NUEJ
NARESUAN UNIVERSITY
ENGINEERING JOURNAL

การพัฒนาการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังด้วยเทคนิคการหล่อแบบเทปจากเจลาติน ไฟโบรอิน และไคโตซาน

Development of Fabrication of Gelatin-Fibroin-Chitosan Scaffold for Skin Tissue Engineering Using Tape Casting Technique

อุษมน พจน์สุจริต[1*] อนิรุท ไชยจารุวณิช[2] และสุรักษ์ อุดมสม[3]
Ussamon Potsudjarit[1*], Anirut Chaijaruwanich[2], and Surak Udomsom[3]

[1*,2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีการผลิตขั้นสูง ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ, คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3]ศูนย์วิศวกรรมชีวการแพทย์, คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[*]Corresponding author: ussamon_p@cmu.ac.th, Email: anirut@eng.cmu.ac.th[2], suruk_u@cmu.ac.th[3]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังด้วยเทคนิคการหล่อแบบเทป ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังโดยสามารถควบคุมความหนาของชิ้นงานได้ ซึ่งจะใช้หลักการออกแบบการทดลองส่วนผสมเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมและสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ และหาผลขององค์ประกอบที่มีผลต่อการบวมน้ำของโครง-เลี้ยงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยเจลาติน ไฟโบรอิน และไคโตซาน จากการทดลองขึ้นรูปเบื้องต้นพบว่าส่วนผสมที่สามารถขึ้นรูปได้ต้องมีส่วนประกอบของไฟโบรอินน้อยกว่าร้อยละ 40 และจากการขึ้นรูปพบว่าทั้ง 7 อัตราส่วนผสมสามารถขึ้นรูปด้วยกระบวนการขึ้นรูปดังกล่าวได้ ชิ้นงานที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่นบางเรียบ มีความหนาสม่ำเสมอ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าเฉลี่ยการบวมน้ำอยู่ในช่วงร้อยละ 613.10-774.73 โดยมีเฉพาะแต่ละองค์ประกอบหลักเท่านั้นที่มีผลต่อค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าในทุกอัตราส่วนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากมีค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากการทดสอบมากกว่าร้อยละ 80 ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังต่อไป

คำสำคัญ: โครงเลี้ยงเซลล์, การหล่อแบบเทป, เจลาติน, ไฟโบรอิน, ไคโตซาน, การออกแบบการทดลองส่วนผสม, วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

Abstract

The objective of this research was to fabricate scaffold for skin tissue engineering using tape casting technique, which were suitable for fabricate skin scaffold, which can control the thickness of the specimen. Experimental design based on mixture design was employed to determine suitable compositions which were able to tape cast and effects of components on water swelling of the scaffolds, consisting of gelatin, fibroin, and chitosan. From prelimary study, it was found that the slurry compositions with fibroin less than 40% had a tape castibility. According to the 7 compositions selected, the tapes were smooth and had uniform thickness. The average swelling ability of sample was 613.10-774.73%, it was found that the slurry components in scaffold significantly contribute to water swelling and It is also biocompatible because the cell survival rate was over 80 percent in 24 hours. These properties of the experiment samples are suitable for application of skin tissue engineering.

Keywords: scaffold, tape casting, gelatin, fibroin, chitosan, mixture design, skin tissue engineering

1. บทนำ

มาตรฐานในการรักษาแผลเปิดขนาดใหญ่ในปัจจุบันยังคงใช้การปลูกถ่ายผิวหนังของตนเองเพื่อแทนที่ส่วนที่ได้รับบาดเจ็บ แต่ก็มีปัญหาที่สำคัญคือการใช้การปลูกถ่ายผิวหนังของตนเองไม่สามารถทำได้หมด เนื่องจากพื้นที่ผิวหนังที่จะนำมาใช้ไม่เพียงพอ [1] ดังนั้นจึงมีการพัฒนาทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เพื่อสร้างวัสดุทดแทนชีวภาพโดยอาศัยการเกิดขึ้นใหม่ของเซลล์เข้าไปในแม่แบบที่เรียกว่า โครงเลี้ยง-เซลล์ (scaffold) ที่จะทำหน้าที่เป็นโครงร่างให้เซลล์ยึดเกาะ เพิ่มจำนวน จนกระทั่งเนื้อเยื่อฟื้นสภาพและเกิดขึ้นใหม่อย่างสมบูรณ์ [2] โดยชีววัสดุ (biomaterial) ที่จะนำมาผลิตโครง-เลี้ยงเซลล์ผิวหนังควรมีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการทำหน้าที่ของเซลล์ ร่างกายไม่มีปฏิกิริยาต่อต้าน และสามารถย่อยสลายได้ ซึ่งวัสดุที่น่าสนใจและเหมาะต่อการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง ได้แก่ เจลาติน (gelatin) เนื่องจากมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อผิวหนังและสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ [3] ผนวกกับไฟโบรอิน ซึ่งเป็นโปรตีนเส้นใยที่จะช่วยให้เซลล์ยึดเกาะบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีขึ้น [4] และไคโตซาน (chitosan) ที่มีคุณสมบัติช่วยในการดูดซับ เร่งการสมานแผล รวมทั้งป้องกันการติดเชื้อและการสูญเสียน้ำได้ [5]

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีการขึ้นรูปโครงเลี้ยง-เซลล์เชิงประกอบสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยใช้ไฟโบรอิน ไคโตซาน และไฮดรอกซีอะพาไทต์ ชิ้นงานที่ได้มีการบวมน้ำและค่าความพรุนสูง และชิ้นงานไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ [6] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและพัฒนาแผ่นฟิล์มจากไคโตซานและไฟโบรอิน เพื่อประยุกต์ใช้ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง ผลที่ได้ยืนยันให้เห็นว่าวัสดุชีวภาพที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังและสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ [7] อย่างไรก็ตามงานวิจัยโดยส่วนใหญ่จะขึ้นรูปด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง [6] หรือขึ้นรูปด้วยการหล่อสารละลายลงในแม่แบบให้มีรูปร่างและความหนาตามต้องการ [7,8] แต่มีข้อจำกัดคืออาจทำให้ได้ชิ้นงานที่มีความหนาไม่สม่ำเสมอและผิวหน้าไม่เรียบเท่าที่ควร ดังนั้นเทคนิคการหล่อแบบเทปจึงเป็นวิธีการขึ้นรูปที่น่าสนใจ โดยจะทำให้ได้ชิ้นงานที่มีลักษณะเป็นแผ่นบาง สามารถควบคุมความหนาให้สม่ำเสมอตลอดช่วงความยาวของชิ้นงานได้ไม่จำกัด และมีความเรียบ [9] ซึ่งเหมาะสำหรับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาอัตราส่วนของส่วนผสมระหว่างเจลาติน ไฟโบรอิน และไคโตซาน ที่สามารถขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการหล่อแบบเทป โดยใช้หลักการออกแบบการทดลองส่วนผสม เพื่อหาอัตราส่วนที่สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ และหาค่าการบวมน้ำจากส่วนผสมดังกล่าว เนื่องจากเป็นคุณสมบัติสำคัญที่จะช่วยตรวจสอบถึงการแพร่กระจายของของเหลวและการขนส่งสารอาหารเมื่อถูกนำไปใช้ฟื้นฟูเนื้อเยื่อภายในร่างกาย [10] อีกทั้งทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ด้วย เพื่อนำประโยชน์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังต่อไป

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมวัสดุที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์

2.1.1 การเตรียมเจลาติน

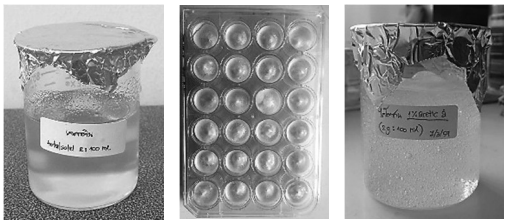
งานวิจัยนี้ใช้ผงเจลาตินสำเร็จรูป (จากบริษัท ยูเนี่ยน- ชายน์ จำกัด) ซึ่งเตรียมโดยทำการละลายผงเจลาตินในกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร แล้วคนผสมโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันดังรูปที่ 1

2.1.2 การสังเคราะห์ไฟโบรอิน

งานวิจัยนี้ใช้รังไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ จ.เชียงใหม่ โดยสังเคราะห์ไฟโบรอินจากรังไหมผ่านกระบวนการทางเคมี ด้วยการตัดรังไหมเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่อุณหภูมิ 98-100 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดเซริซิน (Sericin) หรือกาวไหมออก แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไฟโบรอินที่ได้มาละลายในตัวทำละลาย (ternary solvent) ซึ่งเตรียมจากแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) ผสมกับน้ำปราศจากไอออน (DI water) และเอทานอล (Ethanol) หลังจากนั้นจึงทำการกำจัดสารละลายส่วนเกินออกด้วยกระบวนการไดอะไลซิส (Dialysis) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนได้เป็นไฟโบรอินที่ต้องการ [11] ดังรูปที่ 1 และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างและองค์ประกอบโมเลกุลของไฟโบรอินที่ได้ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ thermo รุ่น Nicolet 6700

2.1.3 การเตรียมไคโตซาน

งานวิจัยนี้ใช้ไคโตซานสำเร็จรูปที่สกัดได้จากกระดองหมึก (จากบริษัท ยูเนี่ยนชายน์ จำกัด) ซึ่งเตรียมโดยนำไปแช่ในกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ทิ้งไว้ 3 วันจนละลายทั้งหมดดังรูปที่ 1



(a) (b) (c)

รูปที่ 1 องค์ประกอบที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์
(a) เจลาติน (b) ไฟโบรอิน (c) ไคโตซาน

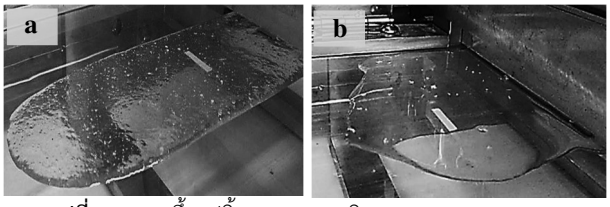
2.2 การกำหนดปัจจัยสำหรับการออกแบบส่วนผสม

งานวิจัยนี้ทำการหาอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังโดยใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองส่วนผสมแบบซิมเพล็กซ์เซนทรอยด์มาใช้เป็นเครื่องมือหลักในการวิเคราะห์ทางสถิติ ดังตารางที่ 1 เนื่องจากผู้วิจัยต้องการศึกษาจุดกึ่งกลางของแต่ละตัวแปรที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน ซึ่งมีมากกว่า 2 ตัวแปร โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงปัจจัยหรือองค์ประกอบ 3 ชนิดที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ เจลาติน (GE) ไฟโบรอิน (FB) และไคโตซาน (CS) โดยในการทดลองจะใช้วัสดุแต่ละชนิดในล็อตเดียวกัน และในการขึ้นรูปแต่ละครั้งจะใช้วัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์หรือเตรียมภายในวันเดียวกัน เพื่อเป็นการกำจัดปัจจัยรบกวนอื่นและทำให้ความคลาดเคลื่อนของการทดลองเกิดขึ้นน้อยที่สุด

ตารางที่ 1 อัตราส่วนผสมที่ได้จากเทคนิคการออกแบบการทดลองส่วนผสมแบบซิมเพล็กซ์เซนทรอยด์ดีไซน์

Ratio	Gelatin	Fibroin	Chitosan
1	1.000	0.000	0.000
2	0.000	1.000	0.000
3	0.000	0.000	1.000
4	0.500	0.500	0.000
5	0.500	0.000	0.500
6	0.000	0.500	0.500
7	0.333	0.333	0.333
8	0.667	0.167	0.167
9	0.167	0.667	0.167
10	0.167	0.167	0.667

จากการใช้หลักการออกแบบการทดลองส่วนผสมในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนังดังตาราง 1 ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะสูตรอัตราส่วนที่ 3, 5, 7, 8 และ 10 เท่านั้นที่สามารถขึ้นรูปได้ด้วยวิธีการหล่อขึ้นรูปแบบเทปดังรูปที่ 2 ซึ่งเป็นสูตรที่มีสัดส่วนไฟโบรอินต่ำกว่าร้อยละ 40 เนื่องจากมีความหนืดที่เหมาะสมต่อการขึ้นรูปด้วยวิธีการดังกล่าว โดยมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและมีการรักษาไว้ซึ่งรูปร่างที่เหมาะสม ส่วนสูตรที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินสูงกว่าร้อยละ 40 ไม่สามารถขึ้นรูปให้เป็นโครงสร้างชิ้นงานที่ต้องการได้ เนื่องจากทำให้ได้สเลอรี่ที่ค่อนข้างเหลว มีความหนืดน้อย ไม่สามารถเกาะรวมกันเป็นโครงสร้างได้ดังรูปที่ 2 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงกำหนดอัตราส่วนใหม่โดยกำหนดสัดส่วนของเจลาตินและไคโตซานให้ในช่วงร้อยละ 30-70 แล้วปรับลดสัดส่วนของไฟโบรอินให้อยู่ในช่วงร้อยละ 0-40 จะได้อัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 2 โดยใช้หลักการออกแบบการทดลองส่วนผสมแบบเอ็กซ์ทรีมเวอร์ทีส



รูปที่ 2 ผลการขึ้นรูปชิ้นงานจากเทคนิคการออกแบบการทดลองส่วนผสมแบบซิมเพล็กซ์เซนทรอยด์
(a) อัตราส่วนที่สามารถขึ้นรูปได้ (b) อัตราส่วนที่ไม่สามารถขึ้นรูปได้

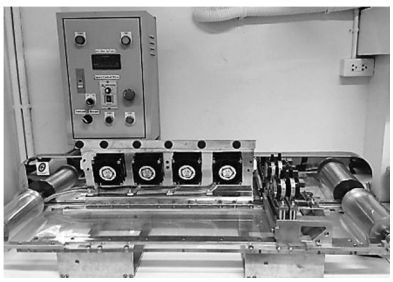
ตารางที่ 2 อัตราส่วนผสมที่ได้จากเทคนิคการออกแบบการทดลองส่วนผสมแบบเอ็กซ์ทรีมเวอร์ทีส

Ratio	Gelatin	Fibroin	Chitosan
1	0.300	0.000	0.700
2	0.700	0.000	0.300
3	0.300	0.400	0.300
4	0.433	0.133	0.433
5	0.367	0.067	0.567
6	0.567	0.067	0.367
7	0.367	0.267	0.367

2.3 กระบวนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้อัตราส่วนผสมตามที่ได้ออกแบบการทดลองเบื้องต้นไว้ในขั้นตอนที่ 2.2 ซึ่งก่อนกระบวนการขึ้นรูปต้องทำการละลายองค์ประกอบทั้ง 3 ชนิดให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารกลูตารอลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร [12] เพื่อทำหน้าที่เป็นสารยึดเหนี่ยวโดยจะเป็นตัวประสาน (cross linking) กับโครงสร้างของโปรตีน [6] แล้วขึ้นรูปด้วยเครื่องหล่อขึ้นรูปแบบเทปดังรูปที่ 3 โดยใช้ความเร็วในการขึ้นรูปเท่ากับ 4.5 มิลลิเมตรต่อวินาที และกำหนดความสูงของใบมีดเท่ากับ 1.5 มิลลิเมตร หลังจาก

การขึ้นรูปปล่อยให้แผ่นเทปแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำชิ้นงานไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้นและทำให้ชิ้นงานแห้งมากขึ้น



รูปที่ 3 เครื่องหล่อขึ้นรูปแบบเทป

2.4 การทดสอบการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

การบวมน้ำ (water swelling) ของโครงเลี้ยงเซลล์เป็นคุณสมบัติที่จะตรวจสอบถึงการแพร่กระจายของน้ำหรือของเหลวภายในโครงเลี้ยงเซลล์ การทดสอบทำได้โดยชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของชิ้นงาน บันทึกเป็น W_0 แช่ชิ้นงานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่สภาวะอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง บันทึกค่าเป็น W_w แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ [13] จากสมการที่ (1)

$$water\ swelling\ (\%) = \frac{W_w - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

2.5 การวิเคราะห์ผลการทดลองและทดสอบเพื่อยืนยันผล

หลังจากได้ค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แล้ว ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Minitab เพื่อหาผลขององค์ประกอบที่มีต่อการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

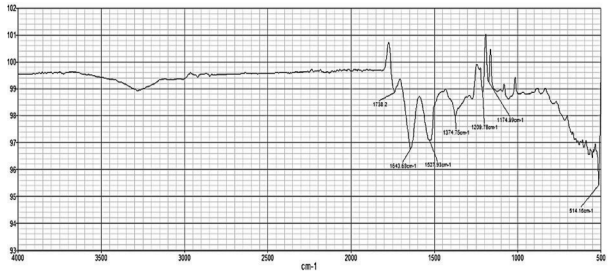
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) จะศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ไฟโบบลาสต์ (HDFn) ที่มีต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งดัดแปลงวิธีการทดสอบจากงานวิจัยของ [6] โดยจะวัดการตอบสนองด้วยการใช้สีสังเคราะห์ MTT วิธีทดสอบเริ่มจากการใส่โครงเลี้ยงเซลล์ขนาด 1×1 เซนติเมตร ลงไปในหลุมเลี้ยงเซลล์ (well plate) จากนั้นใส่เซลล์ไฟโบบลาสต์และอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย MTT 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการสร้างผลึกขึ้นในเซลล์ เมื่อครบกำหนดจึงดูดอาหารและสาร MTT ออกจากหลุมแล้วเติมสารละลายไดเม็ทธิลซัลโฟไซด์ (Dimethyl Sulfoxide; DMSO) ลงไปหลุมละ 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายผลึกและนำไปวัดค่าด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 540 และ 630 นาโนเมตร จากนั้นจึงนำผลที่ได้มาคำนวณเพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจากสมการที่ (2) หากค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ได้มีค่ามากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับตัวควบคุม (control) คือส่วนที่ไม่มีโครงเลี้ยงเซลล์หรือมีเฉพาะเซลล์ที่ทดสอบเท่านั้น แสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยอ้างอิงจากมาตรฐาน ASTM F895-11 [14]

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{OD\ of\ treated\ cell}{OD\ of\ control\ cell} \times 100 \quad (2)$$

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 โครงสร้างและองค์ประกอบโมเลกุลของไฟโบรอิน

จากการวิเคราะห์โครงสร้างและองค์ประกอบโมเลกุลของตัวอย่างไฟโบรอินที่สกัดได้ด้วยเทคนิค FTIR โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในช่วงอินฟราเรด (infrared; IR) จากรูปที่ 4 พบว่าไฟโบรอินที่สกัดได้มีตำแหน่งของพีคที่ปรากฏบนสเปคตรัมทั้ง 2 ตำแหน่ง สอดคล้องกับเฟสองค์ประกอบของกรดอะมิโนในไฟโบรอิน คืออยู่ในช่วงความถี่ 1700-1500 ซม$^{-1}$ (amide I) และ 1600-1500 ซม$^{-1}$ (amide II) [15] ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าไฟโบรอินที่ทำการสังเคราะห์จากรังไหมนี้เป็นไฟโบรอินจริง

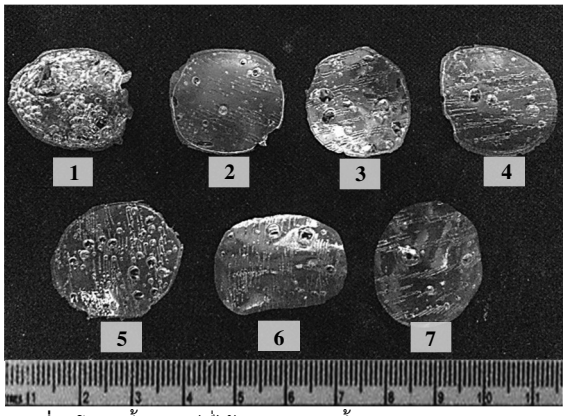


รูปที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของไฟโบรอินจากรังไหม

3.2 ผลการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองส่วนผสมแบบเอ็กซ์ทรีมเวอร์ทีสมาเป็นเครื่องมือเพื่อกำหนดอัตราส่วนขององค์ประกอบในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกระบวนการหล่อขึ้นรูปแบบเทป พบว่าทุกอัตราส่วนสามารถขึ้นรูปได้ เนื่องจากมีการปรับลดอัตราส่วนของไฟโบรอินให้อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งมีเจลาตินหรือไคโตซานที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของโครงเลี้ยงเซลล์ จากการสังเกตลักษณะพบว่าในทุกอัตราส่วนมีความหนืดที่เหมาะสมและทำให้ได้ชิ้นงาน

ตามที่ต้องการ โดยหลังจากนำไปอบให้แห้ง ทุกอัตราส่วนมีลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มบางเรียบ ความหนาประมาณ 0.1-0.2 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 5 อย่างไรก็ดีเมื่อนำไปแช่ในน้ำปราศจากไอออน (DI water) จะทำให้ชิ้นงานเปลี่ยนแปลงลักษณะเป็นแผ่นเจล เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง



รูปที่ 5 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้หลังจากการขึ้นรูปแต่ละอัตราส่วนผสม

3.3 การบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

จากการทดสอบการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำการขึ้นรูปมาแช่ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป โดยทำการทดสอบอัตราส่วนละ 6 ครั้ง ทั้งหมด 2 ซ้ำ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีค่าอัตราการบวมน้ำค่อนข้างสูง ดังตารางที่ 3 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 602.54-785.96 ซึ่งเป็นค่าที่พบอยู่ในช่วงเดียวกับงานวิจัยใกล้เคียง [10] โดยถือว่าเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง ซึ่งจะทำให้เกิดการแพร่กระจายของสารอาหารหรือแร่ธาตุได้ดีภายในโครงเลี้ยงเซลล์และทำให้ไม่เกิดการสะสมของสารที่หลั่งภายในบาดแผล ส่งผลให้เกิดการฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่เสียหายได้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

Ratio	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
1	763.51±36.66	785.96±34.02
2	623.66±27.96	602.54±32.89
3	675.02±21.31	638.47±23.66
4	686.76±36.86	639.22±6.39
5	757.72±37.15	747.99±39.34
6	636.31±20.92	625.51±11.88
7	657.43±30.89	634.79±27.06

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์แสดงดังตารางที่ 4 จากการวิเคราะห์ผลจะพบว่าผลกระทบหลักของแต่ละองค์ประกอบจะมีผลต่อค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์อยู่แล้ว (แสดงเป็นสัญลักษณ์ *) ส่วนอัตราส่วนผสมระหว่าง 2 และ 3 องค์ประกอบ พบว่าไม่มีผลต่อค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value>0.05) จึงทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าผลตอบอีกครั้ง โดยเลือกเฉพาะเทอมที่มีผลต่อการทดลอง พบว่ามีเฉพาะผลกระทบหลักของแต่ละองค์ประกอบเท่านั้นที่มีผลต่อค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังตารางที่ 5 ซึ่งไคโตซานมีผลต่อค่าการบวมน้ำมากกว่าองค์ประกอบอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tarun และคณะในปี 2016 [10] ส่วนสูตรที่มีสัดส่วนเจลาตินมากก็จะส่งผลให้มีค่าการบวมน้ำต่ำ อีกทั้งชิ้นงานที่ได้มีความแข็งแรงน้อยกว่า ดังนั้นไคโตซานจึงเป็นองค์ประกอบที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับ โครงเลี้ยงเซลล์ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suwitchaya ในปี 2016 [11]

จากผลการวิเคราะห์พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R-Square) เท่ากับร้อยละ 87.18 แสดงว่าแบบจำลองมีความเหมาะสม โดยสามารถสร้างสมการทำนายผลอัตราการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ดังสมการที่ (3)

$$Water\ swelling\ (\%) = 470.2GE + 572.7FB + 915.4CS \quad (3)$$

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์

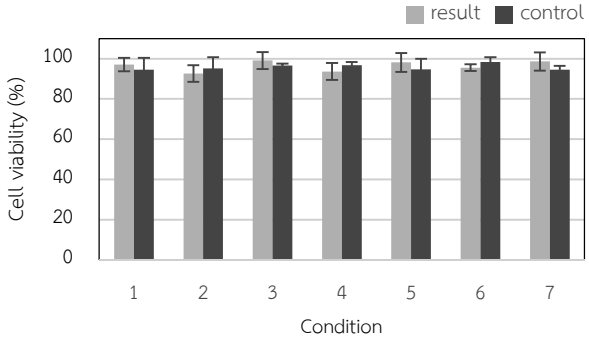
Term	Coef	T	P
GE	137	*	*
FB	-403	*	*
CS	542	*	*
GE* FB	2,662	0.35	0.734
GE* CS	1,687	1.34	0.223
FB* CS	5,746	0.76	0.470
GE* FB* CS	-15,189	-0.69	0.515
S = 19.4017	R-Sq = 94.60%	R-Sq(adj) = 89.97%	

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ ANOVA ค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เฉพาะเทอมที่มีผลต่อการทดลอง

Term	Coef	T	P
GE	470.2	*	*
FB	572.7	*	*
CS	915.4	*	*
S = 21.9341	R-Sq = 89.15%	R-Sq(adj) = 87.18%	

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำโครงเลี้ยงเซลล์ใส่ลงไปในหลุมเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ไฟโบบลาสต์และอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากการทดสอบเป็นดังรูปที่ 6 โดยจะพบว่าทุกอัตราส่วนมีค่ามากกว่าร้อยละ 80 แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกอัตราส่วนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์จึงสามารถนำไปใช้ในร่างกายเพื่อช่วยในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อผิวหนังที่เสียหายได้



รูปที่ 6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์

9. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการหล่อแบบเทป โดยใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองส่วนผสมมาใช้เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ส่วนผสมจากเจลาติน ไฟโบรอิน และไคโตซาน จากการขึ้นรูปพบว่าทั้ง 7 อัตราส่วนผสมสามารถขึ้นรูปด้วยกระบวนการขึ้นดังกล่าวได้ ทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นเรียบบาง ซึ่งจากการวิเคราะห์คุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์และวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่ามีเฉพาะผลกระทบหลักของเจลาติน ไฟโบรอิน และไคโตซานเท่านั้นที่มีผลต่อค่าการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 602.54-785.96 โดยถือว่าเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของโครง-เลี้ยงเซลล์ผิวหนัง มีศักยภาพในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่เสียหายได้ อีกทั้งพบได้ว่าในทุกอัตราส่วนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังอาจจำเป็นต้องทำการทดสอบคุณสมบัติอื่นๆเพิ่มเติมต่อไป ทั้งคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางชีวภาพ เพื่อหาอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมสำหรับการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ชีววัสดุทดแทนผิวหนังที่สามารถใช้ในเชิงการแพทย์ได้

10. เอกสารอ้างอิง

[1] Thana Chueabandit. (2013). Advance Skin Replacement. *Srinagarind Medical J,* 28, 24-31.

[2] Phichaiutkrit, W., Chuwatthanasaran, W., Damrongrungrueang, T. (2015). The Effects of Porogen on Physical Properties of Fibroin-based 3-D Scaffolds from Mixed Strain of Thai Silk, Nangnoi Si Sa Ket 1 and Mor. *RSU National Research Conference, 159-168.*

[3] Agarwala, T., Narayana, R., Majia, S., Beheraa, S., Kulanthaivelb, S., Maitia, T.K., Banerjeeb, I., Palb, K., Giric, S. (2016). Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue-engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1499-1506.

[4] Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2011). Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 85, 325–333.

[5] Liu, H., Mao, J., Yao, K., Yang, G., Cui, L., Cao, Y. (2004). A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Science,* 15, 25–40.

[6] Atitaya Oonjai. (2016). *Development of Porous Bone Substitute by Freeze Dry Method.* (Master's Thesis, Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Chiangmai University).

[7] Luangbudnark, W., Viyoch, J., Laupattarakasem, W., Surakunprapha, P., Laupattarakasem, P. (2012). Properties and biocompatibility of chitosan and silk fibroin blend films for application in skin tissue engineering. *The Scientific World Journal, 2012.* doi: 10.1100/ 2012/697201

[8] Ong-chiari, W., Srisuwan, Y., Simcheur, W., Srihanam, P. (2009). Morphology, Secondary Structure and Thermal Properties of Silk Fibroin/Gelatin Blend Film. *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 12 (23), 1526-1530.

[9] Chanyapat Khamkasem. (2013). *Optimization of Hydroxyapatite Forming by Tape Casting.* (Master's Thesis, Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Chiangmai University).

[10] Tarun, A., Rajan, N., Somnath, M., Shubhanath, B., Senthilguru, K., Tapas, K.M., Indranil B., Kunal, P., Supratim, Giric. (2016). Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering

applications. *International Journal of Biological Macromolecules,* 93, 1499-1506.

[11] Suwitchaya Panthawang. (2016). Fabrication and Characterization of Porous Scaffold for Skin Substitute. *Proceeding of Industrial Engineering Conference.* Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University.

[12] Sun, H.W., Feigal, R.J., Messer, H.H. (1990). Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration. *Journal of Pediatric dentist*, 12, 303-307.

[13] Wattanutchariya, W., Changkowchai, W. (2014). Characterization of Porous Scaffold from Chitosan-Gelatin/Hydroxyapatite for Bone Grafting. *Engineers and Computer Scientists Journal,* 2210(1), 1073-1077.

[14] ASTM F 895-11. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity. Pennsylvania: American Society for Testing and Materials (ASTM); 2011.

[15] Adalı, T., and Uncu, M. (2016). Silk fibroin as a non-thrombogenic biomaterial. *International Journal of Biological Macromolecules,* 90, 11-19. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.088