



การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากวัสดุชีวภาพสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคแช่เยือกแข็ง

จิราพร จรอนันต์^{1*}

Received: July 19, 2019

Revised: August 28, 2019

Accepted: September 17, 2019

บทคัดย่อ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการรักษาโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของอวัยวะ ซึ่งต้องอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นโครงร่างค้ำจุนให้เซลล์เกาะและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเพื่อทำหน้าที่ทดแทนเซลล์เดิมที่เสื่อมสภาพไป วัสดุที่จะนำมาผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีความสำคัญต่อความสำเร็จของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากสารธรรมชาติด้วยเทคนิคแช่เยือกแข็ง โดยนำโคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งมาผสมกับอะกาโรสและคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในสัดส่วนที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์มากที่สุด จากนั้นศึกษาลักษณะโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ใช้โปรแกรม ImageJ ในการวัดขนาดรูพรุน ศึกษาคุณสมบัติในการอุ้มน้ำ อัตราการสลายตัว รวมทั้งการทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยใช้เทคนิค MTT นอกจากนี้ยังนำโครงเลี้ยงเซลล์ในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 มาย้อมสี H&E เพื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ ผลการวิจัยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากอะกาโรส-โคโตซาน-คอลลาเจนชนิดที่ 1 ในสัดส่วน 3:2:0.5 มีลักษณะทางกายภาพเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมีขนาดรูพรุนประมาณ 179.92 ไมครอน รูพรุนมีลักษณะยาวรีและเป็นรูปหลายเหลี่ยมคล้ายรังผึ้งเชื่อมต่อกันทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ อัตราการอุ้มน้ำสูงถึง 87% และมีอัตราการสลายตัวที่ 4 สัปดาห์เพียง 4% นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้ไม่มีความเป็นพิษต่อการศึกษารังนี้ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากวัสดุชีวภาพมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ โดยเฉพาะการนำเปลือกกุ้งซึ่งเป็นขยะมาเพิ่มมูลค่า โดยการสกัดโคโตซานเพื่อผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: โครงเลี้ยงเซลล์, วัสดุชีวภาพ, วิศวกรรมเนื้อเยื่อ, เทคนิคแช่เยือกแข็ง

¹สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

*ผู้รับผิดชอบบทความ



Fabrication the biomaterial scaffold for tissue engineering by freeze-drying technique

Chirapond Chonananant^{1*}

Abstract

The alternative approach for therapy degenerative disease is tissue engineering using the biocompatible scaffold to facilitate cell growth and proliferation. The materials chosen for fabrication the scaffold are the key to successful tissue engineering applications. The objective of this study was to fabricate the biomaterial scaffold via freeze-drying method. In the current work, chitosan was extracted from shrimp shells and then combined with agarose and collagen type I in different concentrations to optimize the most desirable scaffold. The microstructure of the scaffold was performed using scanning electron microscopy (SEM). The average pore size of the scaffold was determined by the ImageJ software. Physical functional as well as water uptake ability and degradation rate were also evaluated. MTT assay was carried out to determine the viability of normal human fibroblast on the scaffold. The histological structure of the cell-scaffold was determined using H&E staining. The freeze-drying technique could produce a sponge-like biocomposite scaffold. The optimum ratio of agarose-chitosan-collagen type I was found to be 3:2:0.5. The synthesized scaffold consisted of an interconnected porous structure with a pore size diameter around 179.92 micron and 87% water uptake ability. In addition, the degradation rate of the biomaterial scaffold after 4 weeks was only 4%. Moreover, the cell proliferation was observed by culturing fibroblast on the scaffold for 3 weeks, which indicate their biocompatibility to human fibroblast. This study indicates the potential of biomaterial scaffold for tissue engineering. Especially, the use of shrimp shells which are garbage to extract chitosan and useful as a scaffold for applications in tissue engineering.

Keywords: Scaffold, Biomaterial, Tissue engineering, Freeze-drying technique

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Science, Burapha University, Chonburi

*Corresponding author: (e-mail: chirapond@go.buu.ac.th)

บทนำ

ในอนาคตงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของอวัยวะ เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องอาศัยอวัยวะเทียมหรือการปลูกถ่ายอวัยวะ ซึ่งต้องใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นโครงร่างค้ำจุนให้เซลล์ยึดเกาะและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เพื่อทำหน้าที่ทดแทนเซลล์เดิมที่เสื่อมสภาพไป โครงเลี้ยงเซลล์ที่ดีจะต้องมีความยืดหยุ่น มีรูพรุนสูง^(1, 2) เพื่อเป็นทางแลกเปลี่ยนสารอาหารและเป็นทางเปลี่ยนถ่ายของเสียที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของเซลล์ นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ต้องสลายได้เองและไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย⁽³⁾ โครงเลี้ยงเซลล์สามารถผลิตได้จากวัสดุธรรมชาติหลายชนิด เช่น อะกาโรส ไคโตซาน คอลลาเจน⁽⁴⁻⁶⁾ โดยอะกาโรสเป็นโพลีเมอร์สายยาวที่ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากอะกาโรสจะมีความยืดหยุ่นดี แต่ไม่กระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์เนื่องจากอะกาโรสค่อนข้างเป็นกลางทางไฟฟ้าหรือมีประจุน้อยมาก^(7, 8) ไคโตซานเป็นโกลิโกลิเมอร์ที่เกิดจาก glucosamine และ N-acetylglucosamine โครงสร้างประกอบด้วยหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ การที่ไคโตซานมีประจุบวกทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์ทางไฟฟ้ากับประจุลบของผนังเซลล์ได้ดี ทำให้โครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากไคโตซานมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี⁽⁹⁻¹¹⁾ ส่วนคอลลาเจนเป็นโปรตีนธรรมชาติที่พบมากในผิวหนังและกระดูก สามารถคืนสภาพกลับเป็นเส้นใยได้ เนื่องจากโครงสร้างมีลักษณะเป็น triple-helix และมีประจุไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุล โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นองค์ประกอบสามารถกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี^(10, 12-13)

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากอะกาโรสผสมไคโตซานเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตับพบว่าอัตราส่วนระหว่างอะกาโรสและไคโตซานที่เหมาะสมคือ 3: 1 โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีความสามารถในการอุ้มน้ำมีความคงตัวและมีรูพรุนสูง เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ⁽¹⁴⁾ แต่การยึดเกาะของเซลล์ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเกิดขึ้นได้ไม่ดี ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่

เกิดจากไคโตซานผสมคอลลาเจนชนิดที่ 1 สามารถเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์ได้มากขึ้น เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากไคโตซานเพียงอย่างเดียว⁽¹²⁾ ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เกิดจากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ผสมอะกาโรสมีความยืดหยุ่นสูง แต่กลับพบการยึดเกาะของเซลล์ลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์บนโครงร่างที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสสูง⁽¹⁵⁾ อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากสารธรรมชาติยังมีข้อด้อยคือการยึดเกาะของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาณน้อย ทำให้เกิดการสูญเสียเซลล์ไประหว่างการเพาะเลี้ยง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจาก อะกาโรส ไคโตซาน และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยเทคนิคแซ่เยือกแข็ง เนื่องจากสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเด่นและด้อยต่างกันไป เมื่อนำมาผสมกันเพื่อผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์อาจจะทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวภาพ เช่น เป็นวัสดุทางการแพทย์หรือเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ นอกจากนี้สารทั้ง 3 ชนิดยังมีราคาถูก หาได้ง่าย โดยเฉพาะไคโตซานซึ่งสามารถสกัดได้จากเปลือกกุ้งซึ่งเป็นขยะที่พบทั่วไป ยิ่งไปกว่านั้นสารธรรมชาติเหล่านี้ยังสามารถสลายได้เองในร่างกายและไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ เมื่อผลิตโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะถูกนำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพต่างๆ เช่น ลักษณะรูพรุน ขนาดรูพรุน คุณสมบัติในการอุ้มน้ำ อัตราการสลายตัว ตลอดจนทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ อาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคในอนาคตโดยอาศัยเทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อ นอกจากประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากไคโตซานยังเป็นการใช้ทรัพยากรได้อย่างคุ้มค่า สามารถลดปริมาณขยะที่จะก่อให้เกิดมลพิษและสามารถสร้างรายได้จากของเหลือใช้ได้อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. การสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

วิธีในการสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้งพัฒนามาจากการศึกษาของ Benjakul S และคณะ 1990⁽¹⁸⁾ โดยนำเปลือกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) 1 กิโลกรัม

มาล้างให้สะอาด อบให้แห้งแล้วบดเป็นชิ้นเล็กๆ เติม 10% NaOH (อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อ NaOH เป็น 1:10) ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง NaOH ออกให้หมด นำกากเปลือกกุ้งที่ได้ใส่ 1.25 N HCl (อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อ HCl เป็น 1:10) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง HCl ออกให้หมด ส่วนนี้คือไคติน จากนั้นเติม 50% NaOH (อัตราส่วนไคตินต่อ NaOH เป็น 1:20) ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง NaOH ออกให้หมด จนน้ำล้างครั้งสุดท้ายมีค่า pH เป็นกลาง จากนั้นอบให้แห้ง

2. การวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซีติล (Degree of Deacetylation, %DD)

พารามิเตอร์ที่สำคัญในการพิจารณาไคโตซานคือค่าระดับการกำจัดหมู่อะซีติลซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโนบนโมเลกุลของไคติน ทำให้ไคโตซานสามารถละลายได้ดีขึ้น การวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซีติลในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี acid-base titration method⁽¹⁹⁾ โดยชั่งไคโตซาน 0.1 กรัม ละลายใน 0.1 M HCl 30 มิลลิลิตร ใช้ methyl orange เป็น indicator นำสารละลายไคโตซานไปไทเทรต ด้วย 0.1 M NaOH เพื่อคำนวณหาระดับการกำจัดหมู่อะซีติล ตามสูตรดังนี้

$$DD (\%) = \frac{C_1 V_1 - C_2 V_2}{M \times 0.0994} \times 0.016$$

เมื่อ C1 คือความเข้มข้นของ HCl, V1 คือปริมาตรของ HCl ที่ใช้ละลายไคโตซาน, C2 คือความเข้มข้นของ NaOH, V2 คือปริมาตรของ NaOH, 0.016 คือค่าสัมประสิทธิ์ของ NH₂ หน่วยโมโนเมอร์ไคติน และ 0.0994 คือค่าสัมประสิทธิ์ของ NH₂ หน่วยโมโนเมอร์ไคโตซาน, M คือน้ำหนักของไคโตซาน

3. การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคแช่เยือกแข็ง (freeze dry)

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จาก อะกาโรสไคโตซาน-คอลลาเจนชนิดที่ 1 ทำโดยพัฒนามาจากการศึกษาของ Tripathi A และคณะ 2015⁽¹⁴⁾ ซึ่งใช้อะกาโรสและไคโตซานในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำไคโตซานมาละลายใน acetic acid ที่มีความเข้มข้น 1% ส่วน

อะกาโรส (Sisco Research Laboratories, Mumbai, India) และคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Himedia, Mumbai, India) ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นผสมสารทั้ง 3 ชนิดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังแสดงในตารางที่ 1 ผสมสารทั้ง 3 ชนิดให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทสารละลายใส่หลอดเซนติพิวักพลาสติก แล้วนำไปทำแช่เยือกแข็ง (Martin Christ, Germany) ที่อุณหภูมิ -100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. การศึกษาลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

นำโครงเลี้ยงเซลล์จากอะกาโรส-ไคโตซาน-คอลลาเจนชนิดที่ 1 ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดเพื่อดูขนาดและลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยการใช้อนุภาคทองคำเคลือบบนผิวหน้าตัวอย่าง จากนั้นบันทึกภาพที่กำลังขยาย 2,500 เท่า นำภาพ SEM ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดของรูพรุนด้วยโปรแกรม ImageJ

5. การศึกษาคุณสมบัติในการอุ้มน้ำ (water uptake)

การศึกษาคุณสมบัติในการอุ้มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดทำ 3 ซ้ำ โดยตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้เป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร หนา 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนัก (W_{dry}) แล้วแช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน 1XPBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนัก (W_{wet}) นำน้ำหนักก่อนและหลังมาคำนวณเป็นอัตราการอุ้มน้ำตามสูตรดังนี้

$$Water\ uptake\ ability\ (\%) = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100$$

6. การทดสอบระยะเวลาในการสลายตัว (degradation rate)

การทดสอบระยะเวลาในการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดทำ 3 ซ้ำ โดยตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้เป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร หนา 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนัก (W_1) แล้วแช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน 1XPBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 1 สัปดาห์ จากนั้นนำโครงเลี้ยงเซลล์มาทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักหลังอบ (W_2) และแช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน 1XPBS ต่อที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส จนครบ 4 สัปดาห์ โดยแต่ละสัปดาห์เอาโครงเลี้ยงเซลล์ออกมาอบแห้งและชั่งน้ำหนักดูการสลายตัว นำน้ำหนักก่อนและหลังมาคำนวณเป็นอัตราการสลายตัว ตามสูตรดังนี้

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

7. การทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ด้วยเทคนิค MTT

นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ตัดให้เป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร หนา 0.5 เซนติเมตร มาทำให้ปราศจากเชื้อภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์

ชนิด DMEM-HG ในสภาพหลุมจำนวน 24 ช่อง (24 well plate) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยดเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ (ATCC CRL-1635, Rockville, MD, USA) จำนวน 1×10^6 เซลล์ ลงไปบนโครงเลี้ยงเซลล์ บ่มในตู้ CO_2 เป็นเวลา 21 วัน เปลี่ยนอาหารทุก 3-4 วัน จากนั้นนับเซลล์ที่มีชีวิตทุกสัปดาห์ โดยเติม MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้ CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO : Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 250 ไมโครลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัด OD ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนของสารธรรมชาติที่ใช้ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์	อัตราส่วนของสารธรรมชาติ (%)		
	อะกาโรส	ไคโตซาน	คอลลาเจนชนิดที่ 1
1	1	1	0.5
2	1	1	3
3	1	2	0.5
4	1	2	3
5	3	1	0.5
6	3	1	3
7	3	2	0.5
8	3	2	3

8. การย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E)

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนโครงเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ นำโครงเลี้ยงเซลล์ สัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 มารักษาสภาพใน 4% formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาฝังใน paraffin และนำไปตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนาของชิ้นงานประมาณ 10 ไมครอน วางตัวอย่างบนสไลด์

แล้วนำสไลด์ไปอบให้แห้ง ทำการดึง paraffin ออกโดยจุ่มสไลด์ตัวอย่าง ใน xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นจุ่มสไลด์ ในแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ ขั้นตอนละ 5 นาที (1-2 ครั้ง) จากนั้นจุ่มตัวอย่างในสี hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปะปา จุ่มตัวอย่างในสี eosin เป็นเวลา 1 นาที ทำการดึงน้ำออกโดยจุ่มสไลด์ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ จากความเข้มข้นต่ำไปสูง แล้ว mount สไลด์ด้วยน้ำยา permount

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

งานวิจัยนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลต่าง ๆ นำเสนอในลักษณะของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้สถิติ Shapiro-Wilk test ในการทดสอบการแจกแจงข้อมูล โดยพบว่าข้อมูลทั้งหมดมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) ใช้โปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 8.0.2 ในการวิเคราะห์หาค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ ด้วยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การทดสอบของ Turkey multiple comparison test ส่วนการเปรียบเทียบภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน ใช้สถิติ One-way repeated measures ANOVA ที่ระดับ $p < 0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

1. การสกัดโคโตซานจากเปลือกกุ้ง

โคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งกุลาดำมีน้ำหนัก 13.6 กรัม ลักษณะของโคโตซานที่สกัดได้มีสีขาวขุ่น เป็นแผ่นขนาดเล็กและมีความเปราะแตกเป็นขุย ดังแสดงในรูปที่ 1 โคโตซานที่สกัดได้ละลายได้ดีใน 1% acetic acid ส่วนระดับการกำจัดหมู่อะซีทิลมีค่าเฉลี่ย $70.89 \pm 1.54\%$ ซึ่งถือว่าโคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งกุลาดำในการศึกษาคั้งนี้มีระดับการกำจัดหมู่อะซีทิลสูง



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของโคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งกุลาดำ

2. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์

จากการสังเกตโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากอะกาโรส-โคโตซาน-คอลลาเจนด้วยตาเปล่า พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการทำแช่เยือกแข็งแล้วสามารถขึ้นรูปเป็น 3 มิติได้ มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาตัดให้เป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตรหนา 0.5 เซนติเมตร พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 1-4 มีการยุบตัวลงและไม่คืนรูป ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5-8 มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ มีความยืดหยุ่นและสามารถคืนรูปเป็น 3 มิติได้ ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5-8 ซึ่งมีความยืดหยุ่นไปศึกษาลักษณะของรูพรุนและขนาดรูพรุนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดต่อไป

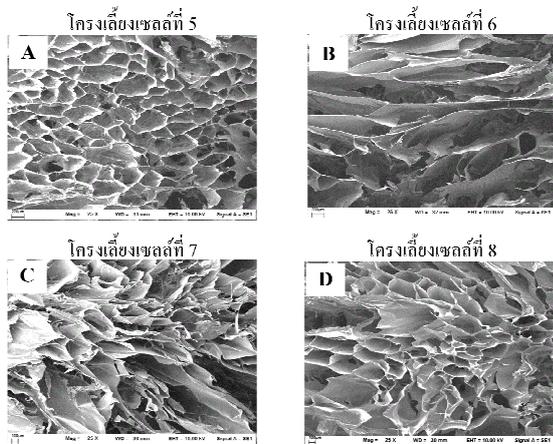


รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1-8 ที่สังเกตด้วยตาเปล่า

3. การศึกษาลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

จากการศึกษาลักษณะของรูพรุนภายในโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พร้อมทั้งวิเคราะห์ขนาดของรูพรุนด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5 (รูปที่ 3A) รูพรุนมีลักษณะหลายเหลี่ยมคล้ายรังผึ้ง เป็นรูเชื่อมต่อกันทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ (interconnected pore) ขนาดของรูพรุนประมาณ 170.37 ไมครอน โครงเลี้ยงเซลล์ที่ 6 (รูปที่ 3B) รูพรุนมีลักษณะยาว เรียวเป็นท่อ เป็นรูเชื่อมต่อกันทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ ขนาดของรูพรุนประมาณ 241.99 ไมครอน ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 (รูปที่ 3C) และ 8 (รูปที่ 3D) รูพรุน

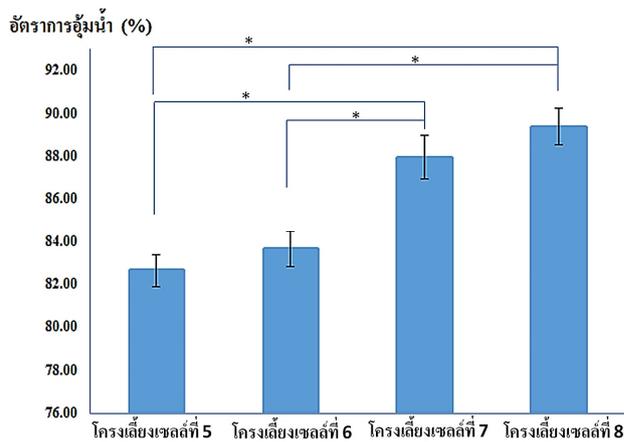
มีลักษณะยาวรีและเป็นรูปหลายเหลี่ยมคล้ายรังผึ้ง เป็นรูเชื่อมต่อกันทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ ขนาดของรูพรุนประมาณ 179.92 และ 184.29 ไมครอน ตามลำดับ



รูปที่ 3 แสดงลักษณะโครงสร้างและขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5, 6, 7 และ 8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scale bar = 100 ไมครอน)

4. การศึกษาอัตราการอุ้มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ (Water uptake)

จากผลการวิจัยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5, 6, 7 และ 8 มีอัตราการอุ้มน้ำ $82.62 \pm 0.74\%$, $83.64 \pm 0.83\%$, $87.33 \pm 1.00\%$ และ $89.35 \pm 0.86\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 และ 8 มีความสามารถในการอุ้มน้ำมากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 8 มีองค์ประกอบของ อะกาโรส, ไคโตซาน และคอลลาเจนชนิดที่ 1 สูงที่สุด ตรงข้ามกับโครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่ 5 ซึ่งมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้น้อยที่สุด เพราะมีองค์ประกอบของ อะกาโรส, ไคโตซาน และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิด มีอัตราการอุ้มน้ำมากกว่า 80% ซึ่งถือว่าเป็นอัตราการอุ้มน้ำที่สูง สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ได้



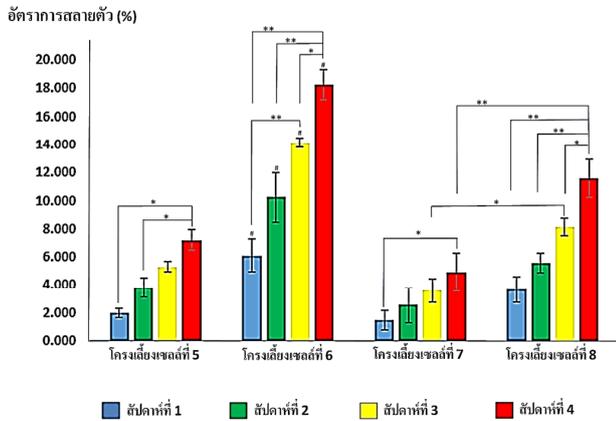
รูปที่ 4 แสดงผลการศึกษาอัตราการอุ้มน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5, 6, 7 และ 8 ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm 1SD$, $N=3$, * $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA

5. การศึกษาอัตราการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์

จากการศึกษาอัตราการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ชนิดมีแนวโน้มสลายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยเฉพาะโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 6 และ 8 ซึ่งมีอัตราการสลายตัวในแต่ละสัปดาห์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5 มีอัตราการสลายตัวในสัปดาห์ที่ 4 มากกว่าสัปดาห์ที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 มีอัตราการสลายตัวในแต่ละสัปดาห์น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามอัตราการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 ในสัปดาห์ที่ 4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 1 ($p < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในแต่ละสัปดาห์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 6 มีอัตราการสลายตัวในแต่ละสัปดาห์สูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5, 7 และ 8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กล่าวโดยสรุปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 มีอัตราการสลายตัวที่ 4 สัปดาห์น้อยที่สุด โดยมีอัตราการสลายตัว

เพียง $4.91 \pm 0.65\%$ รองลงมาคือโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5 มีอัตราการสลายตัวที่สัปดาห์ที่ 4 เป็น $7.22 \pm 0.89\%$ และโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 8 มีอัตราการสลายตัวที่สัปดาห์ที่ 4 เป็น $11.60 \pm 1.34\%$ ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 6 มีอัตราการสลายตัวที่สัปดาห์ที่ 4 สูงที่สุดคือ $18.29 \pm 0.71\%$



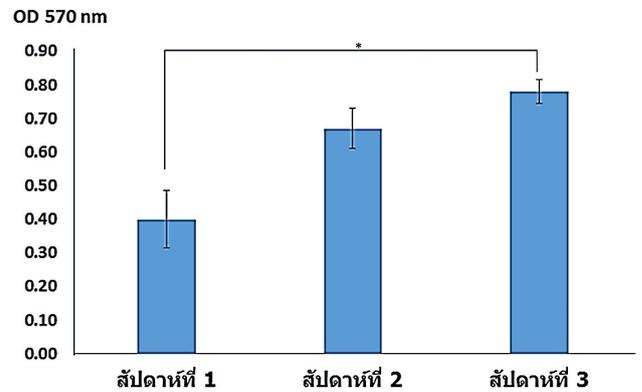
รูปที่ 5 แสดงอัตราการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5, 6, 7 และ 8 ในแต่ละสัปดาห์ ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm 1SD$, $N=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA, # เปรียบเทียบอัตราการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในแต่ละสัปดาห์

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมา พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 ซึ่งมีรูพรุนเป็นรูเชื่อมต่อกันทั่วโครงเลี้ยงเซลล์ ขนาดของรูพรุนประมาณ 179.92 ไมครอน มีความสามารถในการอุ้มน้ำ $87.33 \pm 1.00\%$ และมีอัตราการสลายตัวที่สัปดาห์ที่ 4 ต่ำที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 ไปทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ต่อ ด้วยเทคนิค MTT และย้อม H&E เพื่อดูการเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย

6. การทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เมื่อโครงเลี้ยงไฟโบรบลาสต์บนโครงเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 ซึ่งผลิตจาก อะกาโรส-ไคโตซาน-คอลลาเจนชนิดที่ 1 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เพราะเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1

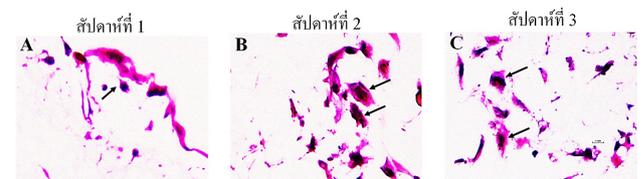
จนถึงสัปดาห์ที่ 3 โดยพบว่าจำนวนเซลล์ในสัปดาห์ที่ 3 มากกว่าสัปดาห์ที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 สามารถเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์และเป็นโครงร่างค้ำจุนให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงผลการศึกษาความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยเทคนิค MTT assay ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm 1SD$, $N=3$, * $p<0.05$ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA

7. การศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนโครงเลี้ยงเซลล์

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนโครงเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถเกาะและเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 (รูปที่ 7A) โดยจะเห็นว่าจำนวนเซลล์ที่เจริญบนโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในสัปดาห์ที่ 2 (รูปที่ 7B) และสัปดาห์ที่ 3 (รูปที่ 7C) ซึ่งผลการย้อมสี H&E สัมพันธ์กันกับการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT (รูปที่ 6)



รูปที่ 7 แสดงผลการย้อม H&E เพื่อดูการเกาะและการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (ลูกศรชี้) บนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ (7A), 2 สัปดาห์ (7B) และ 3 สัปดาห์ (7C)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

งานวิจัยครั้งนี้พบว่าไคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งกุลาดำมีระดับการกำจัดหมู่อะซีติล 70.89% ซึ่งการกำจัดหมู่อะซีติลเป็นตัวบ่งชี้ความเป็นไคติน-ไคโตซาน เนื่องจากไคติน-ไคโตซานเป็นโคโพลิเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนของ N-acetyl-D-glucosamine มากกว่า จะแสดงคุณสมบัติเด่นของไคติน ในทางตรงกันข้ามถ้าสัดส่วนของ D-glucosamine มากกว่า จะแสดงคุณสมบัติเด่นของไคโตซาน ซึ่งไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซีติลสูงจะประกอบด้วยหมู่เอมิโนจำนวนมาก ดังนั้นความสามารถในการดูดซับน้ำก็จะสูงไปด้วย อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ตัดแปลงวิธีการสกัดไคโตซานมาจากการศึกษาของ Benjakul S และคณะ 1990⁽¹⁸⁾ ซึ่งสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้งแช่บ๊วย โดยในขั้นตอนการกำจัดโปรตีนใช้ความเข้มข้นของ NaOH 3% ร่วมกับกำจัดหมู่อะซีติลโดยใช้สัดส่วนไคตินกับ 50% NaOH เป็น 1:15 ไคโตซานที่ได้มีระดับการกำจัดหมู่อะซีติล 58% การศึกษาครั้งนี้ได้เพิ่มความเข้มข้นของ NaOH เป็น 10% ร่วมกับเพิ่มสัดส่วนไคตินกับ 50% NaOH เป็น 1:20 เนื่องจากการกำจัดหมู่อะซีติลเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ NaOH ที่ใช้⁽²⁰⁾ จึงทำให้ไคโตซานที่สกัดได้มีระดับการกำจัดหมู่อะซีติลสูงกว่าการศึกษาของ Benjakul S และคณะ 1990⁽¹⁸⁾

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากสารธรรมชาติ อะกาโรส ไคโตซานและคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง สามารถขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติได้โดยลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์มาตัดให้เป็นทรงกลม พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 1-4 มีการยุบตัวลงและไม่คืนรูป ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5-8 มีความยืดหยุ่นและสามารถคืนรูปเป็น 3 มิติได้ การที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ 1-4 ยุบตัวลงและไม่คืนรูป เกิดจากมีส่วนผสมของอะกาโรสเพียง 1% เพราะเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะกาโรสเป็น 3% ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5-8 จะเห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความยืดหยุ่นมากขึ้น เนื่องจากอะกาโรสเป็นสารที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่น เพิ่มความคงตัวและไม่ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์

เปราะแตกง่าย^(21, 22) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ 8 มีความสามารถในอุ้มน้ำมากที่สุด ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5 อุ้มน้ำน้อยที่สุด โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 8 เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ อะกาโรส ไคโตซาน และคอลลาเจนชนิดที่ 1 สูงที่สุด ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 5 มีองค์ประกอบของ อะกาโรส ไคโตซาน และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ต่ำที่สุด ดังนั้นการที่โครงเลี้ยงเซลล์มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้ดี เนื่องมาจากองค์ประกอบของสารที่มีคุณสมบัติในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดี เช่น อะกาโรสและไคโตซาน โดยเฉพาะไคโตซานซึ่งเป็นสาร polysaccharide ที่มีหมู่เอมิโน ($-NH_2$) และหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) สูง^(23, 24) ซึ่ง functional group เหล่านี้มีความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลาย ซึ่งช่วยให้สารมีคุณสมบัติชอบน้ำ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ 6 มีอัตราการสลายตัวค่อนข้างเร็ว โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ โครงเลี้ยงเซลล์สลายตัวไปประมาณ 18% ซึ่งการที่โครงเลี้ยงเซลล์สลายตัวเร็วอาจเกิดจากมีรูพรุนขนาดใหญ่ (241.99 ไมครอน) ทำให้มีพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับน้ำมาก ปฏิกริยา hydrolysis ซึ่งต้องอาศัยน้ำในการเข้าทำปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดี ส่งผลให้โครงร่างที่ 6 สลายตัวเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์อื่นที่มีรูพรุนเล็กกว่า การสลายตัวเร็วเกินไปอาจส่งผลต่อการเลี้ยงเซลล์ โดยทำให้เซลล์ไม่มีพื้นที่ยึดเกาะเพื่อแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และอาจส่งผลต่อรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ อาจทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีการยุบตัวและอุดกั้นรูพรุนทำให้สารอาหารรวมทั้งการแลกเปลี่ยนของเสียเกิดขึ้นได้ไม่ดี

งานวิจัยครั้งนี้พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 ซึ่งมีขนาดของรูพรุนประมาณ 179.92 ไมครอน มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงถึง 87% และมีอัตราการสลายตัวที่สัปดาห์ที่ 4 ประมาณ 4% ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกโครงเลี้ยงเซลล์ที่ 7 ไปทดสอบความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยเทคนิค MTT และย้อม H&E ซึ่งพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถเกาะและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ สังเกตจากจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเหมาะในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไปในอนาคต ผลการทดลองที่ได้จาก

งานวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา⁽²⁵⁻²⁷⁾ ซึ่งผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ โคลโตซานเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่าโครงเลี้ยง เซลล์ที่ผลิตขึ้นมีความยืดหยุ่นและมีรูพรุนสูง เซลล์ ไฟโบรบลาสต์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบนโครงเลี้ยงเซลล์ ได้ดี โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ เลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากคอลลาเจน ชนิดที่ 1 และโคลโตซานกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งใช้อะกาโรสและ โคลโตซานผลิตโครงเลี้ยงเซลล์⁽¹⁴⁾ กลับพบว่าจำนวนเซลล์ ที่มีชีวิตลดลงจาก 60% เหลือเพียง 40% ในวันที่ 10 ที่ทำการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้อาจเกิดจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิต ได้มีรูพรุนขนาดเล็ก (40-70 ไมครอน) ทำให้เซลล์ ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปเจริญภายในโครงเลี้ยงเซลล์ได้ อีกทั้งรูพรุนที่มีขนาดเล็กส่งผลให้การแลกเปลี่ยนสาร อาหารและการเปลี่ยนถ่ายของเสียเกิดขึ้นได้ไม่ดี นอกจากนี้ สารจากธรรมชาติที่นำมาผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีคุณสมบัติ ในการกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ เช่น คอลลาเจนที่ โครงสร้างประกอบด้วย Arg-Gly-Asp (RGD) sequence ซึ่งมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์

กล่าวโดยสรุป การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค แชนเยือกแข็งนี้ นอกจากคุณสมบัติของสารแต่ละชนิดจะมี ผลต่อลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว สัดส่วนในการเติม สารแต่ละชนิดก็ส่งผลต่อลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ เช่นกัน เนื่องจากในขั้นตอนการทำแชนเยือกแข็ง น้ำที่ผสม อยู่กับสารแต่ละชนิดจะกลายเป็นน้ำแข็ง โดยน้ำแข็งที่ได้ จะมีการจัดเรียงผลึกแทรกอยู่ในโมเลกุลของสารที่ใช้ทำ โครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการลดอุณหภูมิลงเพื่อให้น้ำแข็ง เปลี่ยนเป็นไอน้ำแล้วระเหิดออกมาเกิดเป็นรูพรุนตาม ขนาดของผลึกน้ำแข็ง^(28, 29) ส่วนผนังและรูปร่างของรูพรุน จะเกิดจากสารที่เป็นองค์ประกอบในโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากสารธรรมชาติ ซึ่งมี คุณสมบัติเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกายสามารถส่งเสริม การเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ที่เกื้อหนุนให้เซลล์เกาะและเจริญแบ่งตัว เพิ่มจำนวนได้ ถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในงาน ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (สัญญารับทุนเลขที่ AHS 02/2561)

เอกสารอ้างอิง

1. Raeisdasteh V, Davaran S, Ramazani A, Salehi R. Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017; 28: 1797-825. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28707508>.
2. Chen G, Kawazoe N. Porous scaffolds for regeneration of cartilage, bone and osteochondral tissue. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1058: 171-91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29691822>.
3. Asghari F, Samiei M, Adibkia K, Akbarzadeh A, Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017; 45: 185-92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26923861>.
4. Coenen J, Bernaerts KV, Harings W, Jockenhoevel S, Ghazanfari S. Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers. *Acta Biomater.* 2018; 79: 60-82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30165203>.
5. Bonani W, Singhatanadgige W, Pornanong A, Motta A. Natural origin materials for osteochondral tissue engineering. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1058: 3-30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29691815>.

6. Zou L, Zhang Y, Liu X, Chen J, Zhang Q. Biomimetic mineralization on natural and synthetic polymers to prepare hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 178: 222-29. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30870789>.
7. Stokols S, Tuszynski MH. Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials*. 2006; 27: 443-51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099032>.
8. Bhat S, Tripathi A, Kumar A. Supermacroporous chitosan-agarose-gelatin cryogels: in vitro characterization and in vivo assessment for cartilage tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2011; 8: 540-54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943683>.
9. Merlin Rajesh Lal LP, Suraishkumar GK, Nair PD. Chitosan-agarose scaffolds supports chondrogenesis of Human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105: 1845-55. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28256803>.
10. Yan LP, Wang YJ, Ren L, Wu G, Caridade SG, Fan JB, et al. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 95: 465-75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27080716>.
11. Madihally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999; 20: 1133-42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10382829>.
12. Somaiah C, Kumar A, Mawrie D, Sharma A, Patil SD, Bhattacharyya J, et al. Collagen promotes higher adhesion, survival and proliferation of mesenchymal stem cells. *PloS one*. 2015; 10: e0145068. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678765>.
13. Varley MC, Neelakantan S, Clyne TW, Dean J, Brooks RA, Markaki AE. Cell structure, stiffness and permeability of freeze-dried collagen scaffolds in dry and hydrated states. *Acta Biomater*. 2016; 33: 166-75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270611630040x>.
14. Tripathi A, Melo JS. Preparation of a sponge-like biocomposite agarose-chitosan scaffold with primary hepatocytes for establishing an in vitro 3D liver tissue model. *RSC Adv*. 2015; 5: 30701-10. Available from: <https://pubs.rsc.org/content/articlepdf/2015/ra/c5ra04153h>.
15. Ulrich TA, Jain A, Tanner K, MacKay JL, Kumar S. Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices. *Biomaterials*. 2010; 31(7): 1875-84. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142-9612\(09\)01168-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142-9612(09)01168-5).
16. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004; 71: 343-54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15386396>.
17. Jeong KJ, Song Y, Shin HR, Kim JE, Kim J, Sun F, et al. In vivo study on the biocompatibility of chitosan-hydroxyapatite film depending on degree of deacetylation. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105: 1637-45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28032681>.

18. Benjakul S, Sophanodora P. Production of chitosan from banana prawn shell. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 1990; 12: 439-443. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TH19970042145>.
19. Hossain MS, Iqbal A. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *Bangladesh Agril Univ.* 2014; 12: 153-60. Available from: https://www.researchgate.net/publication/298170105_Production_and_characterization_of_Chitosan_from_shrimp_shells_waste.
20. Kunlapapuk S, Kukkong P, Kulabtong S. Chitosan in aquaculture. *Veridian E-Journal.* 2013; 6: 984-993. Available from: <https://www.tci-thaijo.org/index.php/Veridian-E-Journal/article/view/30725/26535>
21. Ng KW, Wang CC, Mauck RL, Kelly TA, Chahine NO, Costa KD, et al. A layered agarose approach to fabricate depth-dependent inhomogeneity in chondrocyte-seeded constructs. *J Orthop Res.* 2005; 23: 134-41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607885>.
22. Hu Z, Hong P, Liao M, Kong S, Huang N, Ou C, et al. Preparation and characterization of chitosan-agarose composite films. *Materials.* 2016; 9: 816. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28773936>.
23. He XM, Liang XC, Chen X, Yuan BF. High strength and hydrophilic chitosan microspheres for the selective enrichment of N-glycopeptides. *Anal Chem.* 2017; 89: 9712-21. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.7b01283>.
24. Becerra J, Sudre G, Royaud I, Montserret R, Verrier B, Rochas C, et al. Tuning the hydrophilic/hydrophobic balance to control the structure of chitosan films and their protein release behavior. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2017; 18: 1070-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27975192>.
25. Sarkar SD, Farrugia BL, Dargaville TR, Dhara S. Chitosan-collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101: 3482-92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.34660>.
26. Chen KY, Liao WJ, Kuo SM, Tsai FJ, Chen YS, Huang CY, et al. Asymmetric chitosan membrane containing collagen I nanospheres for skin tissue engineering. *Biomacromolecules.* 2009; 10: 1642-9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm900238b>.
27. Huang R, Li W, Lv X, Lei Z, Bian Y, Deng H, et al. Biomimetic LBL structured nanofibrous matrices assembled by chitosan/collagen for promoting wound healing. *Biomaterials.* 2015; 53: 58-75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890707>.
28. Brougham CM, Levingstone TJ, Shen N, Cooney GM, Jockenhoevel S, Flanagan TC, et al. Freeze-drying as a novel biofabrication method for achieving a controlled microarchitecture within large, complex natural biomaterial scaffolds. *Engineering Reports.* 2017; 6: 1-17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28758358>.
29. Wang C, Jiang W, Zuo W, Han G, Zhang Y. Effect of heat-transfer capability on micropore structure of freeze-drying alginate scaffold. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018; 93: 944-49. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30274131>.