโรนิก และคอนไดรอิตินซัลเฟตอยู่ที่บริเวณพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อส่วนที่เป็นไฮโดรเจลย่อยสลายไปยังมีส่วนโครงที่เป็นพอลิคาโปรแลกโตนช่วยเกื้อหนุนเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่ต่อไปได้ จึงกล่าวได้ว่าวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ช่วยเกื้อหนุนเซลล์ได้นานพอสมควร

#### 4.4 การประเมินสมบัติทางชีวภาพ

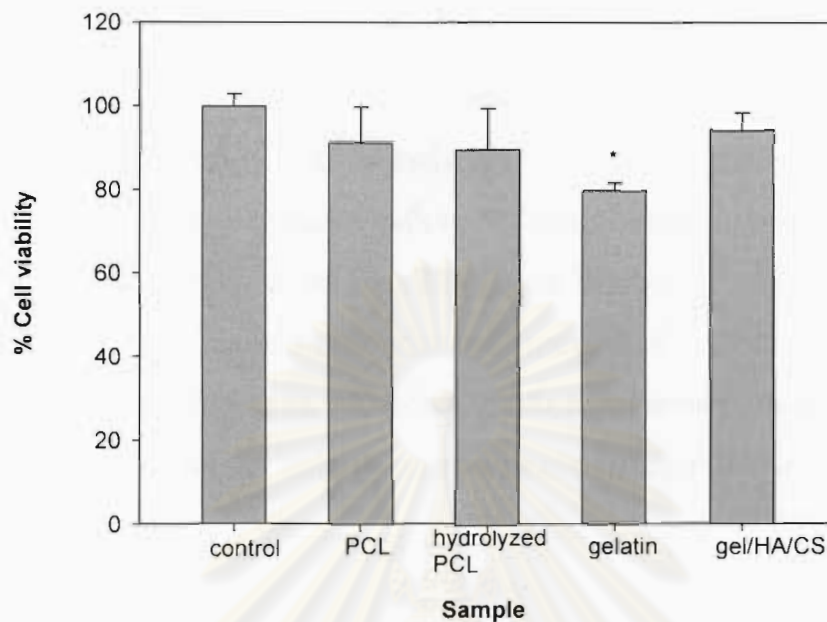
จากการตรวจสอบคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ก่อนหน้านี จึงได้มีการเลือกวัสดุที่จะนำมาประเมินสมบัติทางชีวภาพต่อไปด้วยเหตุผลที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ซึ่งมีวัสดุที่นำมาศึกษาครั้งนี้ โครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน 4% และพอลิคาโปรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน 4% ไฮยาลูโรน 0.1% คอนไดรอิตินซัลเฟต 1% เทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโปรแลกโตนธรรมดาและกลุ่มควบคุม (พื้นผิว TCPS\*)

\*TCPS = Tissue Culture Polystyrene



#### 4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษ

วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ จะต้องนำมาทดสอบความเป็นพิษของวัสดุเป็นอันดับแรกก่อนนำไปใช้งาน ในการทดลองนี้วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์รูปพรุนพอลิคาโพรแลกโตนที่ ถูกและไม่ถูกไฮโดรไลซ์ พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน 4% และพอลิคาโพรแลกโตน ที่เคลือบด้วยเจลาติน 4% ไฮยาลูโรแนน 0.1% คอนโดรอิตินซัลเฟต 1% ถูกนำมาประเมินความ เป็นพิษทางอ้อมด้วยเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงฟัน (DPSCs) จำนวนเริ่มต้น 40,000 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร การทดสอบความเป็นพิษทางอ้อมนี้ใช้มีเดียสกัดจาก ชั้นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ตัวอย่าง เป็นเวลา 7 วันมาเลี้ยง DPSCs เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay และวัดการดูดกลืนสีของสารละลายฟอร์มาซานในสารละลาย DMSO ที่ 570 นาโนเมตร ด้วยกระบวนการทางสเปกโตรสโกปีเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงเซลล์ด้วยมีเดียปราศจาก เซรัม ในระยะเวลาเท่ากัน ผลการทดสอบแสดงได้ดังภาพที่ 4.9 จำนวนเซลล์กลุ่มควบคุมที่ เลี้ยงในมีเดียปราศจากเซรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงคิดเป็น 100% ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยง ในมีเดียสกัดตัวอย่างพอลิคาโพรแลกโตน พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส และพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยวัสดุผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟต ( $p < 0.05$ ) ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในมีเดียสกัดพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาตินมีจำนวนน้อย กว่ากลุ่มควบคุมแต่ยังคงมีจำนวนเซลล์อยู่ที่ 80% จากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามวัสดุชนิดนี้จะ ถูกนำไปทดสอบความสามารถในการกีดกันเซลล์เป็นลำดับต่อไปเพื่อยืนยันความไม่เป็นพิษ ของวัสดุชนิดนี้ จากการทดสอบดังกล่าวสามารถประเมินได้เบื้องต้นว่าวัสดุกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ที่นำมาทดสอบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์



ภาพที่ 4.9 การทดสอบความเป็นพิษทางอ้อมของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงบนพอลิคาโพรแลกโตน (PCL) พอลิคาโพรแลกโตนหลังไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed PCL) พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน (gelatin) และเคลือบวัสดุผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟต (gel/HA/CS) โดยการประเมินจากจำนวนของ DPSCs ที่มีชีวิตอยู่เมื่อเลี้ยงในมีเดียที่แช่วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละตัวอย่าง \*เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้งต่อตัวอย่าง  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

#### 4.4.2 การเกาะและการเจริญของเซลล์

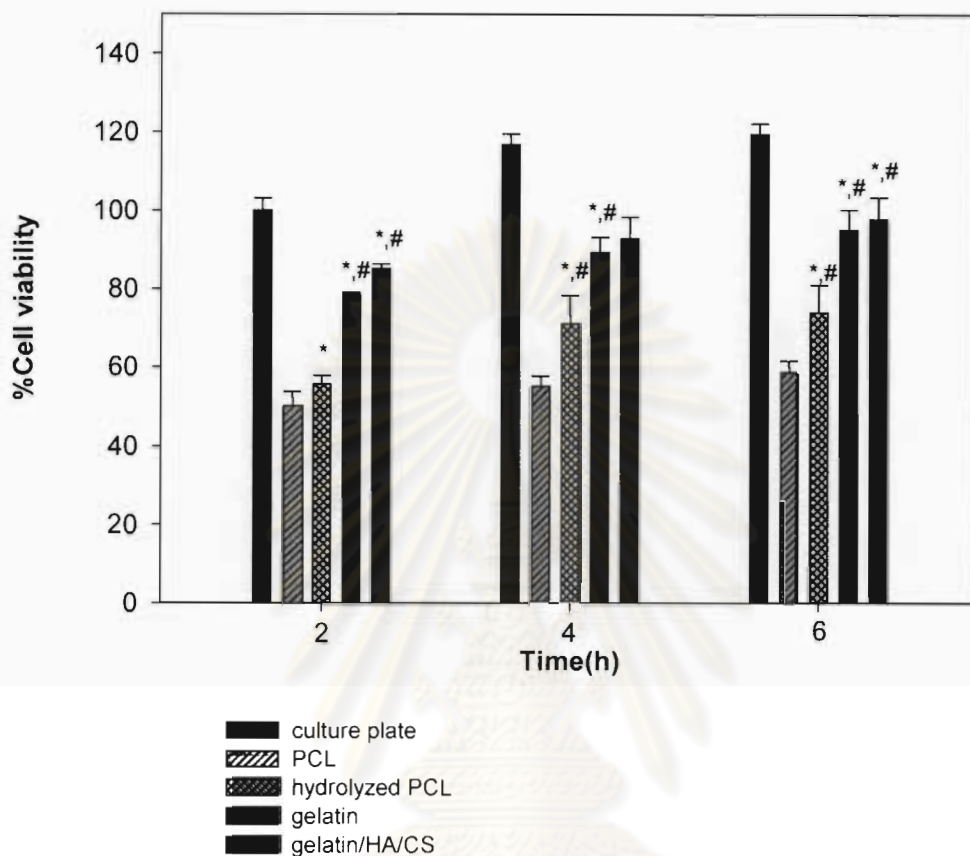
หลังจากวัสดุถูกทดสอบว่าไม่เป็นพิษแล้ว ประสิทธิภาพทางชีวภาพของวัสดุจึงได้มีการประเมินความสามารถให้เซลล์เกาะและเพิ่มจำนวนบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่คัดเลือกมา ซึ่งได้แก่พอลิคาโพรแลกโตนที่ถูกไฮโดรไลซ์ พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน 4% พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยวัสดุผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟต ด้วย DPSCs Gronthos และคณะ [76] กล่าวถึงเซลล์ชนิดนี้ว่า เป็นเซลล์ที่แบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้เร็ว มีศักยภาพในการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆได้ จากการทดลองของ Daniel และคณะพบคอลลาเจนชนิดที่สองหลังจากเลี้ยง DPSCs ในคอนโดรเจนมีเดียเป็นเวลาสามสัปดาห์ซึ่งเป็น

สภาวะที่เอื้ออำนวยให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนสภาพไปมีลักษณะเป็นเซลล์ของกระดูกอ่อน [77] การเกาะและการเจริญของ DPSCs บนพื้นผิววัสดุตรวจสอบด้วยวิธีการทางสเปกโตรสโกปี วัดค่าการดูดกลืนสีของ MTS assay หาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงปริมาณ DPSCs ที่มีชีวิตบนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตน พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส พอลิคาโพรแลกโตนที่เจลาติน 4% เคลือบอยู่และพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต โดยศึกษาการเกาะที่เวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เกาะบนพื้นผิว TCPS จำนวนเซลล์ที่เกาะบน TCPS เป็นเวลา 2 ชั่วโมงคิดเป็น 100% วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่มีรูพรุนมีเซลล์เกาะบนพื้นผิวเริ่มต้นที่ 2 ชั่วโมงเพียง 50% ของกลุ่มควบคุม และเมื่อเวลาผ่านไปถึง 6 ชั่วโมงจำนวนเซลล์ยังคงไม่แตกต่างจากเวลาเริ่มต้น ( $p < 0.05$ ) ขณะเดียวกันวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบสก็มีปริมาณเซลล์ที่ชั่วโมงเริ่มต้นไม่แตกต่างจากโครงเลี้ยงพอลิคาโพรแลกโตนธรรมดา แต่พบจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นที่เวลา 4 ชั่วโมง ส่วนวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน และโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตมีจำนวนเซลล์ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ถึง 78% และ 85% ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไปถึง 6 ชั่วโมงพบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตบนโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวถึง 95% และ 98% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่วัสดุชีวภาพอย่างเจลาตินแม้เพียง 4% ลงไปที่พื้นผิวช่วยให้เซลล์มาเกาะบนพื้นผิวมากขึ้นกว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุพอลิเมอร์สังเคราะห์พอลิคาโพรแลกโตนธรรมดา เนื่องจากสมบัติทางเคมีของพื้นผิวที่ชอบน้ำและสมบัติการอุ้มน้ำของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ ช่วยให้เซลล์มาเกาะได้ง่ายขึ้นจึงถือได้ว่าวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์นี้มีการส่งเสริมเซลล์

จำนวนเซลล์ที่เกาะบนวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมถึงสองเท่า ทั้งนี้เนื่องจากพอลิคาโพรแลกโตนมีความไม่ชอบน้ำเมื่อเทียบกับ TCPS แต่เมื่อเคลือบพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตนด้วยวัสดุธรรมชาติอย่างเจลาติน ไฮยาลูโรแนนและคอนไดรอิตินซัลเฟต ทำให้มีเซลล์มาเกาะจำนวนมากขึ้น เพราะพื้นผิววัสดุที่ชอบน้ำช่วยให้เซลล์เกาะได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ที่เกาะยังคงน้อยกว่ากลุ่มควบคุม เพราะพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะที่ไม่เรียบ ทำให้เซลล์เกาะได้ยากกว่าวัสดุที่เรียบกว่าและมีความชอบน้ำอย่าง TCPS

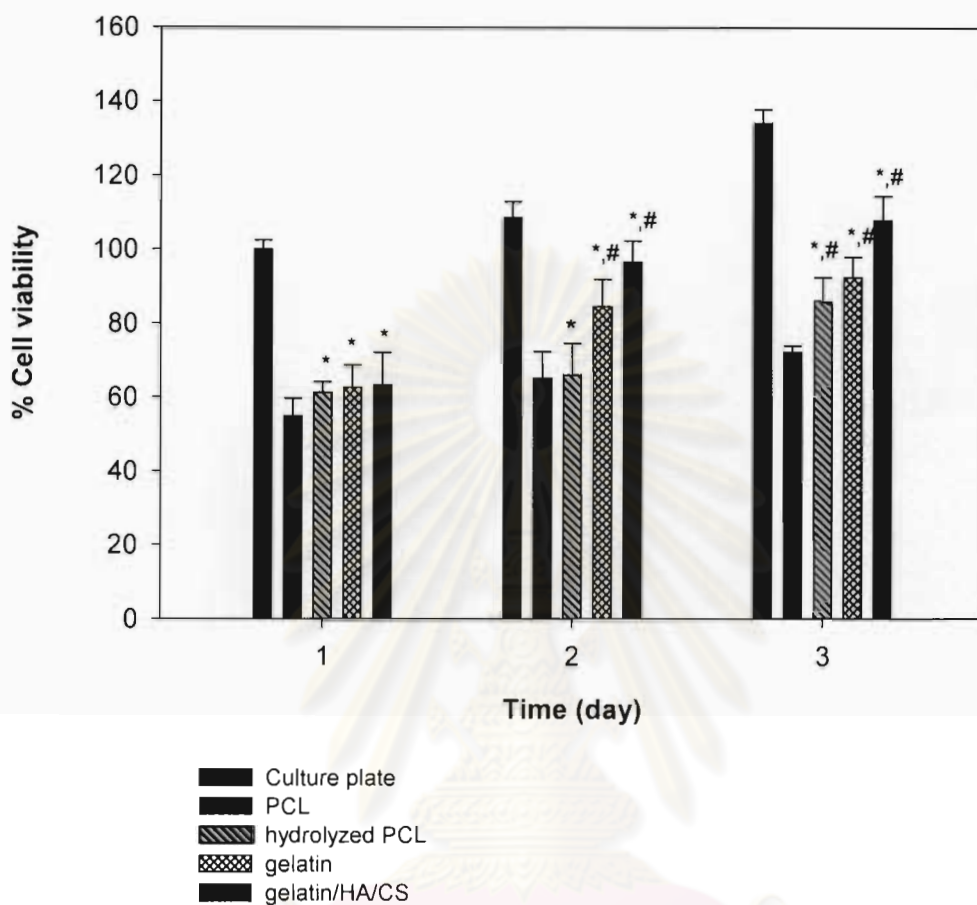
หลังจากเซลล์มีที่ยึดเกาะแล้ว เซลล์จะเริ่มแผ่ขยายจำนวนและสังเคราะห์โปรตีนต่าง ๆ ออกมาซึ่งจะช่วยเร่งกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อ ภาพที่ 4.11 แสดงปริมาณ DPSCs ที่เพิ่มขึ้นบนพื้นผิวของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตน พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ พอลิคาโพรแลกโตนที่เจลาตินเคลือบอยู่ และพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟต เมื่อเวลาผ่านไป 1, 2 และ 3 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เจริญบน TCPS (กลุ่มควบคุม) โดยให้เซลล์ที่เจริญบน TCPS เป็นเวลา 1 วันคิดเป็น 100% พบว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดหลังจาก 24 ชั่วโมง ในจำนวนที่ไม่แตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) โดยอยู่ที่ประมาณ 60% จำนวนเซลล์ที่อยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนวันที่ 2 และ 3 เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากวันแรก และมีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนค่อนข้างน้อย ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส การเจริญของเซลล์ในวันที่ 2 ไม่แตกต่างจากวันแรก แต่เพิ่มขึ้นมาเป็น 86% ในวันที่ 3 ขณะที่เซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาติน และโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟตมีจำนวนเพิ่มขึ้นถึง 92% และ 108% ตามลำดับ ทั้งนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีการใส่ไฮยาลูโรแนนในปริมาณเพียงเล็กน้อย (ไม่เกิน 0.1%) ช่วยสนับสนุนการเกาะ การเคลื่อนที่และการเจริญของเซลล์ดังที่ Liu และคณะ [48] เคยศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ นั้นแสดงว่าการใส่วัสดุพอลิเมอร์ธรรมชาติอย่างเจลาติน ไฮยาลูโรแนน และคอนโดรอิตินซัลเฟตนั้น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในการกักหนุให้เซลล์เกาะและแผ่ขยายจำนวนซึ่งส่งผลต่อพัฒนาการขั้นต่อไปของเซลล์

การเริ่มต้นแผ่ขยายจำนวนของเซลล์บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างต่าง ๆ ยังคงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับการเกาะ ทั้งนี้สืบเนื่องจากการเกาะของเซลล์บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างช้ากว่ากลุ่มควบคุม ทำให้การเจริญเป็นไปได้ช้ากว่า จึงสังเกตเห็นจำนวนเซลล์จากการทดลองน้อยกว่า อย่างไรก็ตามเซลล์ยังคงเพิ่มจำนวนเมื่อระยะเวลาผ่านไปจากนั้นเซลล์จะไม่สามารถเจริญต่อไปบนพื้นผิวแบนราบ TCPS ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมได้ ซึ่งต่างจากโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติมีรูพรุนที่มีขนาดพื้นผิวมากกว่า เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากจึงมีที่ยึดเกาะ เซลล์บางส่วนสามารถแทรกตัวเข้าไปอาศัยอยู่ตามรูของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ โครงสามมิติมีรูพรุนจึงเหมาะที่จะเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ต่อไปในระยะยาว



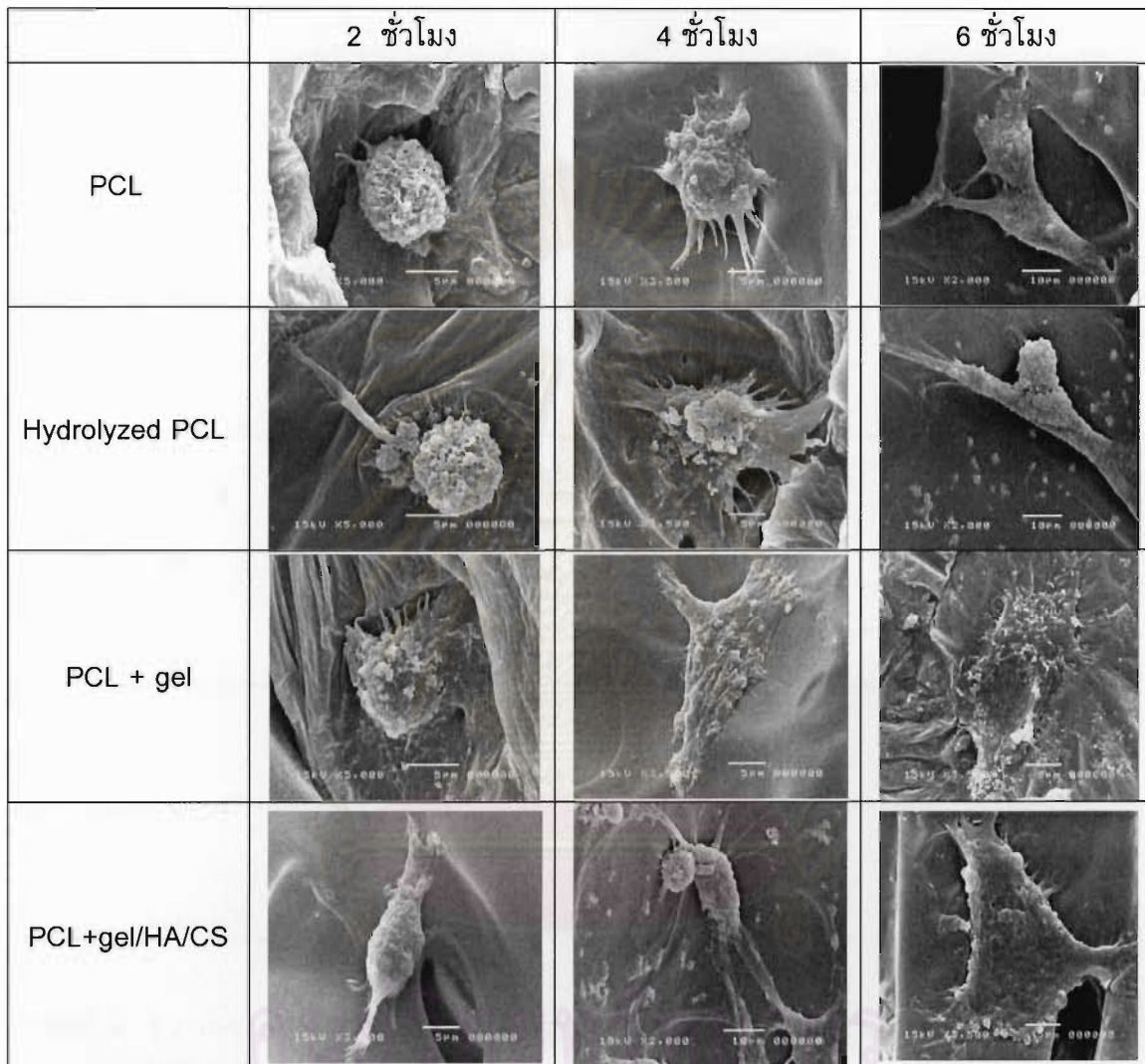
ภาพที่ 4.10 การเกาะของ DPSCs ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงและวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงพอลิคาโพรแลกโตน (PCL) พอลิคาโพรแลกโตนหลังไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed PCL) พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน (gelatin) และเคลือบวัสดุผสมเจลาติน 4%/ไฮยาลูโรแนน 0.1%/คอนไดรอิตินซัลเฟต 1% (gel/HA/CS) เป็นเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง

\*เปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม #เปรียบเทียบพอลิคาโพรแลกโตน ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 5 ครั้งต่อตัวอย่าง  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

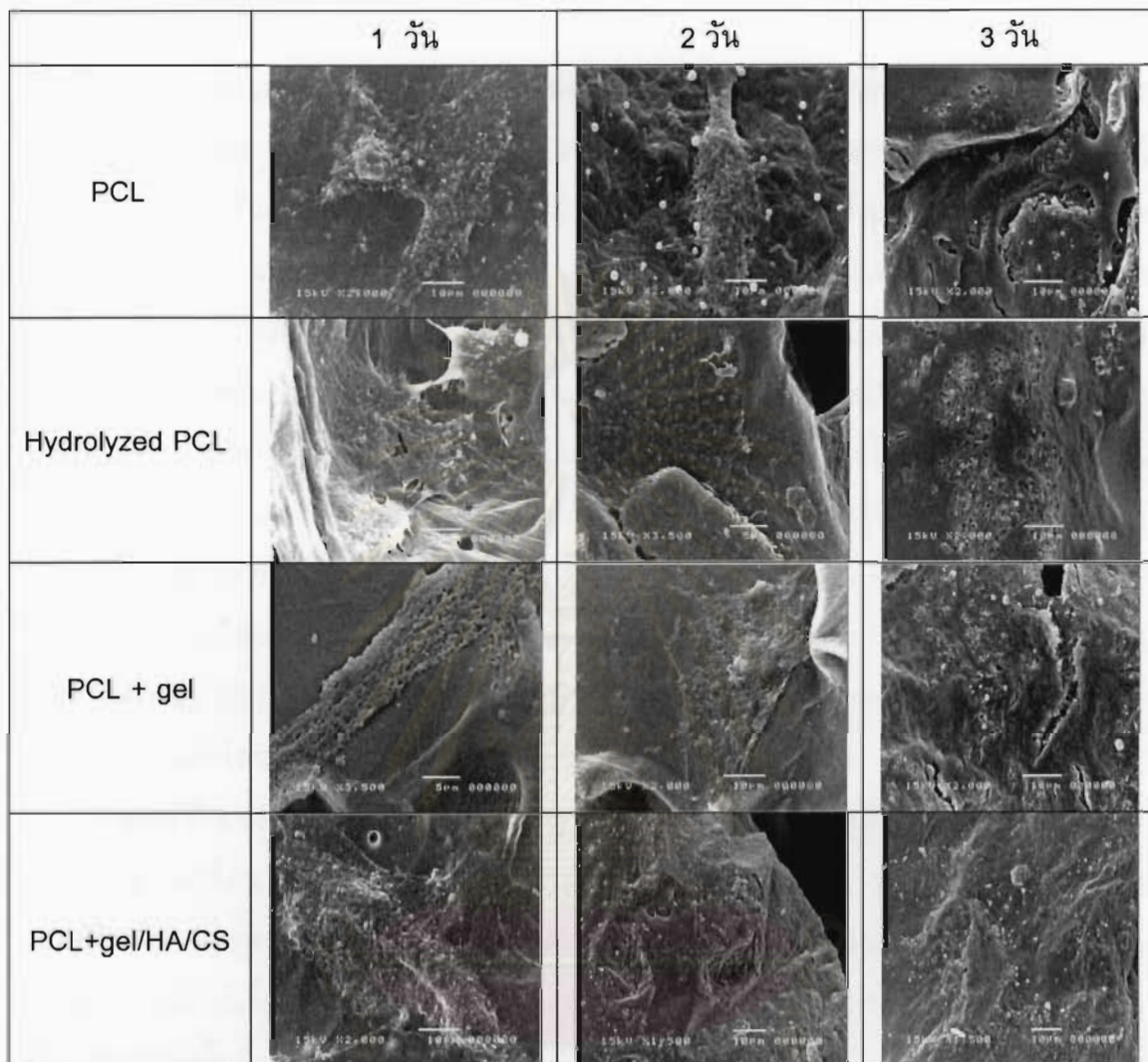


ภาพที่ 4.11 การเจริญของ DPSCs ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงและวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงพอลิคาโพรแลกโตน (PCL) พอลิคาโพรแลกโตนหลังไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed PCL) พอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน (gelatin) และเคลือบวัสดุผสมเจลาติน 4%/ไฮยาลูโรแนน 0.1%/คอนไดรอิตินซัลเฟต 1% (gel/HA/CS) เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน \*เปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม # เปรียบเทียบกับพอลิคาโพรแลกโตน ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ ; one-way ANOVA (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 5 ครั้งต่อตัวอย่าง  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

#### 4.4.3 การศึกษารูปร่างของเซลล์บนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์



ภาพที่ 4.12 ภาพจาก SEM แสดงลักษณะการเกาะของ DPSCs บนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ พอลิคาโพรแลกโตน (PCL) พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส (Hydrolyzed PCL) พอลิคาโพรแลกโตนที่เจลาติน 4% เคลือบอยู่ (PCL + gel) และพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน 4%/ไฮยาลูโรแนน 0.1%/คอนไดรตินซัลเฟต 1% (PCL+gel/HA/CS) ที่มีรูพรุนในระยะเวลาการหว่านเซลล์ 2, 4 และ 6 ชั่วโมง โดยใช้กำลังขยาย 2,000, 3,500 และ 5,000 เท่า ที่สเกลของภาพ 5 และ 10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.13 ภาพจาก SEM แสดงลักษณะการเจริญของ DPSCs บนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ พอลิคาโพรแลกโตน (PCL) พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส (Hydrolyzed PCL) พอลิคาโพรแลกโตนที่เจลาติน 4% เคลือบอยู่ (PCL + gel) และพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน 4%/ไฮยาลูโรแนน 0.1%/คอนโดรอิตินซัลเฟต 1% (PCL+gel/HA/CS) ที่มีรูพรุน ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2 และ 3 วันโดยใช้กำลังขยาย 1,500, 2,000 และ 3,500 เท่า ที่สเกลของภาพ 5 และ 10 ไมโครเมตร



เซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเนื้อเยื่อได้นั้นต้องมีขั้นตอนการหาบริเวณยึดเกาะเป็นอันดับแรก เพื่อจะแผ่ขยายและเพิ่มจำนวนไปบนบริเวณนั้น ภาพที่ 4.12 ศึกษาลักษณะการเกาะของเซลล์บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตน พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส พอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน 4% เคลือบอยู่ และพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิติตินซัลเฟตโดยติดตามที่ระยะเวลาหลังจากหว่านเซลล์ลงไปแล้ว 2, 4 และ 6 ชั่วโมงจากภาพถ่าย SEM จะเห็นว่า DPSCs ที่ระยะเวลาการหว่าน 2 ชั่วโมงเริ่มเกาะบนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ ในรูปร่างทรงกลม เซลล์เริ่มยื่นแผ่ส่วนที่เป็นไซโตพลาสซึมออกมา รูปร่างเรียวยาวขึ้นมากกว่าเป็นทรงกลมเมื่อผ่านไป 4 และ 6 ชั่วโมง โดยเฉพาะเซลล์ที่เกาะบนพื้นผิวที่มีเจลาตินและพื้นผิววัสดุผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิติตินซัลเฟต เซลล์แสดงลักษณะที่แบนราบไปกับพื้นผิววัสดุที่เวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ชอบเกาะบนพื้นผิววัสดุที่มีเจลาตินและพื้นผิววัสดุผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิติตินซัลเฟตมากกว่าการเกาะลงบนพื้นผิววัสดุพอลิคาโพรแลกโตน จากการศึกษาของ Tan และคณะ [54] พบเซลล์คอนโตริไซด์มีลักษณะเรียวยาวเช่นกัน กระจายไปตามโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/โคโคซาน/ไฮยาลูโรแนนที่มีรูพรุน

ภาพที่ 4.13 ศึกษาลักษณะการเจริญของเซลล์บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตน พอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส พอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน 4% และพอลิคาโพรแลกโตนที่เคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิติตินซัลเฟต หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ 1, 2, และ 3 วัน จะสังเกตเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน DPSCs เริ่มแผ่ราบบนพื้นผิววัสดุมากขึ้น เซลล์เริ่มแผ่เป็นบริเวณกว้างมากขึ้นในวันที่สองและวันที่สาม นอกจากนี้เซลล์ยังแผ่ราบมากขึ้นและเกือบจะเป็นเนื้อเดียวกับวัสดุที่มีเจลาติน ไฮยาลูโรแนน คอนโตรอิติตินซัลเฟต จึงเป็นการยืนยันเบื้องต้นได้ว่า DPSCs สามารถเจริญได้ดีบนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ตัวอย่าง โดยเฉพาะบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีวัสดุผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโตรอิติตินซัลเฟต ทั้งนี้การเจริญของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนต้องอาศัยระยะเวลาให้เซลล์แทรกเข้าไปอาศัยและเจริญตามรูของโครงเลี้ยง



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้ได้พัฒนาวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ด้วยการขึ้นรูปพอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนด้วยเทคนิคการเหี่ยวตัวทำละลายและละลายอนุภาคของเกลือภายในวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนออก วัสดุถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเบสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มสมบัติความชอบน้ำและเคลือบพื้นผิวโครงพอลิคาโพรแลกโตนด้วยวัสดุชีวภาพผสมเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตโดยการจุ่มขึ้นวัสดุพอลิคาโพรแลกโตนที่มีรูพรุนลงในสารละลายเจลาติน 4% ไฮยาลูโรแนน 0.1% คอนไดรอิตินซัลเฟต 1% วัสดุดังกล่าวถูกนำไปผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะด้วย EDC ก่อนนำไปแช่แข็งและทำให้แห้ง การตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีสามารถยืนยันการการเคลือบเกาะของเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตบนผิวพอลิคาโพรแลกโตน โครงสร้างสามมิติมีรูพรุนตรวจสอบได้จาก SEM วัดขนาดรูของโครงพอลิคาโพรแลกโตนได้ 270 – 370 ไมครอน หรือ 59,373 - 91,274 ตารางไมครอน หลังจากเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต มีขนาดของรูเท่ากับ 265 – 350 ไมครอน หรือ 29,145 – 51,390 ตารางไมครอน จากการวัดมุมสัมผัสของน้ำแสดงให้เห็นว่าได้ว่าพื้นผิววัสดุที่มีเจลาตินและไฮยาลูโรแนนช่วยให้พื้นผิววัสดุชอบน้ำมากขึ้นและวัสดุที่มีปริมาณเจลาตินมากสามารถดูดซับน้ำได้ดี ขณะที่วัสดุที่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะโครงวัสดุมีความเสถียรจึงอมน้ำไว้ได้ดีกว่าและมีอัตราการย่อยสลายช้ากว่าวัสดุที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะ

วัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ถูกนำไปประเมินสมบัติทางชีวภาพด้วย dental pulp stem cells การทดสอบความเป็นพิษทางอ้อมพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนเปล่าพอลิคาโพรแลกโตนที่ผ่านการแช่เบสและพอลิคาโพรแลกโตนที่มีเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตเคลือบอยู่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ จำนวนเซลล์ที่เกาะและบนพื้นผิววัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียม ณ เวลาต่าง ๆ น้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่เกาะบนพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละประเภทที่เตรียมพบว่าเซลล์เกาะบนโครงที่เลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาตินและโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์อื่น เช่นเดียวกับการเจริญของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์เจริญบนพื้นผิวที่มีเจลาตินหรือเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตได้ดีกว่า จากภาพของ SEM

แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป เซลล์เริ่มเกาะและมีรูปร่างกลมเมื่อเวลาผ่านไปสองชั่วโมง จากนั้นเซลล์เริ่มแผ่ระนาบบนพื้นผิวซึ่งสังเกตได้ชัดเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน และเซลล์มีแผ่ขยายไปบนพื้นผิวเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน จึงแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลกโตนสามมิติที่มีรูพรุนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟตเป็นวัสดุทางเลือกใหม่สำหรับการพัฒนาและนำมาใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต สำหรับกระบวนการขึ้นรูปและตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของวัสดุ ควรมีการปรับอัตราส่วนปริมาณของสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนั้นตัวอย่างที่ควรเพิ่มเข้ามาเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ได้แก่ โครงพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาตินความเข้มข้นต่าง ๆ โครงพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาตินและไฮยาลูโรแนน หรือโครงพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาตินและคอนไดรอิตินซัลเฟต เปรียบเทียบกับโครงพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนไดรอิตินซัลเฟต ซึ่งอาจเป็นความเข้มข้นของสารละลายเดิมหรือปรับเปลี่ยนใหม่ตามความเหมาะสม ในขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติของวัสดุอาจเพิ่มการตรวจสอบปริมาณของสารละลายเจลาตินที่เกาะบนโครงพอลิคาโพรแลกโตน เช่น TGA สำหรับการศึกษาที่มีอยู่แล้วอย่างการทดสอบความชอบน้ำ สมบัติเชิงกลความสามารถในการดูดซับน้ำและการย่อยสลายของวัสดุ ควรเพิ่มตัวอย่างการศึกษาตามที่ระบุไว้และอาจมีการเพิ่มตัวอย่างเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะด้วย ในส่วนของการดูดซับน้ำและการย่อยสลายของวัสดุอาจมีการเพิ่มระยะเวลาการศึกษาเพื่อยืนยันศักยภาพของกระบวนการเชื่อมพันธะ ในส่วนของการประเมินผลทางชีวภาพก็เช่นเดียวกัน การติดตามการเกาะและการเจริญของเซลล์ควรเพิ่มตัวอย่างศึกษาดูตามที่กล่าวไว้ข้างต้น

นอกจากงานเตรียมวัสดุแล้ว เมื่อได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่คัดเลือกแล้วว่าน่าพึงพอใจ ในส่วนของการทดสอบเซลล์อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลระยะยาวของการใช้วัสดุนี้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์โดยการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงเซลล์เซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเหมือนกระดูกอ่อน ตลอดจนพัฒนาและศึกษาประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อการเกาะบนเซลล์และการพัฒนาเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อ นอกจากนี้อาจปรับปรุงวัสดุที่เคลือบผิววัสดุให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานเพื่อนำไปใช้งานกับเซลล์และเนื้อเยื่อชนิดอื่นเช่นกระดูกเป็นต้น



## รายการอ้างอิง

- [1] Millett, P.J., Haffard, B.H., Horan, M.P., Hawkins, R.J., and Steadman, R.J. Outcomes of Full-Thickness Articular Cartilage Injuries of the Shoulder Treated With Microfracture. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery 25 (2009): 856-863.
- [2] Kordás, G., Szabó, J.S., and Hangody, L. Primary Stability of Osteochondral Grafts Used in Mosaicplasty. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery 22 (2006): 414-421.
- [3] Baums, M.H. et al. Autologous Chondrocyte Transplantation for Treating Cartilage Defects of the Talus. The Journal of Bone and Joint Surgery (American) 88 (2006): 303-308.
- [4] Davidson, P.A., and Carter, T.R. Osteochondral Allograft Transplantation. Operative Techniques in Sports Medicine 15 (2007): 53-61.
- [5] Mitchell, N., and Shepard, N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. The Journal of Bone and Joint Surgery (American) 58 (1976): 230-233.
- [6] Gilbert, J.E. Current treatment options for the restoration of articular cartilage. American Journal of Knee Surgery 11 (1998): 42-6.
- [7] Julian, H.G., Milo, M.S., and Molly, M.S. Nanofibrous materials for tissue engineering. UK Society for Biomaterials [ePoster]. 2006. Available from: <http://www.centropede.com/UKSB200> [2011, April]
- [8] Athanasiou, K.A. et al. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. Journal of Orthopaedic Research 9 (1991): 330-340.
- [9] Mow, V.C., Flatow, E.L., and G. Ateshian, A. Biomechanics, In: Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System, edited by

- J.A. Buckwalter, T.A. Einhorn, and S.R. Simon. American Academy of Orthopaedic Surgeons 142 (2000): 140–142.
- [10] Hodge, W.A. et al. Contact pressures from an instrumented hip endoprosthesis. Journal of Bone and Joint Surgery 71 (1989): 1378–1386.
- [11] Marlovits, S. et al. Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint. Techniques and results. Radiology 44 (2004): 763-72.
- [12] Park, H., Temenoff, J.S., Tabata, Y., Caplan, A.I., and Mikos, A.G. Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. Biomaterial 28 (2007): 3217-3227.
- [13] Chung, C., and Burdick, J.A. Engineering cartilage tissue. Advanced Drug Delivery Reviews 60 (2008): 243-62.
- [14] Zhu, Y., Gao, C., Liu, X., and Shen, J. Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells. Biomacromolecules 3 (2002): 1312-1319.
- [15] Gong, Y., Zhu, Y., Liu, Y., Ma, Z., Gao, C., and Shen, J. Layer-by-layer assembly of chondroitin sulfate and collagen on aminolyzed poly (L-lactic acid) porous scaffolds to enhance their chondrogenesis. Acta Biomaterialia 3 (2007): 677-785.
- [16] Lin, Y. et al. Surface modification of poly(L-lactic acid) to improve its cytocompatibility via assembly of polyelectrolytes and gelatin. Acta Biomaterialia 2 (2006): 155-164.
- [17] Tan, P.S., and Teoh, S.H. Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation. Materials Science and Engineering: C 27 (2007): 304-308.

- [18] Pen̄a, J. et al. Alkaline-treated poly(epsilon-caprolactone) films: Degradation in the presence or absence of fibroblasts. Journal of Biomedical Materials Research Part A 76 (2006): 788-97.
- [19] Tsuji, H., Suzuyoshi, K., Tezuka Y., and Ishida, T. Environmental Degradation of Biodegradable Polyesters: 3. Effects of Alkali Treatment on Biodegradation of Poly(ε-Caprolactone) and Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate) Films in Controlled Soil. Journal of Polymer and the Environment 11 (2003): 57-65.
- [20] Kang, H., Tabata, Y., and Ikada, Y., Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 20 (1999): 1339-1344.
- [21] Lien, S., Ko, L., and Huang, T. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. Acta Biomaterialia 5 (2009): 670-679.
- [22] Chen, P., Kang, P., Su, W., Lin, F., and Chena, M., The evaluation of thermal properties and in vitro of carbodiimide or glutaraldehyde cross-linked gelatin for pc 12 cells culture. Biomedical Engineering - Application, Basis & Communications 17 (2005): 44-49.
- [23] Freed, L.E., Grande, D.A., Lingbin, Z., Emmanuel, J., Marquis, J.C., and Langer, R., Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. Journal of biomedical materials research 28 (1994): 891-9.
- [24] Lee, J.B., Lee, S.H., Yu, S.M., Park, J., Choiand, J.B., and Kim, J.K. PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration. Surface and Coatings Technology 202 (2008): 5757-5761.
- [25] SHIN, H.J. et al. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction : mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. Journal of biomaterials science 17 (2006): 103-119.
- [26] Giurea, A. et al. Adhesion of perichondrial cells to a polylactic acid scaffold. Journal of Orthopedic Research 21 (2003): 584-9.

- [27] Liu, Y. et al. Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. Tissue Engineering 8 (2002): 709-721.
- [28] Mouw, J., Case, N., Guldberg, R., Plaas, A., and Levenston, M. Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. Osteoarthritis Cartilage 13 (2005): 828-36.
- [29] Pamuła, E., Dobrzyński, P., Bero, M., and Paluszkiewicz, C. Hydrolytic degradation of porous scaffolds for tissue engineering from terpolymer of L-lactide,  $\epsilon$ -caprolactone and glycolide. Journal of Molecular Structure 744-747 (2005): 557-562.
- [30] You, Y., Lee, S.W., Youk, J.H., Min, B., Lee, S.J., and Park, W.H. In vitro degradation behaviour of non-porous ultra-fine poly(glycolic acid)/poly(L-lactic acid) fibres and porous ultra-fine poly(glycolic acid) fibres. Polymer Degradation and Stability 90 (2005): 441-448.
- [31] Moran, J.M., Pazzano, D. and Bonassar, L. J. Characterization of polylactic acid–polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. Tissue Engineering 9 (2003): 63-70.
- [32] Lee, N.K., Oh, H.J., Hong, C.M., Suh, S., and Hong, S.H. Comparison of the synthetic biodegradable polymers, polylactide (PLA), and polylactic-co-glycolic acid (PLGA) as scaffolds for artificial cartilage. Biotechnology and Bioprocess Engineering 14 (2009): 180-186.
- [33] Uematsu, K. et al. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. Biomaterials 26 (2005): 4273-4279.
- [34] Rücker, M. et al. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. Biomaterials 27 (2006): 5027-5038.
- [35] Ahmad, R., Sylvester, J., and Zafarullah, M. MyD88, IRAK1 and TRAF6 knockdown in human chondrocytes inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-

- 13 gene expression and promoter activity by impairing MAP kinase activation. Cellular Signalling 19 (2007): 2549-2557.
- [36] Wu, M., Urban, J.P.G., Cui, Z. F., Cui, Z., and Xu, X. Effect of extracellular pH on matrix synthesis by chondrocytes in 3D agarose gel. Biotechnology Progress 23 (2008): 430-434.
- [37] Wikimedia foundation, Inc. Polycaprolactone. Wikipedia, the free encyclopedia [online] 2011. Available from: <http://en.wikipedia.org> [2011, April]
- [38] Bezwada, R. et al., Monocryl suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture Biomaterials 16 (1995): 1141-8.
- [39] Izquierdo, R. et al. Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part A 85 (2007): 25 – 35.
- [40] Li, W., Danielson, K.G., Alexander, P.G. and Tuan, R.S. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research Part A 67 (2003): 1105 – 1114.
- [41] Li, W. et al., A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. Biomaterials 26 (2005): 599-609.
- [42] Garcia-Giralt, N. et al. A porous PCL scaffold promotes the human chondrocytes redifferentiation and hyaline-specific extracellular matrix protein synthesis. Journal of Biomedical Materials Research Part A 85 (2008): 1082-9.
- [43] Chang, C.H., Liu, H.C., Lin, C.C., Chou, C.H., and Lin, F.H. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. Biomaterials 24 (2003): 4853-4858.
- [44] Tabata, Y., and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices. Advanced Drug Delivery Review 31 (1998): 287-301.



- [45] Chaplin, M. Water structure and science. Creative commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 2.0 UK: England & Wales [online]. 2009. Available from: <http://www.btinternet.com/~martin.chaplin/hygel.html>.
- [46] Yoo, H.S., Lee, E.A., Yoon, J.J., and Park, T.G. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. Biomaterials 26 (2005): 1925–1933.
- [47] Radice, M., Brun, P., Cortivo, R., Scapinelli, R., Battaliard, C., and Abatangelo, G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. Journal of Biomedical Materials Research Part A 50 (2000): 101 – 109.
- [48] Liua, H., Yina, Y., Yaoa, K., Mab, D., Cuib, L., and Cao, Y. Influence of the concentrations of hyaluronic acid on the properties and biocompatibility of Cs–Gel–HA membranes. Biomaterials 25 (2004): 3523–3530.
- [49] Moreland, L.W. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. Arthritis Research and Therapy 5 (2003): 54-67.
- [50] Suh, J.-K. F., and Matthew, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials 21 (2000): 2589-2598.
- [51] Lein, S., Li, W., and Huang, T. Genipin-crosslinked gelatin scaffolds or articular cartilage tissue engineering with novel crosslinking method. Material Science and Engineering C 28 (2008): 36-43.
- [52] Fan, H. et al. Porous gelatin–chondroitin–hyaluronate tri-copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF- $\beta$ 1 induces differentiation of mesenchymal stem cells *in vivo* for enhancing cartilage repair. Journal of Biomedical Materials Research Part A 77 (2006): 785-794.

- [53] Lee, J.E. Evaluation of chondrogenesis in collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffolds for cartilage tissue engineering. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2 (2005): 41 -49.
- [54] Tan, H., Gong, Y., Lao, L., Mao, Z., and Gao, C. Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials Medicine 18 (2007): 1961–1968.
- [55] Ko, C., Huang, J., Huang, C., and Chu, IM. Type II collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering. Journal of Bioscience and Bioengineering 107 (2009): 177–182.
- [56] Sato, T., Chen, G., Ushida, T., Ishii, T., Ochiai, N., and Tateishi, T. Tissue-engineered cartilage by in vivo culturing of chondrocytes in PLGA-collagen hybrid sponge. Materials Science and Engineering 27 (2001): 83-89.
- [57] Sato, T. Evaluation of PLLA–collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue. Materials Science and Engineering (24) 2004: 365–372.
- [58] Sha'ban, M., Kim, S.H., Idrus, BH.R., and Khang, G. Fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold promotes early chondrogenesis of articular chondrocytes: an in vitro study. Journal of Orthopaedic Surgery and Research 3 (2008): 17.
- [59] French, M.M., Rose, S., Canseco, J., and Athanasiou, K.A. Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts. Annals of Biomedical Engineering 32 (2004): 50-56.
- [60] Lee, K. Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts. Human Gene Therapy 12 (2001): 1805-13.
- [61] Caplan, A.I., and Bruder, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century Trends in Molecular Medicine 7 (2001): 259– 264.

- [62] Pittenger, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 84 (1999): 143– 147.
- [63] Hou, Q., Grijpma, D.W., and Feijen, J. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. Biomaterials 24 (2003): 1937-1947.
- [64] Pavasant, P., Yongchaitrakul, T., Pattamapun, K., and Arksornnukit, M. The synergistic effect of TGF-beta and 1, 25-dihydroxyvitamin D(3) on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts. Archives of Oral Biology 48 (2003): 717-22.
- [65] Alves da Silva, M.L. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: Assessment of extracellular matrix formation. Acta Biomaterialia 6 (2010): 1149-1157.
- [66] Park, S., Park, J., Kim, H., Song, M.J., and Suh, H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. Biomaterials 23 (2002): 1205-1212.
- [67] Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Mayers RA, editor.
- [68] Sannino, A., Pappada, S., Madaghiale, M., Maffezzoli, A., Ambrosio, L., and Nicolais, L. Crosslinking of cellulose derivatives and hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. Cellular Polymers 46 (2005): 11206.
- [69] Wan, Y., Yang, J., Bei, J., and Wang, S. Cell adhesion on gaseous plasma modified poly(L-lactide) surface under shear stress field. Biomaterials 24 (2003): 3757-3764.
- [70] Suh, H., Hwang, Y.S., Lee, J.E., Han, C.D., and Park, J.C. Behavior of osteoblasts on type I atelocollagen grafted ozone oxidized poly(L- lactic acid) membrane. Biomaterials 22 (2001): 219-230.

- [71] Griffon, D.J., Sedighi, M.R., Schaeffer, D.V., Eurell, J.A., and Johnson, A.L. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. Acta Biomaterialia 2 (2006): 313-320.
- [72] Mohan, N., Nair, P. D., and Tabata, Y. A 3D biodegradable protein based matrix for cartilage tissue engineering and stem cell differentiation to cartilage. Journal of materials science 20 (2007): 49-60.
- [73] Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. Advance Drug Delivery Reviews 43 (2002): 3.
- [74] Drury, J.L., and Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Biomaterials 24 (2003): 4337.
- [75] Hariraksapitak, P., and Supaphol, P. Preparation and properties of  $\alpha$ -chitin-whisker-reinforced hyaluronan–gelatin nanocomposite scaffolds. Journal of Applied Polymer Science 117 (2010): 3406-3418.
- [76] Gronthos, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. Journal of Dental Research 81 (2002): 531-5.
- [77] Daniel, L.A. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 4 (2010): 73-81.

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริรัตน์ เพ็ญศิริกุล เกิดที่กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 28 ธันวาคม พ.ศ. 2528 จบการศึกษาระดับปริญญาตรีบัณฑิตจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาเคมี เมื่อปีการศึกษา 2550 ผ่านการฝึกงานภาคฤดูร้อนในแผนกควบคุมคุณภาพที่บริษัทโรเดียไทยอินดัสตรี บางปู เมื่อปี 2549

บทความประชุมในการนำเสนอผลงาน

1. สิริรัตน์ เพ็ญศิริกุล, พิชญ์ ศุภผล และ ประสิทธิ์ ภาวสันต์. (2553, กันยายน 16-17) การขึ้นรูปและคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนจากพอลิคาโพรแลกโตนเคลือบด้วยเจลาติน/ไฮยาลูโรแนน/คอนโดรอิตินซัลเฟต. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 18 สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์
2. Pensirikul, S., Supaphol, P., and Pavasant, P. (2010, October 7-8) Fabrication and Properties of Gelatin/Hyaluronan/Chondroitin sulfate Coated on Porous Polycaprolactone Scaffold. Proceedings of 1<sup>st</sup> Polymer Conference of Thailand, Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok.

