



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาไฟโบรอินเพื่อเป็นโครงร่างให้เซลล์ยึดเกาะ”

(Development of aqueous-derived biomaterial scaffolds from fibroin)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรี ตียะบุญชัย และคณะ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. มาโนชญ์ สุธีรพัฒนานนท์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ไฟโบรอิน ขอขอบคุณ พญ.สุรชาติ พงษ์เจริญ ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในเรื่องเทคนิค immunohistochemistry และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ทำการวิจัย และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้คำปรึกษาพร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินโครงการวิจัย และหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยในอนาคต

ผศ.ดร.วรี ดิยะบุญชัย

ผู้ดำเนินการวิจัย

มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาโครงร่างรูพรุนสามมิติ จากโปรตีนไหมไฟโบรอิน สำหรับการนำไปใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยเตรียมโครงร่างรูพรุนสามมิติด้วยเทคนิค freeze drying จำนวน 2 ชนิดคือ fibroin scaffold (SF) และ fibroin/collagen scaffold (SF/C) จากนั้นศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโครงร่างรูพรุนสามมิติ ได้แก่ รูปร่างลักษณะ ขนาดรูพรุน ความเป็นรูพรุน ความสามารถในการดูดซับน้ำ ความแข็งแรง และความสามารถในการย่อยสลายได้ในร่างกาย พบว่า โครงร่างรูพรุนสามมิติที่เตรียมได้มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ มีความเป็นรูพรุนสูง และมีรูพรุนภายในโครงร่างที่เชื่อมติดกัน (interconnected pore) รูพรุนมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 65-145 ไมครอน โครงร่างรูพรุนสามมิติ ที่เตรียมจาก SF พบว่าเมื่อปริมาณ SF เพิ่มขึ้น โครงร่างรูพรุนสามมิติที่เตรียมได้ จะมีขนาดเฉลี่ยรูพรุนเล็กลง แต่ความเป็นรูพรุนเพิ่มมากขึ้น และมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง SF และ SF/C พบว่า SF/C มีความแข็งแรงมากกว่า SF นอกจากนี้ยังพบว่าโครงร่างรูพรุนสามมิติที่ผ่านการแช่ใน methanol จะทนต่อน้ำ และมีความแข็งแรงมากกว่า โครงร่างรูพรุนสามมิติที่ไม่ได้ผ่านการแช่ใน methanol เนื่องจาก methanol ทำให้โครงสร้างของไฟโบรอิน เปลี่ยนจาก random coil เป็น β -sheet โครงร่างรูพรุนสามมิติทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดีโดยพบว่ามีค่าการดูดซับน้ำสูงถึงร้อยละ 90 และพบว่าสามารถควบคุมอัตราเร็วในการสลายตัวของโครงร่างรูพรุนสามมิติได้โดยการควบคุมปริมาณของ ไฟโบรอิน ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำโครงร่างรูพรุนสามมิติที่เตรียมขึ้นไปใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ได้ทดลองโดยการแยกเซลล์ chondrocyte จากหนูขาวและนำไปเลี้ยงในโครงร่างรูพรุนสามมิติที่เตรียมจาก SF และ SF/C จากนั้นศึกษาความสามารถในการเกาะติด การเจริญเติบโต รูปร่างของเซลล์ และการสร้าง extracellular matrix (ECM) ด้วยวิธี MTT assay กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องก ราด และ immunohistochemistry ผลการศึกษาพบว่า chondrocyte ที่เลี้ยงใน SF/C สามารถเกาะติดได้ดี เจริญเติบโต และสร้าง ECM ได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงใน SF โดย chondrocyte ที่พบที่ผิวหน้าโครงร่างรูพรุนสามมิติมีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (รูปร่างแบน) ส่วน chondrocyte ที่พบที่ภายในโครงร่างรูพรุนมีลักษณะ chondrocyte (รูปร่างกลม) และพบว่าโครงร่างรูพรุนสามมิติทั้ง 2 ชนิดมีความปลอดภัยต่อเซลล์ ดังนั้น โครงร่างรูพรุนสามมิติที่พัฒนาขึ้นจึงมีแนวโน้มสูงที่จะใช้เป็นวัสดุสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

คำสำคัญ โครงร่างรูพรุนสามมิติ ไฟโบรอิน วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน คอลลาเจน

Abstract

This study aimed to construct 3-dimensional scaffold from silk fibroin and investigated the feasibility of prepared scaffolds for cartilage tissue engineering application. Three dimensional scaffolds were prepared from silk fibroin (SF) and silk fibroin blended with collagen (SF/C) by a freeze drying technique. Physico-chemical characterization of these scaffolds including morphologies, pore size, porosities, structures, water absorption capacities, mechanical properties and degradation behaviors were studied. The morphology of prepared scaffolds had sponge forms and exhibited highly porosity with interconnected pores. Average pore sizes of these scaffolds were ranging from 65-145 μm . The scaffold prepared with higher amount of SF and SF/C showed more porosity and higher compressive modulus. Structural analysis indicated that scaffolds with methanol treatment became more water-stable and stronger than those without methanol treatment as a result from silk fibroin conformational change from random coil to β -sheet. All of scaffolds had capable of water absorption about 90% and degradation behavior of these scaffolds can be operated by controlling amount of fibroin. To investigate the feasibility of the scaffolds for tissue engineering application, articular chondrocytes isolated from rat and were seeded onto SF and SF/C scaffolds. Cell attachment, proliferation, morphological changes and extracellular matrix (ECM) synthesis were studied by MTT assay, scanning electron microcopy and immunohistochemistry. The results indicated that both scaffolds were biocompatible. Nevertheless, chondrocytes cultivated in the SF/C scaffold showed higher cell attachment, proliferation, and synthesis of ECM than those cultivated in the SF scaffolds. Chondrocyte morphology on the scaffold surface showed a fibroblast-like cell (flat shape), while chondrocyte growth deeper in the construct showed a chondrocyte-like morphology (round shape). Thus, the developed SF/C scaffold showed high potential as a desirable biomaterial for cartilage tissue engineering

Keywords: scaffold, cartilage tissue engineering, fibroin, collagen

Exclusive summary

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (articular cartilage) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ประกอบด้วยเซลล์ chondrocytes ที่อยู่ใน extracellular matrix (ECM) โดยมี collagen type II และ aggrecan เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ค้ำจุน เมื่อเนื้อเยื่อบริเวณกระดูกอ่อนได้รับบาดเจ็บ จะมีการซ่อมแซมตัวเองได้น้อยมากเนื่องจากเป็นบริเวณที่ไม่มีระบบเลือดไปหล่อเลี้ยง อีกทั้งเซลล์ chondrocytes มีจำนวนจำกัด และไม่สามารถเคลื่อนที่ไปซ่อมแซมยังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บได้ ดังนั้นการรักษาจึงทำได้โดยการผ่าตัด และการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัด เช่น การขาดแคลนเนื้อเยื่อ การปฏิเสธเนื้อเยื่อของผู้ให้ และอาจเกิดการติดเชื้อจากเนื้อเยื่อของผู้ให้ นอกจากการรักษาโดยการผ่าตัดและปลูกถ่ายเนื้อเยื่อแล้ว วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีอีกทางหนึ่งที่น่าสนใจในการที่จะช่วยทดแทนซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่สูญเสียไป โดยการนำเซลล์กระดูกอ่อนจากผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนให้มากเพียงพอ และทำการเพาะเลี้ยงบนวัสดุโครงร่าง 3 มิติ (scaffolds) ก่อนที่จะนำไปปลูกถ่ายเนื้อเยื่อเข้าสู่ร่างกาย

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกใช้ไฟโบรอิน (SF) และไฟโบรอินผสมคอลลาเจน (SF/C) ในการเตรียมเป็นโครงร่างรูพรุน 3 มิติ ด้วยเทคนิค freeze drying โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยในการผลิตต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของโครงร่างรูพรุน 3 มิติ ไฟโบรอิน และคอลลาเจนเป็นวัสดุธรรมชาติที่มีมากและสามารถผลิตได้เองในประเทศไทย มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับร่างกาย มีความปลอดภัยสูงไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย จึงเหมาะสมที่จะนำมาเตรียมเป็นโครงร่างรูพรุน 3 มิติที่ทำให้เซลล์ยึดเกาะ

จากการศึกษาพบว่า SF และ SF/C scaffolds มีลักษณะเป็นก้อนนุ่มสีขาวคล้ายฟองน้ำ (sponge) แต่มีความเปราะแตกง่ายและไม่คงตัวในน้ำ เมื่อแช่ในเมทานอล (methanol treatment) สามารถเหนียวน้ำให้ scaffolds มีความเหนียวขึ้นและคงตัวในน้ำได้ดีทุกตำรับ เนื่องจาก methanol สามารถเหนียวน้ำให้ fibroin เปลี่ยน conformation จาก amorphous ไปเป็น crystalline

จากการศึกษาพบว่า SF และ SF/C scaffolds มีลักษณะเป็นก้อนนุ่มสีขาวคล้ายฟองน้ำ (sponge) แต่มีความเปราะแตกง่ายและไม่คงตัวในน้ำ เมื่อแช่ในเมทานอล (methanol treatment) สามารถเหนียวน้ำให้ scaffolds มีความเหนียวขึ้นและคงตัวในน้ำได้ดีทุกตำรับ เนื่องจาก methanol สามารถเหนียวน้ำให้ fibroin เปลี่ยน conformation จาก amorphous ไปเป็น crystalline

จากการศึกษารูปร่างลักษณะพื้นผิว และขนาดของรูพรุนด้วยภาพถ่าย SEM พบว่า SF scaffolds มีลักษณะพื้นผิวเรียบและผนังบาง เมื่อปริมาณของ SF ในตำรับเพิ่มมากขึ้น พบว่า scaffolds มีขนาดรูพรุนลดลง การกระจายของรูพรุนสม่ำเสมอ มากขึ้น และมี interconnected pore มากขึ้น ส่งผลให้ scaffold สามารถทนต่อแรงอัดได้มากขึ้นด้วย โดยพบว่า scaffolds ที่เตรียมจาก fibroin 1%w/v มีลักษณะของรูพรุนที่เป็นแผ่น มีขนาดรูพรุน ~ 148 μm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ fibroin เป็น 2, 4 และ 6% พบว่า scaffolds ที่ได้

มีการกระจายของรูพรุนสม่ำเสมอและมีขนาดรูพรุน $\sim 70 \mu\text{m}$ ส่วนภาพถ่าย SEM ของ SF/C scaffold พบว่ามีลักษณะพื้นผิวที่หนากว่าและขรุขระมากกว่า SF scaffold แต่มีรูพรุนค่อนข้างน้อยกว่า SF scaffold และมีขนาดรูพรุน $\sim 90 \mu\text{m}$ เมื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของ scaffold พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ fibroin เพิ่มขึ้นจาก 1% จนถึง 6%w/v เปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของ scaffolds ก็จะเพิ่มมากขึ้นจาก 62% จนถึง 89% ในขณะที่ SF/C scaffolds มีความเป็นรูพรุนลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ คอลลาเจนในตำรับมากขึ้น นอกจากนี้พบว่า scaffolds ที่เตรียมได้ทุกตำรับสามารถดูดซับน้ำได้ดีมากกว่า 90% และเมื่อพิจารณาถึงความแข็งแรงของ scaffolds พบว่า SF scaffolds มีความสามารถทนต่อแรงอัดค่อนข้างต่ำซึ่งทำให้ scaffolds เปราะและแตกได้ง่าย เมื่อเพิ่ม collagen เข้าไปในตำรับสามารถเพิ่มความแข็งแรงให้กับ scaffolds ได้มากขึ้น

ในการศึกษาความสามารถในการเกาะติด การเจริญเติบโต และการสร้าง ECM ของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในโครงร่างที่ทำการพัฒนาขึ้น 2 สูตรตำรับ SF6 และ SF/25C นั้น ได้ใช้ primary chondrocytes ที่แยกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อของหนูขาว ทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ใน tissue culture flask พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเกิดการ dedifferentiate เปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะไปเป็น fibroblast-like cells มากขึ้น เมื่อมีการ subculture เพิ่มขึ้น นำเซลล์ใน passage ที่ 2 มาทำการเพาะเลี้ยงใน scaffolds ทั้ง 2 ตำรับ เป็นเวลา 28 วัน จากภาพถ่าย SEM และการย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะอยู่บน scaffolds ทั้ง 2 ตำรับได้ โดยเซลล์ส่วนใหญ่จะยึดเกาะได้ดีบริเวณผิวหน้าของชิ้น scaffolds และมีรูปร่างแบนเรียวยาวคล้ายกระสวย ที่น่าสนใจคือในตำรับ SF/25C สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและกระจายเข้าไปเจริญภายใน scaffolds ได้ดี อีกทั้งยังสามารถรักษารูปร่างของเซลล์แบบ spherical shape เหมือนกับเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนปกติได้อีกด้วย นอกจากนี้เมื่อทดสอบการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay เป็นเวลานาน 28 วัน พบว่า chondrocytes ที่เลี้ยงใน SF/C scaffolds สามารถเจริญมีชีวิตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่าที่เลี้ยงใน SF scaffolds ที่สำคัญยังพบว่า SF/25C scaffolds สามารถสนับสนุนให้เซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสร้าง extracellular matrix ทั้ง type II collagen และ aggrecan ได้ดีอีกด้วย ถึงแม้ว่าในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ได้มีการเติม growth factor ผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่า scaffolds ที่เตรียมขึ้นจากสารผสมไฟโบรอินตำรับ SF/25C มีประสิทธิภาพในการนำไปพัฒนาต่อสำหรับการใช้ประโยชน์ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยในอนาคต

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
แบบสรุปโครงการวิจัย (Exclusive summary)	iv
สารบัญเรื่อง	vi
สารบัญตาราง	viii
สารบัญรูป	ix
บทที่ 1 วิธีการทดลอง	1
1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์	1
2. วิธีการทดลอง	2
2.1. การเตรียม Fibroin scaffolds และ fibroin/collagen scaffolds ด้วยเทคนิค freeze drying	2
2.2. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของ scaffolds	3
2.2.1. การศึกษารูปร่างลักษณะ รูพรุน และการวัดขนาดของรูพรุนโดยใช้ Scanning electron microscope (SEM)	3
2.2.2. การศึกษาความเป็นรูพรุนของ scaffolds ด้วยวิธี liquid displacement	4
2.2.3. การศึกษาความแข็งแรงของ scaffolds โดยใช้เครื่อง Instron	4
2.2.4. การศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำของ scaffolds	4
2.2.5. การศึกษาโครงสร้างของ scaffolds โดยใช้ Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR)	5
2.2.6. การศึกษาโครงสร้างผลึกของ scaffolds โดยใช้ X-ray diffraction (XRD)	5
2.2.7. การศึกษาการสลายตัวของ scaffolds ในเอนไซม์ protease	5
2.3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของ scaffolds ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน	5
2.3.1. การแยกและการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน	5
2.3.2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนใน scaffolds	6
2.3.3. การศึกษาการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์บน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay	7
2.3.4. การศึกษาการยึดเกาะกระจายของเซลล์บน scaffold ด้วยเทคนิค Histochemistry	7
2.3.5. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์บน scaffolds ด้วย SEM	7

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.3.6. การศึกษาการสร้าง extracellular matrix ของเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry	8
บทที่ 2 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	10
1. การเตรียม fibroin และ fibroin/collagen scaffolds	10
2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ scaffolds	10
2.1. การศึกษารูปร่างลักษณะ รูพรุน และการวัดขนาดของรูพรุนด้วย SEM	10
2.2. การศึกษาความเป็นรูพรุนของ scaffolds ด้วยวิธี liquid displacement	13
2.3. การศึกษาความแข็งแรงของ scaffolds โดยใช้เครื่อง Instron	14
2.4. การศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำของ scaffolds	16
2.5. การศึกษาโครงสร้างของ scaffolds โดยใช้ FTIR	17
2.6. การศึกษาโครงสร้างผลึกของ scaffolds โดยใช้ XRD	18
2.7. การศึกษาการสลายตัวของ scaffolds ในเอนไซม์ protease	19
3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของ scaffolds ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน	21
3.1. การแยกและการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน	21
3.2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนใน scaffolds	21
3.3. การศึกษาการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์บน scaffolds ด้วย MTT assay	21
3.4. การศึกษาการยึดเกาะกระจายของเซลล์บน scaffold ด้วยเทคนิค Histochemistry	24
3.5. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์บน scaffolds ด้วย SEM	25
3.6. การศึกษาการสร้าง extracellular matrix ของเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry	28
บทที่ 3 สรุปผลการทดลอง	30
บทที่ 4 เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก	36
ภาคผนวก ข	37
ภาคผนวก ค	38
ภาคผนวก ง	39
ภาคผนวก จ	40

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับ fibroin scaffold เมื่อเตรียมที่ fibroin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	3
ตารางที่ 2 แสดงสูตรตำรับ fibroin/collagen scaffold เมื่อเตรียมจากสารผสมที่อัตราส่วนต่างๆ	3
ตารางที่ 3 ภาพถ่าย SEM และขนาดรูพรุนของ fibroin scaffolds สูตรตำรับต่างๆเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ fibroin	12
ตารางที่ 4 ภาพถ่าย SEM และขนาดรูพรุนของ fibroin/collagen scaffolds สูตรตำรับต่างๆเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ fibroin และ collagen	13
ตารางที่ 5 แสดงความเป็นรูพรุนของ fibroin และ fibroin /collagen scaffolds	14
ตารางที่ 6 แสดงความแข็งแรงของ fibroin และ fibroin /collagen scaffolds	15
ตารางที่ 7 แสดงความสามารถในการดูดซับน้ำของ fibroin และ fibroin /collagen scaffolds	16
ตารางที่ 8 เอกลักษณ์ทางเคมีที่ตรวจพบในตัวอย่างขึ้น scaffolds	18
ตารางที่ 9 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงใน Tissue culture flask	22
ตารางที่ 10 ชนิดของ scaffolds ที่ได้ทำการคัดเลือกเพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ	23
ตารางที่ 11 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญยึดเกาะบน SF6 scaffold	26
ตารางที่ 12 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญยึดเกาะบน SF/25C scaffold	27

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 X-ray diffraction pattern ของ scaffolds สูตรตำรับที่ทำการ treat และไม่ได้ treat ด้วย methanol	19
รูปที่ 2 ร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่ของ scaffolds สูตรตำรับต่างๆ ที่ทำการทดสอบใน สารละลาย PBS pH 7.4 (control group, N=2)	20
รูปที่ 3 ร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่ของ scaffolds สูตรตำรับต่างๆ ที่ทำการทดสอบใน สารละลาย PBS pH 7.4 ที่มีเอนไซม์ protease 1 unit (Treatment group, N=2)	20
รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของชิ้น scaffolds ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหลังจากบ่มในอาหารที่มี MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	24
รูปที่ 5 กราฟแสดงการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงบน scaffolds สูตรตำรับต่างๆ (N=3)	24
รูปที่ 6 ภาพถ่าย SEM แสดงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของ scaffolds หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน	28
รูปที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของหนู rat ที่ใช้เป็น positive control สำหรับการศึกษการสร้าง type II collagen และ Aggrecan	29
รูปที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการสร้าง type II collagen และ Aggrecanของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญอยู่ใน scaffolds	29

บทที่ 1

วิธีการทดลอง

1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1.1. สารเคมี

1. ไฟโบรอิน (สำนักเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา)
2. Collagen from bovine achilles' tendon (lyophilized, Fluka, USA)
3. Ethanol (Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
4. Anti-Aggrecan rabbit polyclonal antibody (, Millipore Corporation, MA, USA)
5. Anti-type II collagen mouse monoclonal antibody (COL2A1 (M2193): Sc-52658, Santa Cruze Biotechnology, Inc., California, USA)
6. Type II collagenase from *Clostridium histolyticum* (Lot. 077K8615, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)
7. Dulbecco's Modifide Eagle's Medium-low glucose (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)
8. Fetal bovine serum (Gibco, California, USA)
9. 0.25% trypsin EDTA (Gibco, California, USA)
10. 10,000 units/ml Penicillin and 10,000 µg/ml Streptomycin (Gibco, California, USA)
11. Sodium bicarbonate (Cell culture grade, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)
12. Thizolyl blue tetrazolium bromide (MTT, Ultra pure grade, Amresco[®], Ohio, USA.)
13. Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich GmbH, Germany)
14. Protease type XIV from *Streptomyces griseus* (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)
15. Xylene (Batch. 09090289, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
16. Paraplast Plus (McCormick Scientific, St. Louis, MO, USA)
17. Hematoxylin (Merk, Darmstadt, Germany)
18. Eosin (Merk, Darmstadt, Germany)
19. Tris (hydroxymethyl) amino-methane (Molecular biology grade, Research organics, INC., Ohio, USA)

1.2. สัตว์ทดลอง

1. หนูทดลองเพศผู้ สายพันธุ์ Spraque Dawley อายุ 4-8 สัปดาห์ (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล, นครปฐม)

1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. Freeze dryer (PowerDry LL3000, Heto, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)
2. pH meter (S20K, Mettler-Teledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland)
3. Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation, Saitama, Japan)
4. Incubator CO₂ (Forma series II, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)
5. Laminar flow hood (Heal force®, HF safe 1200/c+, Shanghai, China)
6. Instron-8872 (8872, Instron Corporation, MA, USA.)
7. X-ray diffractometer (X'Pert, Philips, EA Almelo, The Netherlands)
8. Scanning Electron Microscope (1455VP, LEO Electron microscopy Ltd., Cambridge, UK)
9. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (spectrum GX series, Perkin- Elmer, MA, USA)
10. เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Leica TP1020, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)
11. เครื่องทำพาราฟินบล็อก (Leica EG1160, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)
12. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ Microtome (Leica RM2235, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)
13. Microplate Spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Becman Coulter Inc., Fullerton, USA.)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียม Fibroin scaffolds และ fibroin/collagen scaffolds ด้วยเทคนิค freeze drying

2.1.1 การเตรียม fibroin (SF) scaffolds

1. เตรียมสารละลาย fibroin ที่ความเข้มข้น 1, 2, 4, และ 6% w/v โดยละลาย fibroin ใน Deionized water (DI) พร้อมทั้งปั่นด้วยความเร็วประมาณ 400- 500 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. วัด pH ของสารละลาย จากนั้นจึงทำการเทใส่ 24-well polystyrene plate และนำแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C อย่างน้อย 12 ชม. แล้วจึงนำไปประเหยแห้งด้วยวิธี Freeze drying เป็นเวลา 3 วัน
3. เมื่อได้ชิ้น scaffolds แล้ว นำมาแช่ใน methanol เป็นเวลา 30 นาที และระเหย methanol ออก โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน

ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับ fibroin scaffold เตรียมที่ fibroin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สูตรตำรับ	Fibroin (%w/v)	Fibroin (g)	Water to (mL)
SF1	1	0.1	10
SF2	2	0.2	10
SF4	4	0.4	10
SF6	6	0.6	10

2.1.2 การเตรียม fibroin/collagen (SF/C) scaffolds

1. เตรียมสารละลาย collagen ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 1% w/v โดยค่อยๆ โปริย collagen ลงในสารละลาย 5% v/v acetic acid พร้อมทั้งปั่นด้วยความเร็ว 400- 500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน
2. เตรียมสารละลาย fibroin ที่ความเข้มข้น 2% w/v จากนั้นผสมสารละลาย collagen ที่เตรียมไว้ลงไป โดยให้มีอัตราส่วนของสารละลายผสม fibroin/collagen เท่ากับ 95/5, 90/10 และ 75/25 ดังตารางที่ 2 พร้อมทั้งปั่นด้วยความเร็ว 400 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
3. วัด pH ของสารละลาย จากนั้นจึงทำการเทใส่ บีกเกอร์ขนาด 10 ml และนำแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C อย่างน้อย 12 ชม. แล้วจึงนำไประเหยแห้งด้วยวิธี Freeze drying เป็นเวลา 3 วัน
4. เมื่อได้ชิ้น scaffolds แล้ว นำมาแช่ใน methanol เป็นเวลา 30 นาที และระเหย methanol ออก โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน

ตารางที่ 2 แสดงสูตรตำรับ fibroin/collagen scaffold เตรียมจากสารผสมที่อัตราส่วนต่างๆ

สูตรตำรับ	Mass ratio of fibroin : collagen	mL		
		2% Fibroin	0.5% collagen	1% Collagen
SF/5C	95/5	4	1	-
SF/10C	90/10	4	-	1
SF/25C	75/25	3	-	2

2. 2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของ scaffolds

2.2.1 การศึกษารูปร่างลักษณะ รูพรุน และการวัดขนาดของรูพรุน โดยใช้ Scanning electron microscope (SEM)

1. นำชิ้น SF และ SF/C scaffolds ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol แล้ว มาตัด cross-section ให้เป็นแผ่นบาง
2. นำไปเคลือบด้วยทอง และตรวจดูรูปร่างลักษณะ และรูพรุนของ scaffolds ด้วยกล้อง SEM

3. ทำการวัดขนาดของรูพรุน โดยวัดตัวอย่างแบบสุ่มจากรูพรุน 30 รู จากภาพถ่าย SEM และใช้โปรแกรม ImageJ ช่วยในการวิเคราะห์

2.2.2 การศึกษาการความเป็นรูพรุน (Porosity) ของ scaffolds โดยใช้วิธี liquid displacement

1. เตรียมชิ้น SF และ SF/C scaffolds ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol มาตัดเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ให้มีขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร

2. เตรียมสารละลาย Hexane ใส่ในกระบอกตวงขนาด 10 ml บันทึกปริมาตรเป็น V_1

3. จุ่มชิ้น scaffolds ลงไปใน cylinder ที่มี Hexane ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ชิ้น scaffolds อิ่มตัว และบันทึกปริมาตรเป็น V_2

4. ใช้ forceps คีบชิ้น scaffolds ออก และบันทึกปริมาตรของ Hexane ที่เหลืออยู่เป็น V_3

5. นำค่าที่ได้รับมาทำการคำนวณหาการกระจายขนาดของรูพรุน (% Porosity) โดยใช้สูตร

$$\text{Total volume of scaffolds (V)} = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = V_2 - V_3$$

$$\text{Porosity (\%)} = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100$$

2.2.3 การศึกษาความแข็งแรง (Mechanical property) ของ scaffolds โดยใช้เครื่อง Instron

1. เตรียมตัวอย่าง SF และ SF/C scaffolds ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol มาตัดให้มีขนาดรูปร่างทรงกระบอก (Cylinder-shape) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-12 มิลลิเมตร และสูง 4-8 มิลลิเมตร

2. ทำการทดสอบแรงอัดด้วยเครื่อง Instron 8872 ด้วย 0.25 kN load cell ที่อุณหภูมิห้อง และตั้งค่า cross-head speed ที่ 0.5 mm/min

3. บันทึกค่าที่ได้รับ และนำมาคำนวณหาค่า compressive stress และ compressive modulus

2.2.4 การศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำ (Swelling property) ของ scaffolds

1. เตรียมชิ้น SF และ SF/C scaffolds ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol มาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ให้มีขนาด 1x1x1 เซนติเมตร

2. จากนั้นนำชิ้น scaffolds แช่ในน้ำ DI (deionize) ทิ้งไว้ 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนักที่บวมแล้ว บันทึกค่าเป็น W_s

3. นำชิ้น scaffolds มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงทำการชั่งน้ำหนักแห้งและบันทึกค่าเป็น W_d

4. นำมาคำนวณหาการดูดซับน้ำตามสูตร

$$\text{อัตราการพองตัว (Swelling ratio)} = (W_s - W_d) / W_d$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำ (\%Water uptake)} = [(W_s - W_d) / W_s] \times 100$$

2.2.5 การศึกษาโครงสร้างของ scaffolds โดยใช้ Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR)

1. เตรียมตัวอย่าง SF และ SF/C scaffolds ที่ผ่านการ treat และไม่ได้ treat ด้วย methanol มาบดให้เป็นผงประมาณ 2-3 มิลลิกรัม ผสมรวมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ประมาณ 80 มิลลิกรัม จากนั้นอัดลงบนแผ่น transparent disk
2. ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer โดย scan สเปกตรัมในช่วง $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ resolution 4 cm^{-1}

2.2.6 การศึกษาโครงสร้างผลึกของ scaffolds โดยใช้ X-ray diffraction (XRD)

1. เตรียมตัวอย่าง SF และ SF/C scaffolds ที่ผ่านการ treat และไม่ได้ treat ด้วย methanol มาบดให้เป็นผงและนำมาอัดให้มีผิวหน้า (outer surface) ที่เป็นระนาบและเรียบ
2. ทำการวิเคราะห์ด้วย X-ray powder Diffractometer โดยใช้ Cu K α radiation ($\lambda = 0.154\text{ nm}$), operating voltage และ current เป็น 30 kV และ 20 AV ตามลำดับ ข้อมูลจะถูกเก็บจาก $5\text{--}70^\circ 2\theta$ ที่ scan speed $0.02^\circ 2\theta$ intervals

2.2.7 การศึกษาการสลายตัวของ scaffolds ในเอนไซม์ protease

1. เตรียมชิ้น SF และ SF/C scaffolds ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol เรียบร้อยแล้วมาตัดเป็นรูปทรงกระบอก โดยให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร และสูง 5 มิลลิเมตร
2. นำชิ้น scaffolds ไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกเป็นน้ำหนักเริ่มต้น W_0
3. แช่ scaffolds ใน 2 ml ของสารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 ที่มีเอนไซม์ protease 1 unit ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน และทำการเปลี่ยนสารละลายตัวกลางทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยชุดควบคุม (control) ชิ้น scaffolds จะถูกแช่ในสารละลาย PBS ที่ไม่มีเอนไซม์
4. เมื่อถึงเวลาที่กำหนด นำชิ้น scaffolds ไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งและมีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้ และบันทึกเป็นน้ำหนักที่เหลืออยู่ W_t
5. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เหลืออยู่ของ scaffolds ตามสูตร
เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เหลือ (%Weight remaining) $= (W_t / W_0) \times 100$

2.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของ scaffolds ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

2.3.1 การแยกและการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (chondrocytes)

1. นีดยาสลบ Pentobarbital Sodium ที่เกินขนาด (overdose) เข้าที่ช่องท้องของหนูทดลอง สายพันธุ์ Sprague Dawley อายุ 4-8 สัปดาห์ เพื่อทำให้จากไปอย่างสงบ

2. ตัดเอาชิ้นส่วนของขาหน้าและขาหลังบริเวณข้อต่อออกมาแช่ใน sterile Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 ที่มี 1% Penicillin/Streptomycin และทำการล้างด้วย sterile PBS pH 7.4 ที่มี 1% Penicillin/Streptomycin อีก 3 ครั้ง โดยกระทำภายในตู้ที่ปลอดเชื้อ (Laminar flow)

3. นำขาหนูทดลองแช่ใน 70% Ethanol ประมาณ 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่อาจจะปนเปื้อนมากับเนื้อเยื่อ จากนั้นจึงนำมาแช่ไว้ใน PBS pH 7.4 แล้วใช้มีดผ่าตัดฉีกเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (cartilage) สีขาวที่อยู่บริเวณข้อต่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ใน 1 ml DMEM ที่เตรียมไว้ใน 15 ml sterile tube

4. นำชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่กระจายอยู่ใน DMEM medium ไป centrifuge ที่ความเร็ว 1,500 rpm 5 นาที แล้ว pipette เอา medium เก่าทิ้งไป จากนั้นล้างเนื้อเยื่อด้วย DMEM medium อีก 2 ครั้ง

5. Pipette เอา medium เก่าทิ้งไป แล้วย่อยเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วยการเติมเอนไซม์ 0.2 %w/v collagenase ประมาณ 1 ml จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. เมื่อครบกำหนดเวลา นำไป centrifuge ที่ 1500 rpm 5 นาที เพื่อ pipette เอาเอนไซม์ collagenase ทิ้ง และทำการล้างด้วย DMEM 3 ครั้ง

7. Re-suspend pellet cells ด้วย culture medium (DMEM medium ที่ประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% penicillin /streptomycin) เพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ใน culture medium โดยเลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ขนาด 25 cm³ ในตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO₂

8. ทำการเปลี่ยน medium ทุกๆ 3 วัน เมื่อเซลล์ confluent จึงทำการ subculture โดยเซลล์ในแต่ละ passage จะถูกนำมาศึกษา morphology ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนใน scaffolds

1. โดยนำชิ้น SF และ SF/C scaffolds มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 cm สูง 0.5 cm จากนั้นจึงนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยการ Autoclave ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

2. นำชิ้น scaffolds ที่ผ่านการ autoclave แล้วมาแช่ใน 70% Ethanol 30 นาที และระเหย ethanol ออกที่อุณหภูมิห้องภายในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นล้างชิ้น scaffolds 2 ครั้ง ด้วย sterile PBS pH 7.4 แล้วนำชิ้น scaffold วางในหลุมของ 24-well tissue culture plate

3. Pre-wetted ชิ้น scaffolds ด้วย culture medium 1 ml และบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ 1 คืน เมื่อครบกำหนดจึง pipette เอา medium ส่วนเกินที่ไม่ถูกดูดซับใน scaffolds ทิ้งไป

4. นำเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน passage 2 มาทำการ trypsinize และนับจำนวนเซลล์ จากนั้นเติม suspension ของเซลล์กระดูกอ่อน 50 µl ลงไปบน scaffold แต่ละชิ้นอย่างช้าๆ โดยให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1x 10⁶ เซลล์/scaffold

5. เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 37°C 5% CO₂ เปลี่ยน medium ทุก 3 วัน หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน จึงนำชิ้น scaffolds ที่มีเซลล์กระดูกอ่อนอยู่มาศึกษาในขั้นต่อไป

2.3.3 การศึกษาการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์บน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay

1. หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์บน scaffolds ครบตามเวลาที่กำหนดไว้ ล้างชั้น scaffolds 2 ครั้งด้วย sterile PBS pH 7.4 และย้ายไปใส่ใน 24-well tissue culture plate หลุมใหม่ โดยมี blank คือชั้น SF และ SF/C scaffolds ที่ไม่ได้ทำการเติมเซลล์กระตุ้นลงไป
2. จากนั้นทำการเติม DMEM medium ที่ประกอบด้วย 0.5 mg/ml MTT ลงไปหลุมละ 1 ml และบ่มที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
3. Pipette เอา medium เก่าออกทิ้ง แล้วเติม DMSO 2 ml จากนั้นนำ plate ไปเขย่าที่ 120 rpm 30 นาที เพื่อให้ตะกอน formazan ละลายออกมาจาก scaffolds ได้ดีขึ้น
4. Pipette แบ่งเอาสารละลายสีม่วงของ formazan 200 µl มาใส่ใน 96-well plate แล้วนำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 595nm ด้วยเครื่อง Microplate reader

2.3.4 การศึกษาการยึดเกาะและการกระจายของเซลล์บน scaffolds ด้วยเทคนิค Histochemistry

1. หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์บน scaffolds ครบตามเวลาที่กำหนดไว้ ล้างชั้น scaffolds 2 ครั้งด้วย sterile PBS pH 7.4
2. นำชั้น scaffolds มาแช่ใน 10% neutral formalin buffer ประมาณ 24 ชั่วโมง และนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาเคมีต่างๆ จนได้เป็นพาราฟินบล็อก (paraffin block)
3. ตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 3-5 µm ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ Microtome แล้วจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C
4. นำสไลด์เนื้อเยื่อไปผ่านขบวนการล้างเอาพาราฟินออก (Deparaffinization) ด้วยการแช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
5. นำสไลด์ไปผ่านกระบวนการ Rehydration ด้วยการแช่ใน alcohol เปรอร์เซ็นต์จากสูงไปต่ำ ได้แก่ Absolute Ethanol, 95% Ethanol และ 70% Ethanol 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วแช่ในน้ำประปา 2 นาที
6. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสี Hematoxylin 30 วินาที แล้วล้างสีส่วนเกิน ออกด้วยน้ำประปา จากนั้นแช่ใน Scott solution 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา
7. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสี Eosin เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา
8. Dehydrate สไลด์เนื้อเยื่อโดยนำไปผ่าน alcohol ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง และ clearing โดยผ่าน xylene สุดท้ายจึงทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการหยคน้ำยา permount และปิดทับด้วย cover slip แล้วตรวจดูการยึดเกาะของเซลล์บน scaffolds ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.5 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์บน scaffolds ด้วย SEM

1. หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์บน scaffolds ครบตามเวลาที่กำหนดไว้ ล้างชั้น scaffolds 2 ครั้งด้วย sterile PBS pH 7.4

2. นำชิ้น scaffolds มา fix ใน 3% v/v glutaraldehyde เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

3. Dehydrated ชิ้น scaffolds โดยนำมาผ่าน 30%, 50%, 70%, 90%, 100% EtOH ขึ้นตอนละ 10 นาที

4. ทิ้งให้ชิ้น scaffolds แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 10 ชั่วโมง

5. จากนั้น Dry cell-seeded scaffolds จะถูกตัด section ให้เป็นแผ่นบางนำไปติดบน aluminum stubs และนำไป coat ด้วยทอง แล้วจึงตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์บน scaffolds ภายใต้กล้อง SEM

2.3.6 การศึกษาการสร้าง extracellular matrix ของเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry

ขั้นตอนการศึกษาการสร้าง type II collagen

1. นำพาราฟินบล็อกของชิ้นตัวอย่าง scaffolds มาตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนาประมาณ 3-5 μm จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C

2. ล้างพาราฟินที่เคลือบ section ออก (Deparaffinization) ด้วยการแช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้ง

3. นำสไลด์ไปผ่านกระบวนการ Rehydration ด้วยการแช่ใน alcohol เปรอร์เซ็นต์จากสูงไปต่ำ

4. ทำการยับยั้งเอนไซม์ที่มีอยู่ใน section (Blocking endogenous enzyme) โดยการ incubate ใน 0.5% H_2O_2 ใน methanol นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยสไลด์ด้วย Tris Buffer Saline pH 7.6 (TBS) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5. ทำการยับยั้งการจับกันอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (Blocking of nonspecific reaction) ด้วยการเติม 1.5% horse normal serum ใน TBS ปริมาณ 100 μl /section แล้ว incubate ประมาณ 10 นาที

6. เติมน้ำสไลด์เคาะสารเดิมออก และเติม avidin blocking solution 100 μl แล้ว incubate 15 นาที

7. เติมน้ำสไลด์เคาะสารเดิมออก และเติม biotin blocking solution 100 μl แล้ว incubate 15 นาที

8. เติม primary antibody ต่อ type II collagen (mouse monoclonal) ที่ dilution 1:200 ปริมาณ 100 μl (negative control หยด TBS แทน primary antibody) แล้ว incubate ใน chamber ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

*หมายเหตุ ขั้นตอนต่อจากนี้ไปใช้การย้อมด้วยวิธีของ VECTASTAIN ABC systems ด้วยชุดย้อม VECTASTAIN ABC kit

9. ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม biotin-labeled secondary antibody (horse serum + biotinylated mouse IgG + TBS) ปริมาณ 100 μl แล้ว incubate 30 นาที

10. ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม avidin: biotinylated enzyme complex (reagent A + reagent B + TBS) ปริมาณ 100 μl แล้ว incubate 30 นาที

11. ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงเติม substrate-chromogen (buffer + Diaminobenzidine (DAB) + H_2O_2 + น้ำกลั่น) ปริมาณ 100 μl แล้ว incubate 4 นาที ล้างด้วยน้ำประปา

12. ทำการ counter stain ด้วย hematoxylin และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา จากนั้น dehydrate สไลด์เนื้อเยื่อโดยนำไปผ่าน alcohol ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง และ clearing โดยผ่าน xylene สุดท้ายจึงทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการหยดน้ำยา permount และปิดทับด้วย cover slip

ขั้นตอนการศึกษาการสร้าง Aggrecan

1. นำพาราฟินบล็อกของชิ้นตัวอย่าง scaffolds มาตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนาประมาณ 3-5 μm จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$
 2. ล้างพาราฟินที่เคลือบ section ออก (Deparaffinization) ด้วยการแช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้ง
 3. นำสไลด์ไปผ่านกระบวนการ Rehydration ด้วยการแช่ใน alcohol เปรอร์เซ็นต์จากสูงไปต่ำ
 4. Blocking endogenous enzyme โดยการ incubate ใน 0.5% H_2O_2 ใน methanol นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยสไลด์ด้วย Tris Buffer Saline pH 7.6 (TBS) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
 5. ทำการยับยั้งการจับกันอย่างไม่จำเพาะเจาะจงด้วยการเติม 1.5% goat normal serum ใน TBS ปริมาณ 100 μl แล้ว incubate 10 นาที
 6. เอียงสไลด์เคาะสารเคมีออก และเติม avidin blocking solution 100 μl แล้ว incubate 15 นาที
 7. เอียงสไลด์เคาะสารเคมีออก และเติม biotin blocking solution 100 μl แล้ว incubate 15 นาที
 8. เติม primary antibody ต่อ aggrecan (rabbit polyclonal) ที่ dilution 1:50 ปริมาณ 100 μl (negative control หยด TBS แทน primary antibody) แล้ว incubate ใน chamber ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง
- *หมายเหตุ ขั้นตอนต่อจากนี้ไปใช้การย้อมด้วยวิธีของ VECTASTAIN ABC systems ด้วยชุดย้อม VECTASTAIN ABC kit
9. ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม biotin-labeled secondary antibody (goat serum + biotinylate rabbit IgG + TBS) ปริมาณ 100 μl /section แล้ว incubate ประมาณ 30 นาที
 10. ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม avidin: biotinylate enzyme complex (reagent A + reagent B + TBS) ปริมาณ 100 μl /section แล้ว incubate ประมาณ 30 นาที
 11. ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงเติม substrate-chromogen (buffer + DAB + H_2O_2 + น้ำกลั่น) ปริมาณ 100 μl แล้ว incubate ประมาณ 2 นาที ล้างด้วย
 12. ทำการ counter stain ด้วย hematoxylin ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา จากนั้น dehydrate สไลด์เนื้อเยื่อโดยนำไปผ่าน alcohol ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง และ clearing โดยผ่าน xylene สุดท้ายจึงทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการหยดน้ำยา permount และปิดทับด้วย cover slip

บทที่ 2

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

1. การเตรียม fibroin (SF) และ fibroin/collagen (SF/C) scaffolds

จากการทดลองเบื้องต้นในการเตรียมวัสดุโครงร่างให้เซลล์ยึดเกาะ (scaffolds) ด้วยเทคนิค freeze-drying นั้น พบว่าอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง (freezing process) ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโครงร่าง 3 มิติ ในรูปแบบ sponge ได้ดี และเนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้โปรตีนไหมไฟโบรอิน (fibroin) เป็นพอลิเมอร์หลักในการเตรียมเป็น scaffolds จึงทำการ treat ซึ่ scaffolds ที่ผ่านการ freeze-dried เรียบร้อยแล้วด้วย methanol ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเหนี่ยวนำให้ fibroin เปลี่ยน conformation จาก amorphous ไปเป็น crystallization มากขึ้น [1] ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเตรียมวัสดุโครงร่าง 3 มิติโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ fibroin ในตำรับ ถึงแม้ว่าเทคนิค freeze-drying จะเป็นเทคนิคที่ง่ายและทำให้ได้วัสดุโครงร่างที่มีรูพรุนสูง [2-4] แต่ก็มีรายงานว่า การเตรียม fibroin scaffolds ด้วยเทคนิค freeze-drying นั้น มักจะได้วัสดุโครงร่างที่มีลักษณะเป็นแผ่น (sheet formation) ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการแช่แข็ง ทำให้ scaffolds ที่ได้รับประาและแตกง่าย [5] ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำ collagen มาผสมกับ fibroin เพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรงของ scaffolds เนื่องจาก collagen มีคุณสมบัติเป็น biocompatible proteins จึงน่าจะมีความสามารถทำปฏิกิริยากับ fibroin ผ่านพันธะไฮโดรเจนหรือพันธะไอออนิก เพื่อยับยั้งการเกิดลักษณะเป็นแผ่นของ fibroin ในกระบวนการแช่แข็งได้

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ scaffolds

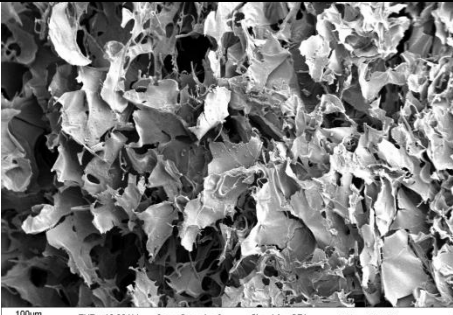
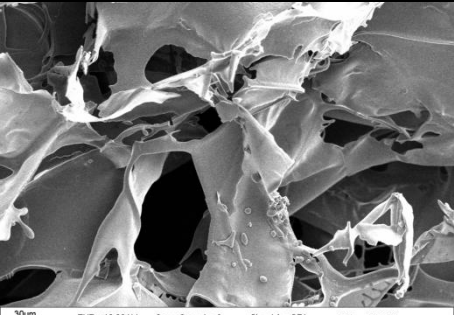
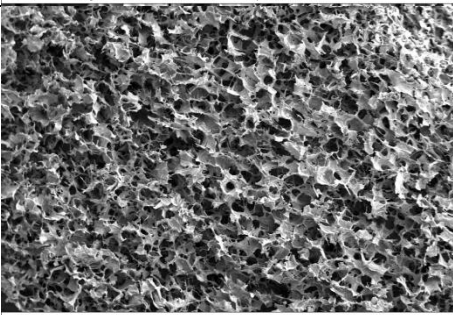
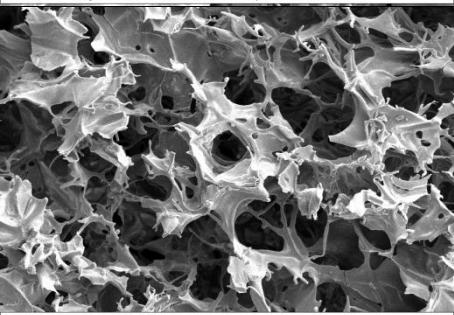
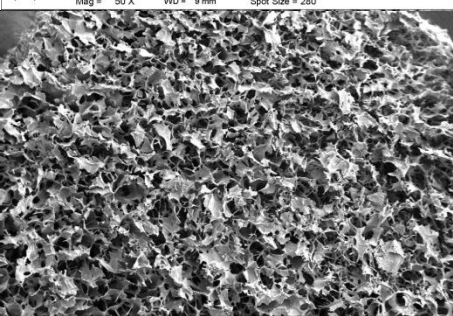
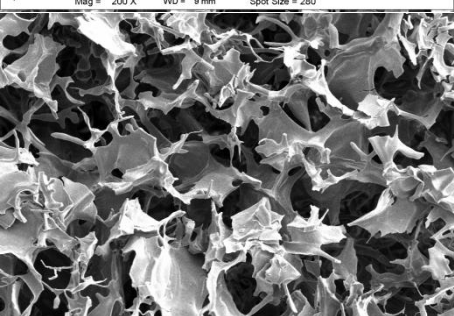
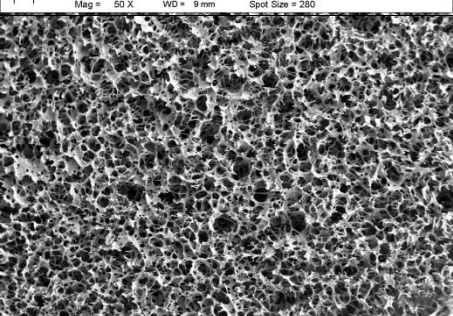
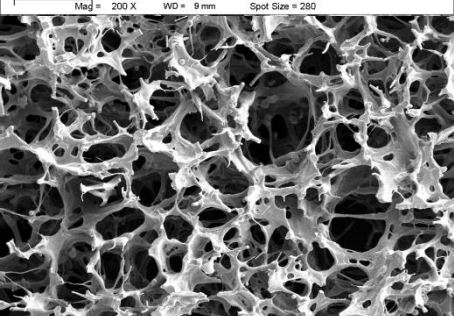
2.1 การศึกษารูปร่างลักษณะของ รูพรุนและขนาดของรูพรุนของ scaffolds ด้วย SEM

จากการทดลองเตรียม SF scaffolds โดยทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ fibroin เป็น 1, 2, 4, และ 6% w/v ในตำรับ พบว่าสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นโครงร่าง 3 มิติ แบบ sponge ได้ดี เมื่อนำมาศึกษารูปร่างลักษณะพื้นผิว และขนาดของรูพรุน ด้วยภาพถ่าย SEM (ตารางที่ 3) จากผลการทดลองพบว่า scaffolds ที่เตรียมจาก fibroin นั้นมีลักษณะพื้นผิวก่อนข้างเรียบและผนังของ scaffolds ค่อนข้างบาง และที่สำคัญพบว่าความเข้มข้นของ fibroin เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อรูปร่างลักษณะและขนาดรูพรุนของ scaffolds โดย SF scaffolds ที่เตรียมจากสารละลาย fibroin 1%w/v มีลักษณะของรูพรุนที่เป็นแผ่น การกระจายของรูพรุนไม่สม่ำเสมอ และมีขนาดรูพรุนค่อนข้างใหญ่ประมาณ $147.69 \pm 66 \mu\text{m}$ ซึ่งลักษณะนี้จะส่งผลให้ scaffold ไม่ค่อยแข็งแรงและเป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์จึงไม่เหมาะสมต่อการนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ fibroin เป็น 2, 4 และ 6% พบว่า SF scaffolds ที่ได้มีลักษณะที่เป็นแผ่นลดน้อยลง มีการกระจายขนาดของรูพรุนค่อนข้างสม่ำเสมอและมีขนาดรูพรุนลดลงเป็น 82.92 ± 28 , 71.51 ± 18 , และ $65.33 \pm 16 \mu\text{m}$ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจาก scaffold ที่เตรียมจาก fibroin 1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น

95% รวมทั้งมีการเชื่อมต่อกันของรูพรุนเพิ่มขึ้น(interconnection pores) โดยผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ fibroin มากขึ้นส่งผลให้โมเลกุลของ fibroin เกิด interaction กันมากขึ้น ผลึกของน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในกระบวนการแช่แข็งจึงถูกต่อต้านด้วยโมเลกุลของ fibroin ทำให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กลง ดังนั้นเมื่อน้ำแข็งถูกระเหิดออกไปด้วยเทคนิค freeze-drying ส่งผลให้รูพรุนที่ได้มีขนาดเล็กลง และมีการเชื่อมต่อกันระหว่างรูพรุนมากขึ้นด้วย ซึ่งการทดลองนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับรายงานของ Lv Q,et al.[5] และ Zhan JL, et al. [6]

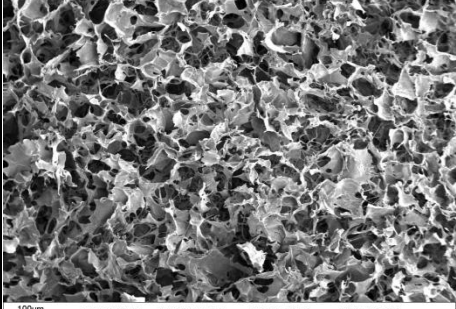
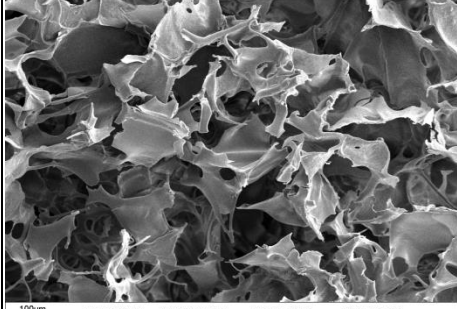
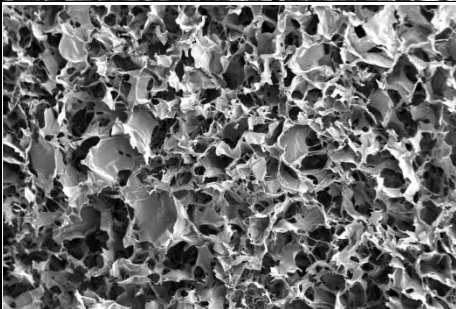
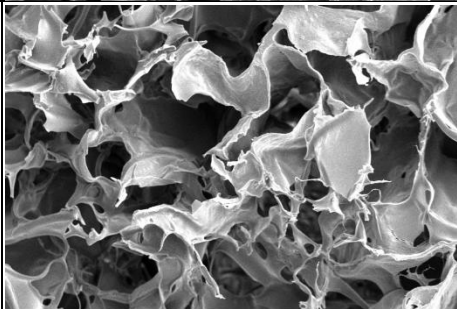
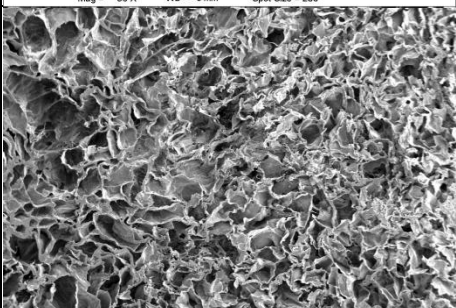
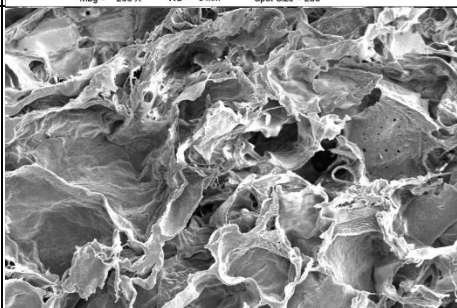
เมื่อทดลองเตรียม scaffolds จากสารผสม fibroin กับ collagen โดยเลือกใช้ 2% w/v fibroin ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถเกิดเป็นโครงร่าง 3 มิติได้ดี ผสมกับสารละลาย collagen ตามสูตรตำรับ SF/5C, SF/10C และ SF/25C ซึ่งมีอัตราส่วนของ fibroin ต่อ collagen เป็น 95/5, 90/10 และ 75/25 ตามลำดับ จากภาพถ่าย SEM (ตารางที่ 4) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ collagen ในตำรับมากขึ้นเป็น 95/5, 90/10 และ 75/25 ขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้นเล็กน้อยโดยมีค่า 76.22 ± 21 , 87.74 ± 24 , และ 92.79 ± 21 μm ตามลำดับ โดยที่ขนาดรูพรุนของ SF/5C และ SF/25C มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % และลักษณะพื้นผิวของ SF/C scaffolds ที่ได้รับมีความขรุขระมากขึ้นรวมถึงผนังของ scaffolds ก็มีความหนามากขึ้นด้วย ซึ่งลักษณะนี้น่าจะส่งเสริมให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญบน scaffolds ได้ดี อย่างไรก็ตามพบว่าโครงร่าง 3 มิติที่ได้รับจากสารผสมระหว่าง fibroin และ collagen นั้นเกิดลักษณะรูพรุนที่เป็นแผ่นบางเล็กน้อย และมีความเชื่อมต่อกันของรูพรุนน้อยกว่า scaffolds ที่เตรียมจาก fibroin เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้ตรงกันข้ามกับการทดลองของ Lv Q,et al.[5] ที่พบว่าการผสม collagen เข้าไปในตำรับสามารถยับยั้งการเกิดลักษณะที่เป็นแผ่นของ fibroin ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการใช้ fibroin และ collagen จากแหล่งที่ต่างกันรวมไปถึงขั้นตอนการผลิตที่แตกต่างกันอาจจะทำให้ผลการทดลองที่ได้นั้นแตกต่างกันด้วย

ตารางที่ 3 ภาพถ่าย SEM และขนาดรูพรุนของ fibroin scaffolds สูตรตำรับต่างๆที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ fibroin

สูตรตำรับ	กำลังขยาย 50x	กำลังขยาย 200x	ขนาดรูพรุน (μm)
SF1			147.69 ± 66
SF2			82.92 ± 28
SF4			71.51 ± 18
SF6			65.33 ± 16

ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD, N= 30

ตารางที่ 4 ภาพถ่าย SEM และขนาดรูพรุนของ fibroin/collagen scaffolds สูตรตำรับต่างๆที่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ fibroin และ collagen

สูตรตำรับ	กำลังขยาย 50x	กำลังขยาย 200x	ขนาดรูพรุน (μm)
SF/5C			76.22 ± 21
SF/10C			87.74 ± 24
SF/25C			92.79 ± 21

ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD, N= 30

2.2 การศึกษาความเป็นรูพรุน (Porosity) ของ scaffolds โดยใช้วิธี liquid displacement

ความเป็นรูพรุนของโครงร่างเลียงเซลล์ เป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ใน tissue engineering scaffold ที่มีความเป็นรูพรุนสูงจะช่วยเพิ่มโอกาสให้เซลล์มีการเคลื่อนที่ (migration) และมีการสื่อสารกันระหว่างเซลล์ (cell-cell interaction) รวมถึงสนับสนุนให้เซลล์มีการเจริญและเพิ่มจำนวน (proliferation) มากขึ้นด้วย [7] จากผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อความเป็นรูพรุนของ scaffolds คือความเข้มข้นของ fibroin และสารผสม เมื่อความเข้มข้นของ

สารละลาย fibroin เพิ่มขึ้นจาก 1% จนถึง 6%w/v พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของ scaffolds ก็จะเพิ่มมากขึ้นจากประมาณ 62% จนถึง 89% ซึ่งผลที่ได้รับนี้เป็นไปในทางเดียวกับภาพถ่ายจาก SEM ดังนั้น scaffolds ที่มีรูพรุนขนาดเล็กกระจายอย่างสม่ำเสมอและมีการเชื่อมต่อกันของรูพรุนสูงก็จะมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนสูงตามไปด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อทำการผสม collagen เข้าไปในสูตรตำรับ พบว่า scaffolds ที่ได้รับมีการเชื่อมต่อกันของรูพรุนน้อยลงเมื่อเทียบกับ SF scaffold โดยสังเกตได้จากภาพถ่าย SEM และเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนพบว่า SF/25C scaffolds มีค่าน้อยกว่าและแตกต่างจาก SF4 และ SF6 scaffolds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % นอกจากนี้ SF/C scaffolds มีแนวโน้มความเป็นรูพรุนลดลงด้วยเมื่อเพิ่มปริมาณของ collagen ในตำรับมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของ collagen สามารถเกิด interaction กับ fibroin ผ่านทาง hydrogen bond ทำให้ได้ผนัง scaffold ที่มีลักษณะหนามากขึ้น และมี interconnected pore ลดลง เมื่อเทียบกับ scaffold ที่เตรียมจาก fibroin เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 5 ความเป็นรูพรุนของ fibroin และ fibroin /collagen scaffolds

ชนิดของ scaffolds	สูตรตำรับ	Mass ratio of fibroin : blended polymer	% Porosity
Pure silk fibroin (SF)	SF1	100/0	61.67 ± 12.58
	SF2	100/0	77.78 ± 9.62
	SF4	100/0	86.31 ± 1.03
	SF6	100/0	88.89 ± 0.00
Fibroin /collagen (SF/C)	SF/5C	95/5	78.33 ± 2.89
	SF/10C	90/10	75.00 ± 0.00
	SF/25C	75/25	61.11 ± 9.62

ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD, N= 3

2.3 การศึกษาความแข็งแรง (Mechanical property) ของ scaffolds โดยใช้เครื่อง Instron

วัสดุโครงร่างเลี้ยงเซลล์สำหรับนำไปใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้น ควรจะมีความแข็งแรงเพียงพอ เทียบเท่ากับเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ต้องการซ่อมแซม [8-10] เนื่องจากในสภาวะแวดล้อมจริงนั้นจะต้องมีการสัมผัสหรือได้รับความกระทบกระเทือนจากปัจจัยต่างๆ ดังนั้นการเตรียม scaffolds ที่ดีจึงควรออกแบบให้มีความแข็งแรงและสามารถทนต่อแรงต่างๆ ได้ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาความแข็งแรงของ scaffolds ที่เตรียมขึ้นโดยทดสอบความสามารถในการทนต่อแรงอัด (compression test) ของ scaffolds ตำรับต่างๆ (ตารางที่ 6) พบว่า ค่า compressive stress และ modulus ของ SF scaffolds มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพิ่มปริมาณของ

fibroin ในตำรับ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการกระจายของรูพรุนที่สม่ำเสมอ (uniform pore distributions) และมีความเชื่อมต่อกันของรูพรุนสูงจึงช่วยให้ scaffolds สามารถรองรับแรงอัดที่มากกระทำต่อ scaffolds ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม scaffolds ที่ได้จากการเตรียมด้วย fibroin เพียงอย่างเดียวยังคงมีค่าความสามารถทนต่อแรงอัดค่อนข้างต่ำ ซึ่งทำให้ scaffolds เปราะและแตกได้ง่าย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้เติม collagen เข้าไปผสมกับสารละลาย fibroin เพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับ scaffolds ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้รับพบว่าเมื่อเพิ่ม collagen เข้าไปในตำรับสามารถเพิ่มความแข็งแรงให้กับ scaffolds ได้มากขึ้นโดยสังเกตได้จากค่า compressive strength และ modulus ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ scaffolds ที่เตรียมจาก fibroin เพียงอย่างเดียวที่น่าสนใจก็คือ SF/C scaffolds สูตรตำรับ SF/25C มีค่า compressive modulus สูงที่สุดซึ่งมากกว่า SF6 scaffold ถึง 10 เท่า อาจเป็นไปได้ว่า การผสม collagen ในตำรับทำให้ scaffolds ที่ได้รับมีความหนาของผนัง scaffolds มากขึ้นจึงส่งผลให้สามารถทนต่อแรงอัดที่มากกระทำได้มากขึ้นด้วย โดยผลที่ได้รับสอดคล้องกับรายงานของ Lv Q, et al.[5] และ Nazarov R, et al.[4] ซึ่งพบว่าการกระจายขนาดของรูพรุนที่สม่ำเสมอและเป็นระเบียบรวมถึงการเพิ่มความหนาของผนัง scaffolds จะนำไปสู่การเพิ่มจะช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางกลหรือเพิ่มความแข็งแรงให้กับ scaffolds มากขึ้น

ตารางที่ 6 แสดงความแข็งแรงของ fibroin และ fibroin /collagen scaffolds

ชนิดของ scaffolds	สูตรตำรับ	Mass ratio of fibroin : blended polymer	Compressive properties	
			Compressive stress (kPa)	Compressive modulus (kPa)
Pure silk fibroin (SF)	SF1	100/0	34.16 ± 16.94	45.16 ± 28.91
	SF2	100/0	37.09 ± 1.85	47.75 ± 3.09
	SF4	100/0	47.59 ± 4.37	54.78 ± 3.92
	SF6	100/0	134.91 ± 9.31	147.97 ± 11.50
Fibroin /collagen (SF/C)	SF/5C	95/5	81.31 ± 16.83	94.65 ± 26.36
	SF/10C	90/10	72.05 ± 17.05	107.07 ± 47.09
	SF/25C	75/25	940.88 ± 353.19	1531.71 ± 697.41

ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD, N= 30

2.4 การศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำ (Swelling property) ของ scaffolds

คุณสมบัติในการดูดซับน้ำของ scaffolds เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่มีความสำคัญ มากต่อการนำไปใช้ทางด้าน tissue engineering เนื่องจากการแพร่ผ่านของน้ำเข้าไปใน scaffolds จะช่วยนำสารอาหารไปให้กับเซลล์ที่อยู่ภายใน scaffolds รวมทั้งยอมให้ของเสียที่หลั่งออกมาจากเซลล์แพร่ออกมาภายนอก scaffolds ได้ด้วย [2, 11-13] จากผลการทดสอบพบว่า scaffolds ที่เตรียมได้ทุกตัวรับสามารถดูดซับน้ำได้ดีมากกว่า 90% อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตว่า เมื่อปริมาณของ fibroin ในตัวรับเพิ่มมากขึ้น พบว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของ SF scaffolds มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7) อาจเนื่องมาจากความเป็น hydrophobicity ของ fibroin รวมไปถึงรูพรุนขนาดเล็กที่กระจายอย่างสม่ำเสมอและมีการเชื่อมต่อกันของรูพรุนสูงนั้นทำให้อัตราการพองตัวของ SF scaffolds ลดลงทำให้น้ำแพร่ผ่านเข้าไปใน scaffolds ได้ยากขึ้นด้วย นอกจากนี้ เมื่อผสม collagen เพิ่มเข้าไปในตัวรับ พบว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของ SF/C scaffolds มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เล็กน้อยเมื่อเทียบกับ scaffolds ที่เตรียมจาก fibroin เพียงชนิดเดียว อาจเนื่องมาจาก collagen ไปช่วยเพิ่มความเป็น hydrophilicity ให้กับ scaffolds ทำให้อัตราการพองตัวของ scaffolds เพิ่มขึ้น น้ำจึงสามารถแพร่เข้าไปใน scaffolds ได้มากขึ้น

ตารางที่ 7 แสดงความสามารถในการดูดซับน้ำของ fibroin และ fibroin /collagen scaffolds

ชนิดของ scaffolds	สูตรตัวรับ	Mass ratio of fibroin : blended polymer	swelling ratio	%water uptake
Pure silk fibroin (SF)	SF1	100/0	18.21 ± 6.50	94.42 ± 1.65
	SF2	100/0	14.27 ± 0.46	93.45 ± 0.19
	SF4	100/0	14.34 ± 2.15	93.40 ± 0.93
	SF6	100/0	11.58 ± 1.57	91.97 ± 0.94
Fibroin /collagen (SF/C)	SF/5C	95/5	16.92 ± 3.94	94.26 ± 1.13
	SF/10C	90/10	20.66 ± 5.28	95.21 ± 1.06
	SF/25C	75/25	20.98 ± 0.39	95.45 ± 0.08

ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD, N= 30

2.5 การศึกษาโครงสร้างของ fibroin, และ fibroin/collagen scaffolds โดยใช้ Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR)

FT-IR เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาและวิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยอาศัยการดูดกลืนช่วงคลื่นรังสีอินฟราเรดที่แตกต่างกันของแต่ละโมเลกุล เนื่องจาก fibroin และ collagen เป็น protein ดังนั้น sensitive characteristic bands ที่พบใน FTIR spectra ได้แก่ amide I, amide II และ amide III โดยที่การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ amide I เกิดจาก C=O stretching ส่วน amide II เกิดจาก N-H bending และ amide III เกิดจาก C-N stretching, N-H bending ของ amide ซึ่งทั้ง C=O และ N-H จะเกี่ยวข้องกับพันธะ hydrogen ที่อยู่ระหว่างโมเลกุลใน secondary structure [14-16]

Silk fibroin เป็นโปรตีนที่ผลิตจากหนอนไหมที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย glycine, alanine และ serine ประมาณ 85 mol% ของ amino acid ทั้งหมด โดยทั่วไปโครงสร้างของ fibroin มีทั้งส่วนที่เป็น amorphous (random coil) และ crystalline forms (β -sheet) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด conformational transition ได้ด้วยสภาวะต่างๆ เช่น การให้ความร้อน การจุ่มใน polar solvents โดยที่ crystalline form ของ silk fibroin มี 2 forms ได้แก่ silk I และ silk II โดย silk I เป็น metastable structure ของ fibroin ที่อยู่ใน abdominal glands ของหนอนไหมก่อนที่จะถูก spinning ออกมา ซึ่งมี molecular conformation เป็น type II β -turn type และ silk II คือ โครงสร้างผลึกของ fibroin หลังจากถูก spinning ออกมาเป็นเส้นไหม ซึ่งมี molecular conformation เป็น antiparallel β -sheet จึงทำให้เส้นไหมมีความแข็งแรงและสามารถทนทานต่อน้ำได้ (water resistant) [17-19]

ตารางที่ 8 แสดง FTIR characteristic peaks ของ fibroin, collagen และ scaffolds ต่างๆ (FTIR spectrum แสดงในภาคผนวก จ) พบว่า fibroin powder แสดง characteristic peak ที่ 1653 cm^{-1} (amide I), 1542 cm^{-1} (amide II), และ 1241 cm^{-1} (amide III) ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างที่เป็น amorphous form [19-21] และเมื่อนำมาเตรียมเป็น scaffold สูตรตำรับ SF2 โดยไม่ได้ผ่านการ treat ด้วย methanol พบ characteristic peak ที่ 1656 cm^{-1} , 1548 cm^{-1} , และ 1252 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ว่า SF scaffolds ที่ไม่ได้ผ่านการ treat ด้วย methanol นั้นมีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ random coil ในขณะที่ SF2 ที่ผ่านการ treat ซึ่ scaffold ด้วย methanol พบว่า amide peaks มีการเปลี่ยนแปลง โดยมีการเคลื่อนที่ของ peak ไปที่ตำแหน่ง 1627 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} และ 1233 cm^{-1} ซึ่งการเคลื่อนตำแหน่งของ peak นี้แสดงว่าโครงสร้างทุติยภูมิของ fibroin มีการเปลี่ยน conformational จาก random coil ไปเป็น β -sheet [1, 18, 22] ส่งผลให้ fibroin scaffolds ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol สามารถคงตัวในน้ำได้ (water stable) ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ ที่มีรายงานว่า การ interaction กับ solvent จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลง conformation ของ fibroin จาก random coil เป็น β -sheet ได้ [1, 17, 19]

collagen มีโครงสร้างเป็นแบบ triple helix ซึ่งประกอบด้วยสาย polypeptide 3 สายซึ่งแต่ละสายจะมี glycine อยู่ทุกๆ ตำแหน่งที่ 3 ของ amino acid sequence ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็น helix [23] ซึ่งจาก FTIR spectra ที่ได้รับจาก lyophilized collagen พบ characteristic peaks ที่ตำแหน่ง amide I ที่ 1650 cm^{-1} ซึ่ง

แสดงถึงการเกิด C=O stretching เมื่อพิจารณา SF/25C scaffold ที่ยังไม่ได้ทำการ treat ด้วย methanol พบ sensitive amide peaks ที่ 1659 cm^{-1} , 1549 cm^{-1} และ 1245 cm^{-1} ซึ่งมีตำแหน่งใกล้เคียงกับ Fibroin powder และ SF2 scaffold ที่ไม่ได้ treat ด้วย methanol จากผลที่ได้รับนี้แสดงว่าการผสม collagen เข้าไปในตำรับไม่ได้ทำให้โครงสร้างของ fibroin เปลี่ยนแปลง conformation เป็น β -sheet มากขึ้น อย่างไรก็ตามหลังจากทำการ treat ซึ่ SF/25C scaffold ด้วย methanol พบว่ามีการเคลื่อนที่ของ amide peaks ไปที่ตำแหน่ง 1628 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} และ 1231 cm^{-1} ซึ่งมีตำแหน่งใกล้เคียงกับ SF2 scaffolds ที่ทำการ treat ด้วย methanol ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการ treat ซึ่ scaffolds ด้วย methanol สามารถเหนี่ยวนำให้ fibroin เปลี่ยนแปลง conformation จาก random coil เป็น β -sheet ได้และส่งผลให้ scaffolds สามารถคงตัวในน้ำและมีความแข็งแรงมากขึ้น และถึงแม้ว่าการผสม collagen เข้าไปในตำรับจะไม่ทำให้เกิด peak ใหม่หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น β -sheet มากขึ้นแต่ก็คาดว่าจะมีการเกิด interaction กันระหว่าง fibroin และ collagen molecules ผ่านทางพันธะ hydrogen จึงส่งผลให้ SF/C scaffold มีความแข็งแรงมากกว่า SF scaffold

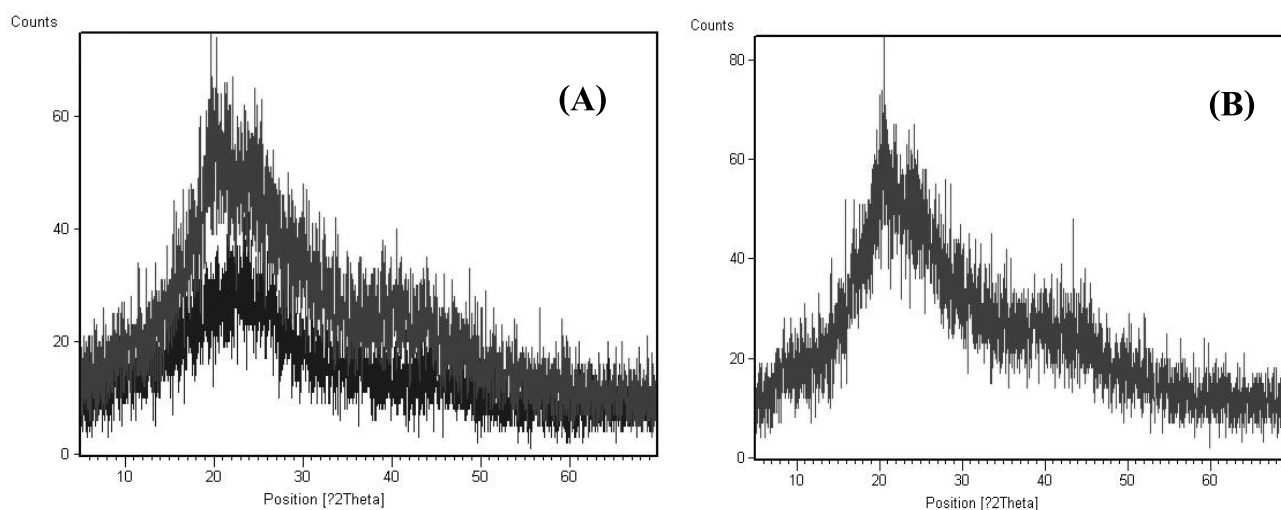
ตารางที่ 8 เอกลักษณะทางเคมี (characteristic peaks) ที่ตรวจพบในตัวอย่างซึ่ scaffolds ที่เตรียมซึ่

ตัวอย่าง	สูตรตำรับ	Methanol treatment	เอกลักษณะทางเคมี (characteristic peaks, cm^{-1})		
			Amide I	Amide II	Amide III
Fibroin powder	-	No	1653	1542	1241
Lyophilized Collagen	-	No	1650	1550	1234
Pure silk fibroin (SF)	SF2	No	1656	1548	1252
	SF2	Treat	1627	1521	1233
Fibroin /collagen (SF/C)	SF/25C	No	1659	1549	1245
	SF/25C	Treat	1628	1521	1231

2.6 การศึกษาโครงสร้างผลึกของ scaffolds โดยใช้ X-ray diffraction (XRD)

เพื่อยืนยันผลที่ได้รับจาก FTIR จึงได้ศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างความเป็นผลึกของ scaffolds โดยใช้ X-ray diffraction ซึ่เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์เอกลักษณะของการจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึก โดยอาศัยการคำนวณการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ผ่านซึ่งาน จากผลการทดลองแสดง X-ray diffraction pattern ของ scaffolds สูตรตำรับต่างๆ (รูปที่ 1) โดย scaffolds สูตรตำรับที่ทำการ treat ด้วย methanol นั้น แสดง strong diffraction peak ที่ประมาณ 21.0° (2θ) และมี intensity สูงกว่า scaffolds ที่ไม่ได้ทำการ treat ด้วย methanol ซึ่เป็นคุณลักษณะที่แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของ β -sheet crystals ของ silk fibroin [2, 4] ดังนั้น methanol จึงมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลง conformational ของ fibroin molecule ซึ่ผลที่ได้รับนี้ตรงกับที่มีรายงานว่า methanol สามารถช่วยเหนี่ยวนำให้ fibroin มีการเปลี่ยนแปลง conformation จาก random coil ไป

เป็น β -sheet มากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ methanol ไปช่วยเหนี่ยวนำโมเลกุลของ fibroin ให้เกิดการ interaction กันได้ดีขึ้น

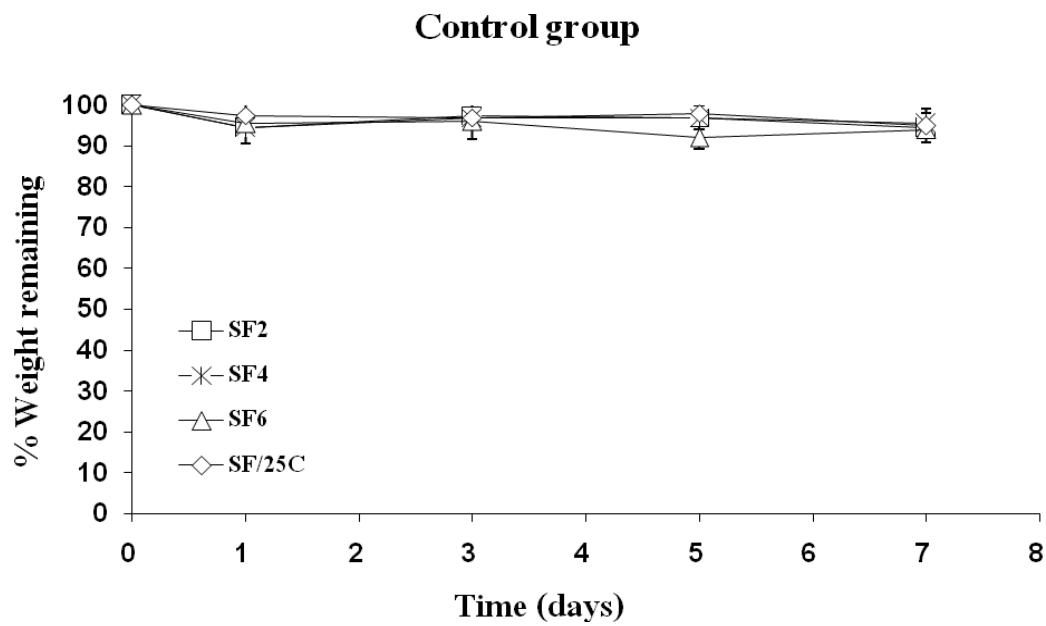


รูปที่ 1 X-ray diffraction pattern ของ scaffolds สูตรตำรับ (A) SF2 ที่ treat (สีเทา) และไม่ได้ treat (สีดำ) ด้วย methanol (B) SF/25C ที่ treat ด้วย methanol

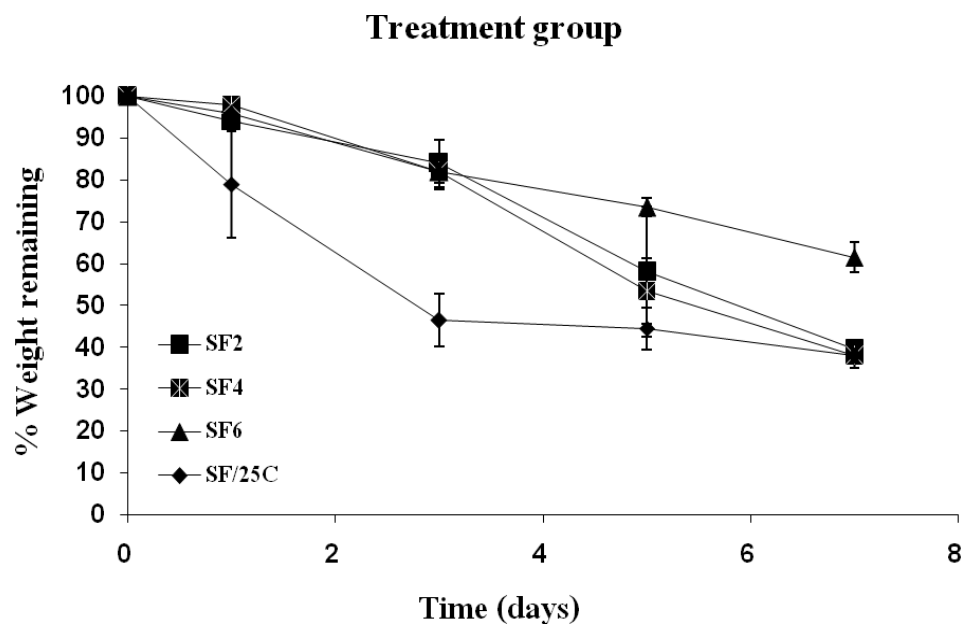
2.7 การศึกษาการสลายตัวของ scaffolds ในเอนไซม์ protease

ความสามารถในย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradability) ของ scaffolds เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่ง scaffolds ที่ดี ควรจะสามารถย่อยสลายได้ ในร่างกาย เพื่อให้เนื้อเยื่อใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นมาแทนที่และรวมเป็นเนื้อเดียวกับเนื้อปกติที่อยู่บริเวณใกล้เคียง [2, 24, 25] ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสลายตัวของ scaffolds สูตรตำรับต่างๆ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ (กลุ่มควบคุม) และภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์ protease (กลุ่มทดสอบ) ผลการทดลองพบว่าเมื่อแช่ scaffolds ในสารละลาย PBS ที่ไม่มีเอนไซม์ เป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 2) พบว่าน้ำหนักของ SF scaffolds และ SF/C scaffold ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งบ่งชี้ว่า SF และ SF/C scaffolds ไม่มีการย่อยสลายและยังสามารถคงรูปอยู่ได้

เมื่อทำการแช่ scaffolds ในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ protease 1 unit พบว่า SF scaffolds สูตรตำรับ SF2, SF4 และ SF6 มีการสลายตัวอย่างช้าๆ ตามจำนวนวันที่เพิ่มขึ้น สังเกตได้จากเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน SF2 และ SF4 มีน้ำหนักที่เหลืออยู่ประมาณ 40% ของน้ำหนักเริ่มต้น ส่วน SF6 มีน้ำหนักที่เหลืออยู่ประมาณ 60% ของน้ำหนักเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการสลายตัวของ scaffolds จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ fibroin ในตำรับเพิ่มมากขึ้น ส่วน SF/C scaffold สูตรตำรับ SF/25C แสดงการสลายตัวอย่างรวดเร็วสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน เท่ากับ 40% ผลการทดลองบ่งชี้ว่า SF/C scaffold สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วกว่า SF scaffold น่าจะเป็นผลมาจากการย่อยสลายในส่วน of collagen ซึ่งมีความเป็น hydrophilic มากกว่า fibroin (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 ร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่ของ scaffolds สูตรตำรับต่างๆ ที่ทำการทดสอบในสารละลาย PBS pH 7.4 (control group, N=2)



รูปที่ 3 ร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่ของ scaffolds สูตรตำรับต่างๆ ที่ทำการทดสอบในสารละลาย PBS pH 7.4 ที่มีเอนไซม์ protease 1 unit (Treatment group, N=2)

3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของ scaffolds ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

3.1 การแยกและการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 9) แสดงรูปร่างลักษณะ และการเกาะของเซลล์บน Tissue culture flask โดยเมื่อทำการแยกเซลล์ได้มาจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้น primary chondrocytes (passage 0) ที่แยกได้ใหม่จะมีลักษณะรูปร่างเซลล์ค่อนข้างกลมและมีขนาดประมาณ 10 μm หลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 1 วัน เซลล์ที่เริ่มเกาะกับพื้นผิว flask จะมีเริ่มมีลักษณะแบนและรูปร่างเรียวมากขึ้น เซลล์ใน passage 0 นี้จะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ และ เมื่อทำการ subculture เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากพอสำหรับการทดลองพบว่า เซลล์ที่เจริญใน passage ที่ 1, 2 และ 3 จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและมีรูปร่างเรียวยาวคล้ายกระสวย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนแบบ monolayer และ subculture หลายครั้งทำให้รูปร่างของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเปลี่ยนแปลงไปเป็นลักษณะที่เรียกว่า fibroblast-like cells ซึ่งเป็นสัญลักษณ์แสดงถึงการเกิด dedifferentiate ของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน [26-28]

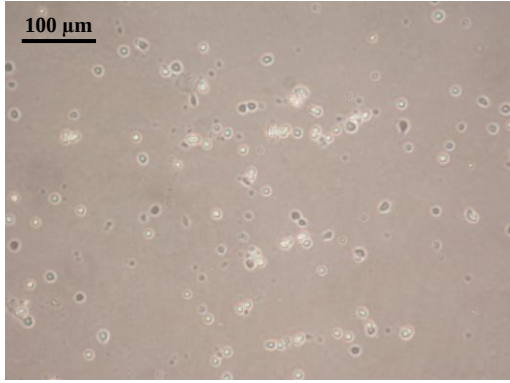
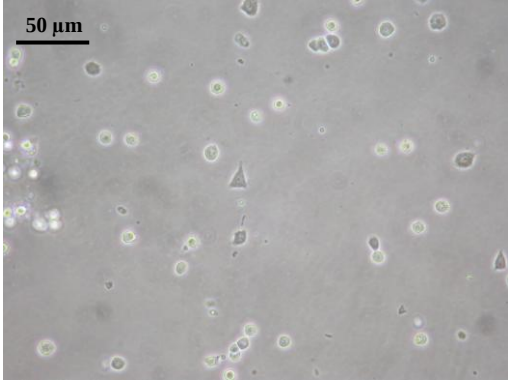
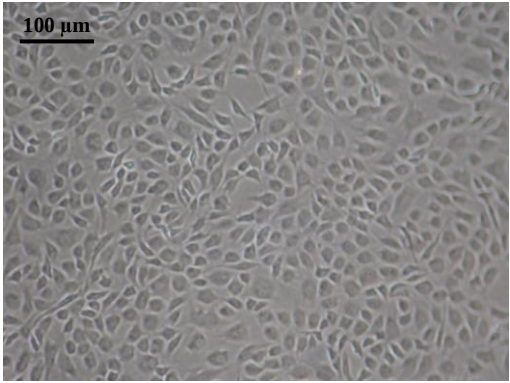
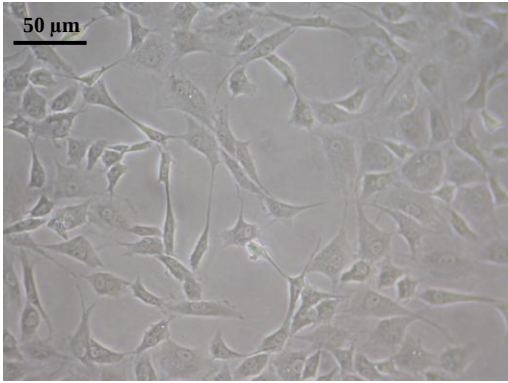
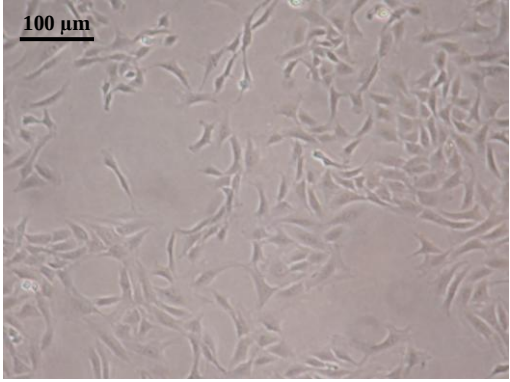
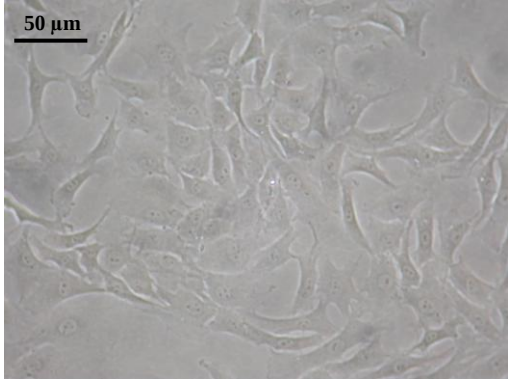
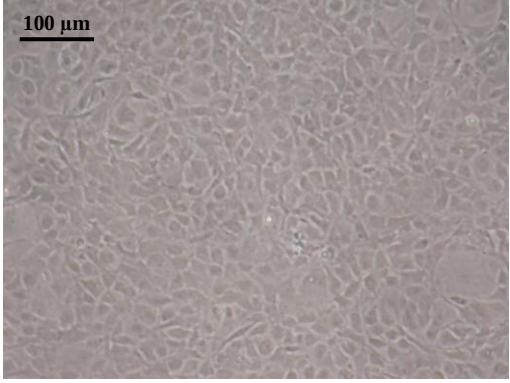
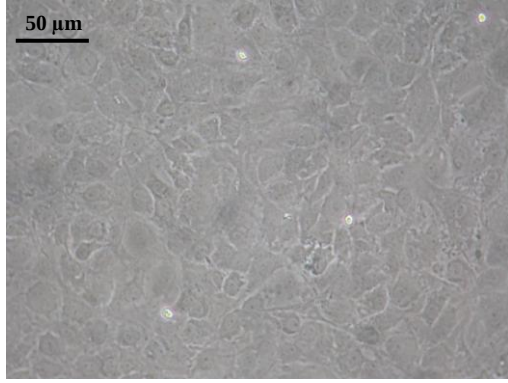
3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (chondrocytes) ใน scaffolds

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ chondrocyte ลงใน scaffolds สูตรตำรับ SF6 และ SF/25C ซึ่งได้แสดงคุณสมบัติทางกายภาพไว้ในตารางที่ 10

3.3 การศึกษาการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์บน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay

ทดสอบความมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจาก activity ของเอนไซม์ใน mitochondria ของเซลล์ ซึ่งถ้ามีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บน scaffolds เอนไซม์ mitochondria reductase ในเซลล์จะสามารถทำการเปลี่ยนแปลงสีเหลืองของสาร MTT ไปเป็นตะกอนสีม่วงน้ำตาลที่ไม่ละลายน้ำของ formazan [29] จากผลการทดลองพบว่ามีตะกอนสีม่วงน้ำตาลของ formazan เกิดขึ้นบน scaffolds ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (รูปที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้น control โดยสังเกตด้วยตาเปล่าเห็นว่า SF6 scaffold มีตะกอนสีม่วงน้ำตาลจางๆเกิดขึ้นกระจายอยู่เฉพาะบริเวณผิวหน้าของชิ้น scaffold เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์เจริญมีชีวิตอยู่บน SF6 scaffold ได้เล็กน้อยเท่านั้น ส่วน SF/25C พบว่ามีตะกอนสีเข้มกระจายอย่างสม่ำเสมอที่บริเวณผิวหน้าของ scaffold และยังมีตะกอนกระจายอยู่รอบข้างชิ้น scaffold อีกด้วย แสดงว่าเซลล์สามารถเจริญมีชีวิตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบน SF/25C

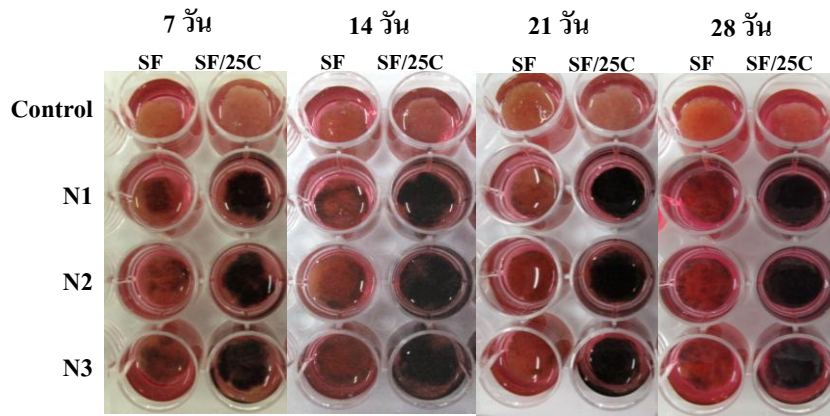
ตารางที่ 9 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่แยกได้จากหนูทดลอง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงใน Tissue culture flask

Passage number	รูปถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
	กำลังขยาย 100 เท่า	กำลังขยาย 200 เท่า
Passage 0 (1 วันหลังจากการทำการแยกเซลล์)		
Passage 1 (3 วันหลังจากทำการ subculture)		
Passage 2 (4 วันหลังจากทำการ subculture)		
Passage 3 (4 วันหลังจากทำการ subculture)		

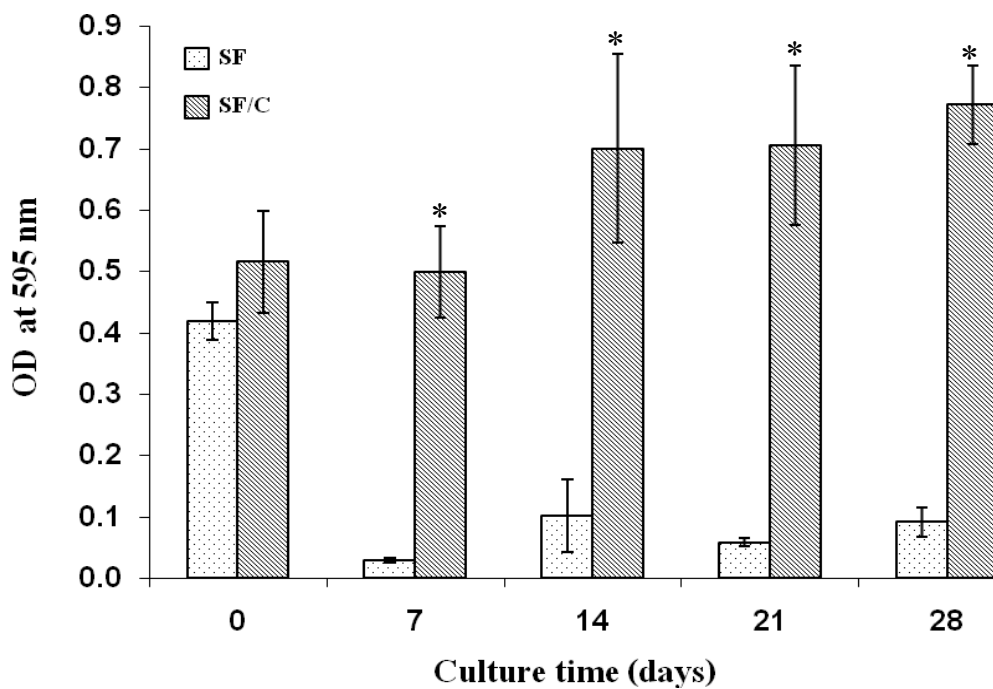
ตารางที่ 10 ชนิดของ scaffolds ที่ได้ทำการคัดเลือกเพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ

ชนิด scaffolds	สูตรตำรับ	ลักษณะ scaffold	คุณสมบัติทางกายภาพ
Pure silk fibroin (SF)	SF6		ลักษณะพื้นผิวเรียบ, ขนาดรูพรุน 65.33 ± 16 μm , %porosity $\sim 89\%$, %water uptake $\sim 91\%$, compressive modulus ~ 148 kPa
Fibroin ผสมกับ collagen (SF/C)	SF/25C		ลักษณะพื้นผิวขรุขระ, ขนาดรูพรุน 92.79 ± 21 μm , %porosity $\sim 61\%$, %water uptake $\sim 95\%$, compressive modulus ~ 1532 kPa

เมื่อทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย formazan ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากผลการทดลอง (รูปที่5) พบว่าค่าดูดกลืนแสงหลังจากทำการ seeding เซลล์บน SF6 scaffold (0 วัน) มีค่าประมาณ 0.4 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 7 วัน ค่าดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าลดลงและน้อยกว่า 0.2 ซึ่งแสดงว่าเซลล์มีการตายเกิดขึ้นหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงบน SF6 scaffold อาจเนื่องมาจากเซลล์ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงได้ นอกจากนี้เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึง 28 วัน ยังพบว่าค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไม่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ จากผลที่ได้รับนี้จึงแสดงให้เห็นว่า SF6 scaffold ไม่สามารถสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ ซึ่งผลที่ได้รับนี้ตรงข้ามกับงานวิจัยของ Wang, Y., et al [30] ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ chondrocytes บน 3-D silk fibroin scaffold ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี transforming growth factor β (TGF- β 1) สามารถสนับสนุนให้เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น ผลที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของ medium ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ chondrocyte ใน DMEM medium ที่มี 10%FBS เท่านั้น ส่วนการเจริญของเซลล์ใน SF/25C scaffold พบว่าเซลล์มีการเจริญได้ดีและแตกต่างจาก SF scaffold อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์บน scaffolds พบว่าเซลล์ที่เจริญบน SF/25C scaffold มีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นด้วย จากผลที่ได้ทั้งหมดนี้แสดงว่า collagen ที่ผสมอยู่ใน scaffold ช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีกว่า scaffold ที่เตรียมจาก fibroin เพียงอย่างเดียว โดยไม่จำเป็นต้องใช้ growth factor



รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องดิจิทัลของชิ้น scaffolds ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหลังจากบ่มในอาหารที่มี MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



รูปที่ 5 กราฟแสดงการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงบน scaffolds สูตรต่าง ๆ * $P < 0.05$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (N=3)

3.4 การศึกษาการยึดเกาะและการกระจายของเซลล์บน scaffolds ด้วยเทคนิค Histochemistry

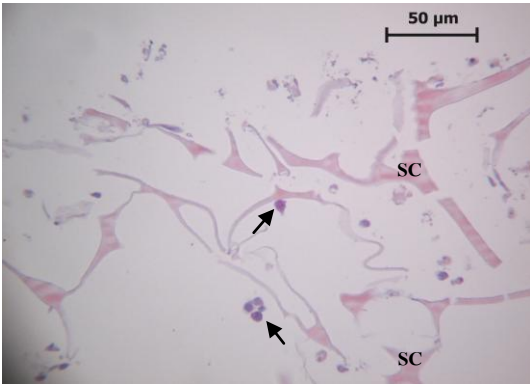
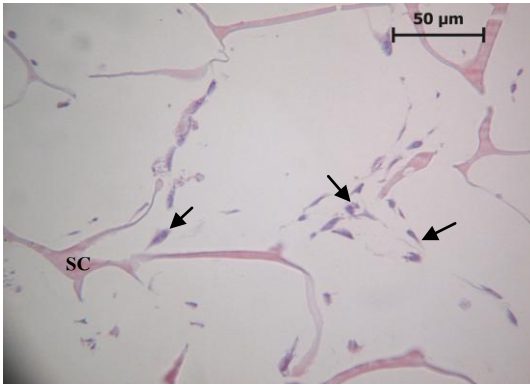
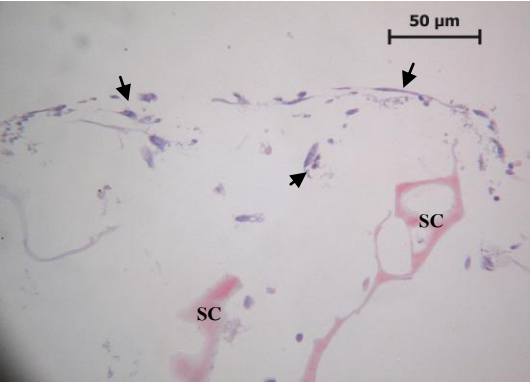
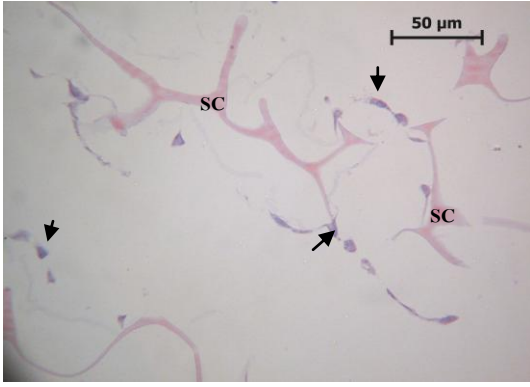
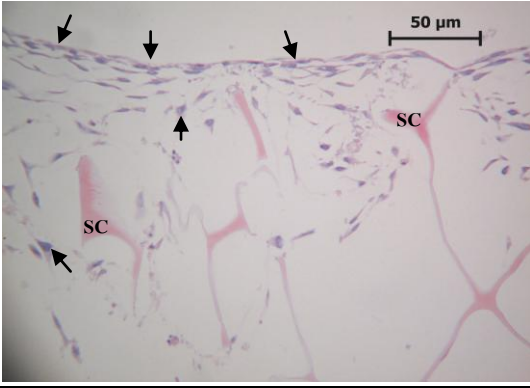
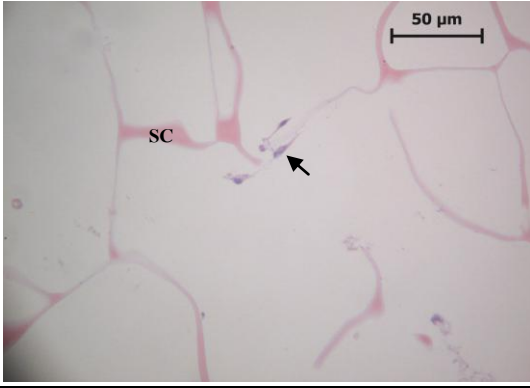
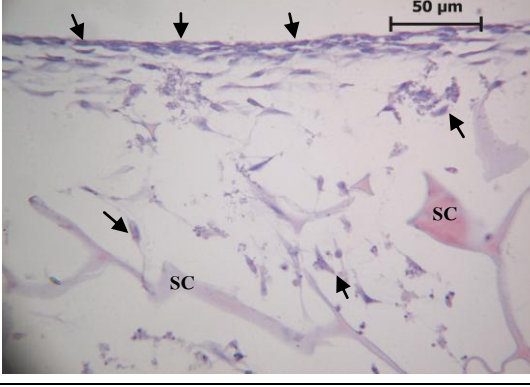
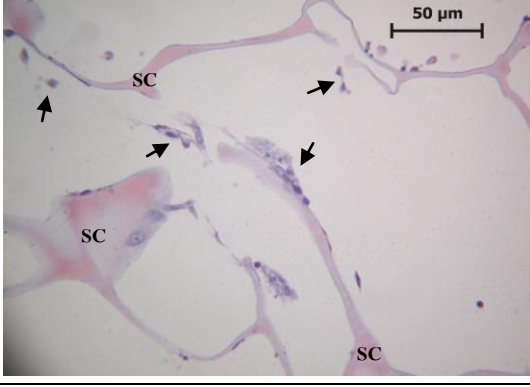
ในการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบน scaffolds ทั้ง 2 ชนิด เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วยเทคนิค histochemistry ซึ่งจะมีการตรวจโดยใช้สีย้อม hematoxylin และ eosin โดยสีย้อม hematoxylin จะย้อมติดที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์ทำให้เห็นเป็นสีม่วง และสีย้อม eosin จะย้อมติดที่บริเวณ cytoplasm ของเซลล์ทำให้เห็นเป็นสีแดงชมพู โดยเมื่อทำการย้อมสี scaffolds ที่มีเซลล์อยู่พบว่า scaffolds

สามารถดูดซับสี hematoxylin และ eosin ได้ทำให้เห็นโครงร่างรูพรุนมีสีชมพูหรือม่วงอ่อนๆ และเห็นนิวเคลียสของเซลล์บน scaffolds ติดสีม่วงเข้มอย่างชัดเจน จากภาพถ่ายสไลด์เนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ SF6 scaffold (ตารางที่ 11) สังเกตได้ว่าในระยะ 7 -14 วันที่ จะเห็นได้ว่ามีเซลล์เจริญยึดเกาะอยู่ปริมาณน้อยทั้งที่บริเวณผิวหน้า (surface zone) และภายใน (inner zone) scaffold โดยที่เซลล์มีการเจริญกระจายตัวห่างกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึง 28 วัน พบว่าเซลล์ที่เจริญบนผิวหน้าของ SF6 scaffold มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและมีเจริญปกคลุมบริเวณผิวหน้าของ scaffold ส่วนการเจริญของเซลล์บน SF/25C scaffolds (ตารางที่ 12) ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 7-28 วัน พบว่ามีเซลล์เป็นจำนวนมาก ยึดเกาะและมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมออยู่ทั้งบริเวณผิวหน้าและภายใน scaffold ที่น่าสนใจก็คือเซลล์ส่วนใหญ่มีการเจริญหนาแน่นและยึดเกาะกับ SF6 และ SF/C scaffolds ที่บริเวณผิวหน้าได้ดีกว่าที่บริเวณภายในของ scaffold อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการ seeding เซลล์นั้น ได้ทำการเติม suspension cells ที่บริเวณผิวหน้าของ scaffolds จึงทำให้เซลล์มีการเจริญและกระจายอยู่บนผิวหน้าของ scaffolds มากกว่าที่จะเคลื่อนที่เข้าไปภายใน scaffolds ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ใกล้ชิดกันบริเวณผิวหน้าของ scaffolds จึงมีโอกาสสื่อสารกันและส่งสัญญาณกันระหว่างเซลล์ (cells-cells interaction) ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ารูปร่างของเซลล์ที่เจริญบนผิวหน้า scaffolds มีรูปร่างลักษณะค่อนข้างแบนเรียวยาวคล้ายกับรูปร่างของเซลล์ที่เลี้ยงแบบ monolayer ใน tissue culture flask เซลล์ที่เจริญอยู่ภายใน scaffolds นั้นจะพบว่ามีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมคล้ายกับเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนปกติ แสดงว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงร่าง 3 มิติ สามารถสนับสนุนให้เซลล์รักษาลักษณะรูปร่างได้เหมือนกับเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อปกติได้

3.5 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์บน scaffolds ด้วย Scanning Electron Microscope (SEM)

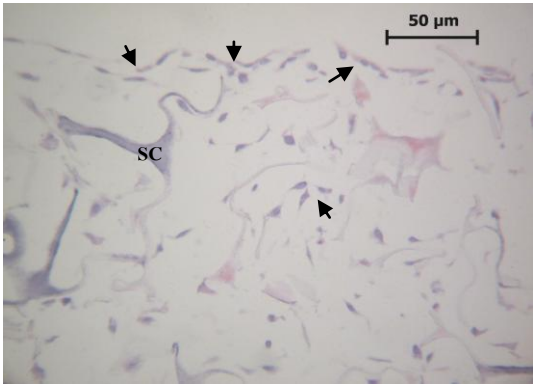
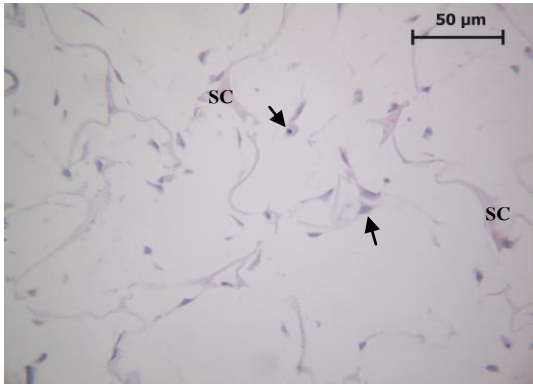
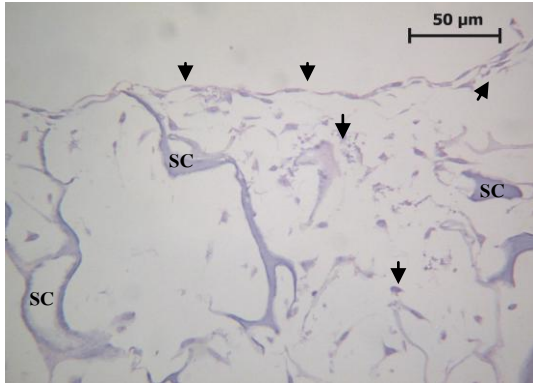
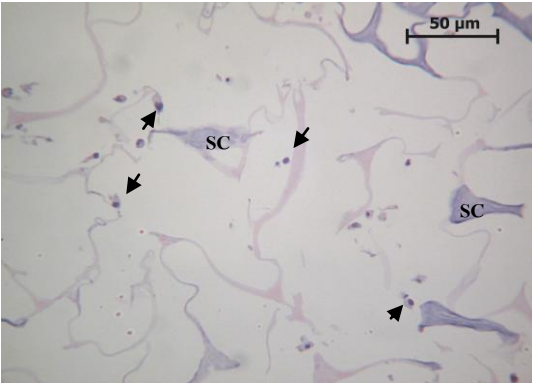
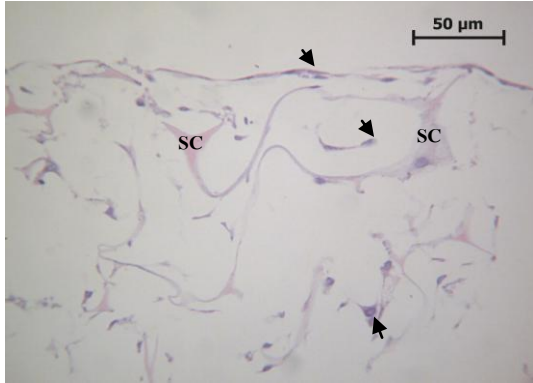
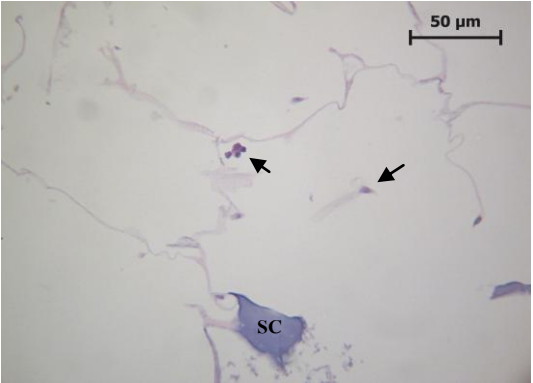
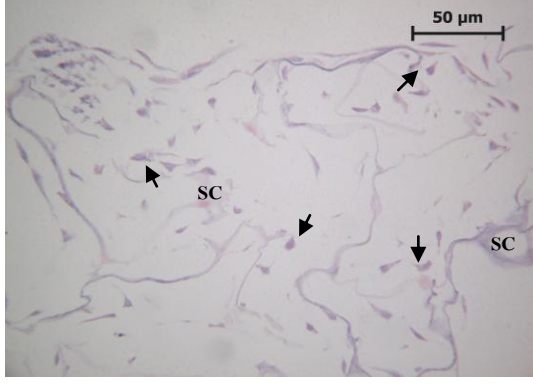
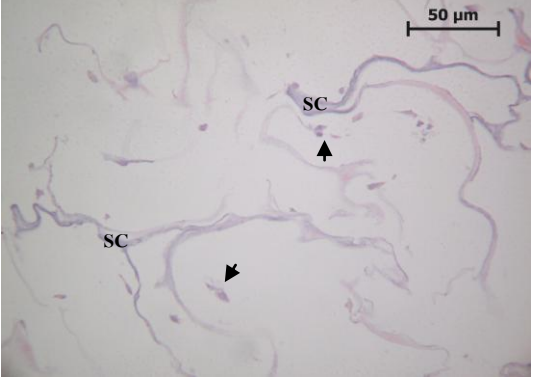
จากภาพถ่าย SEM แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่เจริญอยู่บน scaffolds หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเป็นเวลา 28 วัน เซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงบน SF6 และ SF/25C scaffold มีการเจริญได้ดีบริเวณผิวหน้าของ scaffold ซึ่งตรงกับผลที่ได้รับจากภาพถ่าย histology โดยสังเกตเห็นเซลล์มีรูปร่างลักษณะแบนเรียวยาวคล้ายกระสวย (flattened shape) เจริญปกคลุมพื้นผิวหน้าของ scaffolds เมื่อเทียบกับ control ที่ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งคาดว่าเซลล์อาจจะมีการ interaction กันและสร้าง extracellular matrix ออกมารอบๆเซลล์ทำให้ปกคลุมรูพรุนของ scaffolds

ตารางที่ 11 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญยึดเกาะบน SF6 scaffold (กำลังขยาย 400 เท่า)

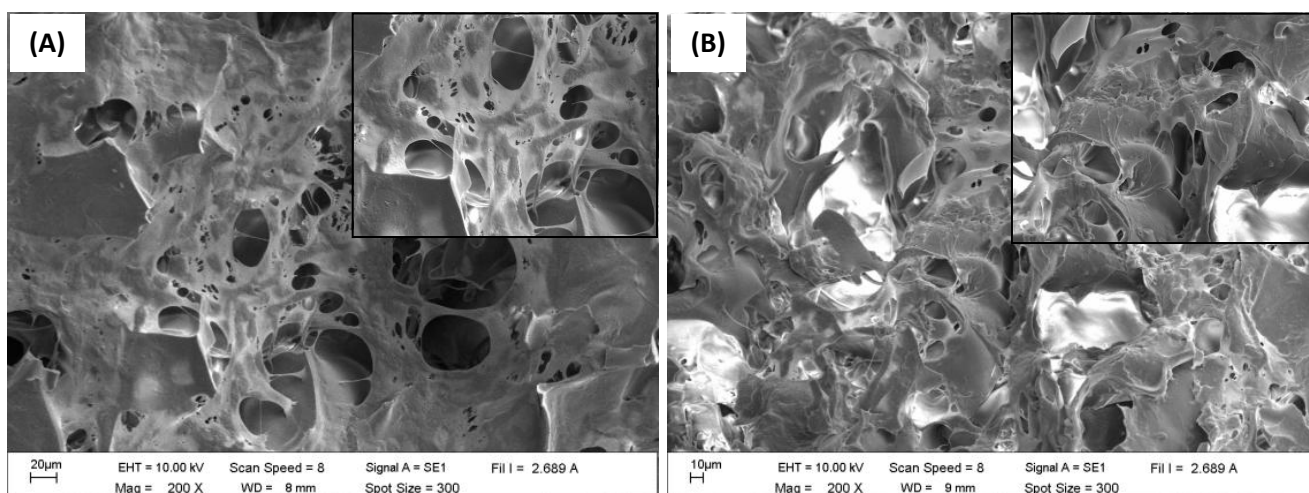
ระยะเวลา	Surface zone	Inner zone
7 วัน		
14 วัน		
21 วัน		
28 วัน		

SC = scaffold

ตารางที่ 12 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญยึดเกาะบน SF/25C scaffold (กำลังขยาย 400 เท่า)

ระยะเวลา	Surface zone	Inner zone
7 วัน		
14 วัน		
21 วัน		
28 วัน		

SC = scaffold

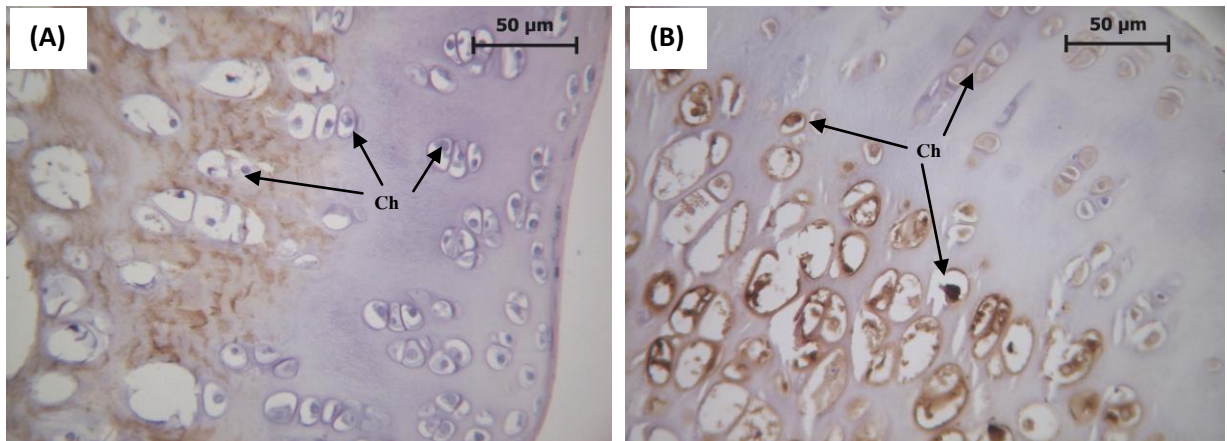


รูปที่ 6 ภาพถ่าย SEM แสดงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของ scaffold หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน (A) SF6 scaffold (B) SF/25C scaffold

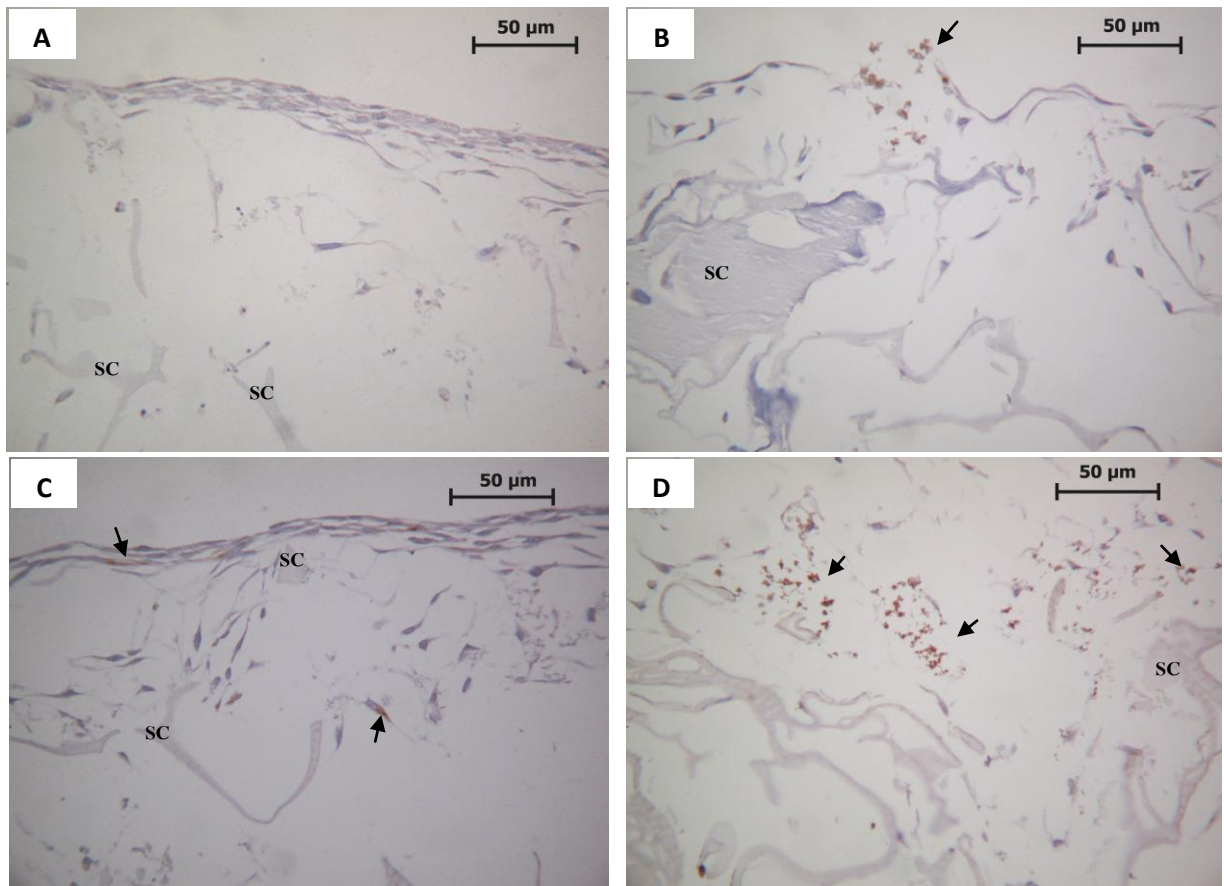
3.6 การศึกษาการสร้าง extracellular matrix ของเซลล์กระดูกอ่อนที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry

ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการสร้าง extracellular matrix ของเซลล์ chondrocytes ที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ทั้ง 2 ดำรับ ด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ type II collagen และ aggrecan รูปที่ 7 แสดงภาพถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของหนู rat ที่ใช้เป็น positive control สำหรับการศึกษาการสร้าง Type II collagen และ aggrecan จากภาพถ่าย สังเกตเห็นบริเวณเนื้อเยื่อรอบๆ เซลล์ chondrocyte จะติดสีน้ำตาล บ่งชี้ว่ามีการแสดงออกของ type II collagen (7A) สำหรับ aggrecan นั้นพบว่ามีการแสดงออกของ aggrecan ที่ตำแหน่งภายในเซลล์ chondrocytes ที่อยู่ใน lacunae โดยสังเกตเห็นสีน้ำตาลภายในเซลล์อย่างชัดเจน (7B)

เมื่อศึกษาการสร้าง type II collagen ของเซลล์ chondrocytes ที่เพาะเลี้ยงใน SF6 และ SF/25C scaffold พบว่ามีการสร้าง type II collagen ที่บริเวณผิวหน้าของ SF/25C scaffold มากกว่าของ SF6 scaffold (รูปที่ 8 A-B) ในทำนองเดียวกัน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลล์ chondrocytes ที่เพาะเลี้ยงใน SF/25C scaffold สามารถสร้าง aggrecan (ลูกศร) ได้มากกว่าที่เพาะเลี้ยงใน SF6 scaffold (รูปที่ 8 C-D) ผลการทดลองที่ได้นี้จึงแสดงให้เห็นว่าการผสม collagen เข้าไปใน scaffold สามารถสนับสนุนให้เซลล์สร้าง extracellular matrix ที่สำคัญเช่น type II collagen และ aggrecan ได้ดีกว่า scaffold ที่เตรียมจาก fibroin เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงชิ้นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของหนู rat ที่ใช้เป็น positive control สำหรับการศึกษการสร้าง Type II collagen (A) และ Aggrecan (B) ด้วยเทคนิค immunohistochemistry (กำลังขยาย 400 เท่า, tissue thickness = 3 μ m, ch = chondrocyte cells)



รูปที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการสร้าง Extracellular matrix (ถูกสร) ได้แก่ type II collagen (A-B) และ Aggrecan (C-D) ของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เจริญอยู่ใน SF6 scaffold (A, C) และ SF/25C scaffold (B, D) เป็นระยะเวลา 28 วัน (กำลังขยาย 400 เท่า, tissue thickness = 3 μ m, SC = scaffold)

บทที่ 3

สรุปผลการทดลอง

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (articular cartilage) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ประกอบด้วยเซลล์ chondrocytes ที่อยู่ใน extracellular matrix (ECM) โดยมี collagen type II และ aggrecan เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ค้ำจุน เมื่อเนื้อเยื่อบริเวณกระดูกอ่อนได้รับบาดเจ็บ จะมีการซ่อมแซมตัวเองได้น้อยมากเนื่องจากเป็นบริเวณที่ไม่มีระบบเลือดไปหล่อเลี้ยง อีกทั้งเซลล์ chondrocytes มีจำนวนจำกัด และไม่สามารถเคลื่อนที่ไปซ่อมแซมยังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บได้ ดังนั้นการรักษาจึงสามารถทำได้โดยการผ่าตัด และการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัด เช่น การขาดแคลนเนื้อเยื่อ การปฏิเสธเนื้อเยื่อของผู้ให้ และอาจเกิดการติดเชื้อได้ นอกจากการรักษาโดยการผ่าตัดและปลูกถ่ายเนื้อเยื่อแล้ว วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีอีกทางหนึ่งที่น่าสนใจในการที่จะช่วยทดแทน ซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่สูญเสียไป โดยการนำเซลล์กระดูกอ่อนจากผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนให้มากเพียงพอ และทำการเพาะเลี้ยงบนวัสดุโครงร่าง 3 มิติ (scaffolds) ก่อนที่จะนำไปปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกาย

ในปัจจุบันนี้ เทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีความก้าวหน้าขึ้นอย่างรวดเร็ว และ ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสบความสำเร็จ คือ การเลือกใช้วัสดุชีวภาพที่มีคุณสมบัติให้เซลล์ยึดเกาะได้ดี และค้ำจุนในการเจริญเติบโตของเซลล์ โครงร่างรูพรุนสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ดีนั้น ชั้นรูพรุนควรจะมี ความแข็งแรงเพียงพอ เพื่อสนับสนุนให้เซลล์เกาะติดและเจริญ และควรมีความเป็นรูพรุนสูง เพื่อช่วยให้เซลล์มีโอกาสนในการเคลื่อนย้าย และขยายตัวเพิ่มจำนวน นอกจากนี้วัสดุชีวภาพที่เลือกใช้ควรเป็นสารที่สามารถเข้ากับร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ดี ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย และมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ได้ดี

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกใช้ไฟโบรอิน (SF) และไฟโบรอินผสมคอลลาเจน (SF/C) ในการเตรียมเป็นโครงร่างรูพรุน 3 มิติ ด้วยเทคนิค freeze drying โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาปัจจัยในการผลิตต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของโครงร่างรูพรุน 3 มิติ ไฟโบรอิน และคอลลาเจนเป็นวัสดุธรรมชาติที่มีมากและสามารถผลิตได้เองในประเทศไทย มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับร่างกาย มีความปลอดภัยสูง ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย จึงเหมาะสมที่จะนำมาเตรียมเป็นโครงร่างรูพรุน 3 มิติ ที่ให้เซลล์ยึดเกาะ

จากการศึกษาพบว่า SF และ SF/C scaffolds มีลักษณะเป็นก้อนนุ่มสีขาวคล้ายฟองน้ำ (sponge) แต่มีความเปราะแตกง่ายและไม่คงตัวในน้ำ เมื่อแช่ในเมทานอล (methanol treatment) สามารถเหนียวทำให้ scaffolds มีความเหนียวขึ้นและคงตัวในน้ำได้ดีทุกตำรับ เนื่องจาก methanol สามารถเหนียวทำให้ fibroin เปลี่ยน conformation จาก amorphous ไปเป็น crystalline

จากการศึกษารูปร่างลักษณะพื้นผิว และขนาดของรูพรุนด้วยภาพถ่าย SEM พบว่า SF scaffolds มีลักษณะพื้นผิวเรียบและผนังบาง เมื่อปริมาณของ SF ในตำรับเพิ่มมากขึ้น พบว่า scaffolds มีขนาดรูพรุนลดลง การกระจายของรูพรุนสม่ำเสมอ มากขึ้น และมี interconnected pore มากขึ้น ส่งผลให้ scaffold สามารถทนต่อแรงอัดได้มากขึ้นด้วย โดยพบว่า scaffolds ที่เตรียมจาก fibroin 1%w/v มีลักษณะของรูพรุนที่เป็นแผ่น มีขนาดรูพรุน $\sim 148 \mu\text{m}$ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ fibroin เป็น 2, 4 และ 6% พบว่า scaffolds ที่ได้มีการกระจายของรูพรุนสม่ำเสมอและมีขนาดรูพรุน $\sim 70 \mu\text{m}$ ส่วนภาพถ่าย SEM ของ SF/C scaffold พบว่า มีลักษณะพื้นผิวที่หนากว่า และขรุขระมากกว่า SF scaffold แต่มีรูพรุนค่อนข้างน้อยกว่า SF scaffold และมีขนาดรูพรุน $\sim 90 \mu\text{m}$ เมื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของ scaffold พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ fibroin เพิ่มขึ้นจาก 1% จนถึง 6%w/v เปอร์เซ็นต์ความเป็นรูพรุนของ scaffolds ก็จะเพิ่มมากขึ้นจาก 62% จนถึง 89% ในขณะที่ SF/C scaffolds มีความเป็นรูพรุนลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ คอลลาเจนในตำรับมากขึ้น นอกจากนี้พบว่า scaffolds ที่เตรียมได้ทุกตำรับสามารถดูดซับน้ำได้ดีมากกว่า 90% และเมื่อพิจารณาถึงความแข็งแรงของ scaffolds พบว่า SF scaffolds มีความสามารถทนต่อแรงอัดค่อนข้างต่ำซึ่งทำให้ scaffolds เปราะและแตกได้ง่าย เมื่อเพิ่ม collagen เข้าไปในตำรับสามารถเพิ่มความแข็งแรงให้กับ scaffolds ได้มากขึ้น

ในการศึกษาความสามารถในการเกาะติด การเจริญเติบโต และการสร้าง ECM ของเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในโครงร่างที่ทำการพัฒนาขึ้น 2 สูตรตำรับ SF6 และ SF/25C นั้น ได้ใช้ primary chondrocytes ที่แยกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อของหนูขาว ทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ใน tissue culture flask พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเกิดการ dedifferentiate เปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะไปเป็น fibroblast-like cells มากขึ้น เมื่อมีการ subculture เพิ่มขึ้น นำเซลล์ใน passage ที่ 2 มาทำการเพาะเลี้ยงใน scaffolds ทั้ง 2 ตำรับ เป็นเวลา 28 วัน จากภาพถ่าย SEM และการย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะอยู่บน scaffolds ทั้ง 2 ตำรับได้ โดยเซลล์ส่วนใหญ่จะยึดเกาะได้ดีบริเวณผิวหน้าของชั้น scaffolds และมีรูปร่างแบนเรียวยาวคล้ายกระสวย ที่น่าสนใจคือในตำรับ SF/25C สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะและกระจายเข้าไปเจริญภายใน scaffolds ได้ดี อีกทั้งยังสามารถรักษารูปร่างของเซลล์แบบ spherical shape เหมือนกับเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนปกติได้อีกด้วย นอกจากนี้เมื่อทดสอบการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay เป็นเวลานาน 28 วัน พบว่า chondrocytes ที่เลี้ยงใน SF/C scaffolds สามารถเจริญมีชีวิตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่า ที่เลี้ยงใน SF scaffolds ที่สำคัญยังพบว่า SF/25C scaffolds สามารถสนับสนุนให้เซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสร้าง extracellular matrix ทั้ง type II collagen และ aggrecan ได้ดีอีกด้วย ถึงแม้ว่าในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ได้มีการเติม growth factor ผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่า scaffolds ที่เตรียมขึ้นจากสารผสมไฟโบรอินตำรับ SF/25C มีประสิทธิภาพในการนำไปพัฒนาต่อสำหรับการใช้ประโยชน์ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยในอนาคต

บทที่ 4

เอกสารอ้างอิง

1. Lin, F., et al., *Deposition behavior and properties of silk fibroin scaffolds soaked in simulated body fluid*. Materials Chemistry and Physics, 2008. **111**(1): p. 92-97.
2. Kim, U.-J., et al., *Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2775-2785.
3. Lv, Q. and Q. Feng, *Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2006. **17**(12): p. 1349-1356.
4. Nazarov, R., H.-J. Jin, and D.L. Kaplan, *Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin*. Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 718-726.
5. Lv, Q., et al., *Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture*. Polymer, 2005. **46**(26): p. 12662-12669.
6. Zhan, J., et al., *Preparation of 3-D porous fibroin scaffolds by freeze drying with treatment of methanol solutions*. Chinese Science Bulletin, 2007. **52**(13): p. 1791-1795.
7. Lu, Q., et al., *Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 2004. **25**(22): p. 5227-5237.
8. Frenkel, S.R. and P.E. Di Cesare, *Scaffolds for Articular Cartilage Repair*. Annals of Biomedical Engineering, 2004. **32**(1): p. 26-34.
9. Getgood, A., T.P.S. Bhullar, and N. Rushton, *Current concepts in articular cartilage repair*. Orthopaedics and Trauma, 2009. **23**(3): p. 189-200.
10. Stoop, R., *Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage*. Injury, 2008. **39**(1, Supplement 1): p. 77-87.
11. Langer, R. and J. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
12. Leong, K.F., C.M. Cheah, and C.K. Chua, *Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs*. Biomaterials, 2003. **24**(13): p. 2363-2378.
13. Leong, K.F., et al., *Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2008. **1**(2): p. 140-152.

14. Byler, D.M. and S. Heino, *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra*. Biopolymers, 1986. **25**(3): p. 469-487.
15. Kong, J. and S. Yu, *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. Acta Biochim Biophys Sin, 2007. **39**(8): p. 549-559.
16. Surewicz, W.K., H.H. Mantsch, and D. Chapman, *Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment*. Biochemistry, 1993. **32**(2): p. 389-394.
17. Hino, T., M. Tanimoto, and S. Shimabayashi, *Change in secondary structure of silk fibroin during preparation of its microspheres by spray-drying and exposure to humid atmosphere*. Journal of Colloid and Interface Science, 2003. **266**(1): p. 68-73.
18. Wilson, D., R. Valluzzi, and D. Kaplan, *Conformational Transitions in Model Silk Peptides*. Biophysical Journal, 2000. **78**(5): p. 2690-2701.
19. Sashina, E., et al., *Structure and solubility of natural silk fibroin*. Russian Journal of Applied Chemistry, 2006. **79**(6): p. 869-876.
20. Monti, P., et al., *Raman spectroscopic characterization of <I>Bombyx mori</I> silk fibroin: Raman spectrum of Silk I*. Journal of Raman Spectroscopy, 2001. **32**(2): p. 103-107.
21. Paola, T. and M. Patrizia, *Vibrational infrared conformational studies of model peptides representing the semicrystalline domains of <I>Bombyx mori</I> silk fibroin*. Biopolymers, 2005. **78**(5): p. 249-258.
22. Marsano, E., et al., *Regenerated cellulose-silk fibroin blends fibers*. International Journal of Biological Macromolecules, 2008. **43**(2): p. 106-114.
23. Bryan, M.A., et al., *FTIR Studies of Collagen Model Peptides: Complementary Experimental and Simulation Approaches to Conformation and Unfolding*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(25): p. 7877-7884.
24. She, Z., et al., *Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold*. Polymer Degradation and Stability, 2008. **93**(7): p. 1316-1322.
25. Wang, Y., et al., *In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds*. Biomaterials. **29**(24-25): p. 3415-3428.
26. Capito, R.M. and M. Spector, *Effect of expansion medium on ex vivo gene transfer and chondrogenesis in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro*. Osteoarthritis and Cartilage, 2006. **14**(12): p. 1203-1213.

27. Hauselmann, H., et al., *Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads*. J Cell Sci, 1994. **107**(Pt 1): p. 17 - 27.
28. Schulze-Tanzil, G., *Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair*. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, 2009. **191**(4): p. 325-338.
29. Kang, J.Y., et al., *Novel porous matrix of hyaluronic acid for the three-dimensional culture of chondrocytes*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **369**(1-2): p. 114-120.
30. Wang, Y., et al., *Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes*. Biomaterials, 2006. **27**(25): p. 4434-4442.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ขนาดรูพรุนของ scaffolds

ตารางแสดง ขนาดรูพรุนของ scaffolds สูตรตำรับต่างๆ

จำนวนรูพรุน N=30	Scaffolds สูตรตำรับต่างๆ						
	SF1	SF2	SF4	SF6	SF/5C	SF/10C	SF/25C
1	263.64	46.06	54.52	123.82	106.75	33.33	95.04
2	93.94	52.62	87.84	76.04	76.66	75.76	65.70
3	115.19	76.00	74.50	66.22	97.02	96.69	136.14
4	239.39	55.27	69.67	78.13	49.33	72.85	100.05
5	154.78	76.87	57.87	59.38	81.87	103.21	88.83
6	93.94	74.16	56.59	62.50	85.07	82.43	115.63
7	261.66	49.82	69.07	57.62	56.37	74.84	93.23
8	144.57	65.46	81.78	51.54	76.48	42.10	129.49
9	141.42	55.27	99.95	57.03	71.52	128.57	81.07
10	200.57	118.56	62.37	62.27	100.37	81.82	98.08
11	106.06	103.64	79.51	62.03	76.00	78.20	91.00
12	185.74	110.55	59.97	58.13	67.76	123.61	103.88
13	220.21	135.28	74.81	42.04	47.91	85.07	85.30
14	221.54	105.06	73.26	68.25	86.78	93.94	145.91
15	141.94	135.69	67.73	72.69	97.16	82.04	109.42
16	146.99	96.31	84.81	53.22	142.46	86.78	83.21
17	223.61	95.87	63.25	50.87	83.81	116.93	85.30
18	97.02	76.04	63.68	56.34	66.46	73.23	56.25
19	102.90	81.42	96.93	74.28	54.55	116.03	76.10
20	69.76	55.63	92.32	44.42	88.71	57.58	102.17
21	156.41	66.67	68.67	84.14	78.79	97.72	75.58
22	93.99	77.14	109.04	82.21	67.76	109.76	92.81
23	59.54	77.14	39.38	65.63	39.51	69.70	100.20
24	82.43	48.49	45.03	76.04	72.03	77.26	114.74
25	111.79	45.05	42.51	66.88	52.92	112.45	82.03
26	39.39	139.39	69.07	87.50	61.81	118.03	68.61
27	132.12	127.20	49.31	53.22	84.52	109.13	70.23
28	86.67	75.76	97.54	58.71	71.00	65.28	88.94
29	162.76	79.54	65.39	56.34	63.64	105.54	66.88
30	280.76	85.55	89.08	52.39	81.54	62.47	81.79
Mean	147.69	82.92	71.51	65.33	76.22	87.74	92.79
SD	65.61	28.26	17.72	15.95	20.56	23.72	20.93

ภาคผนวก ข
ความเป็นรูพรุนของ scaffolds

ตาราง การประเมินความเป็นรูพรุนของ scaffolds

สูตร ตำรับ	ชั้นที่	Volume (ml)			V1-V3	V2-V3	% Porosity
		V1	V2	V3			$(V1-V3)/(V2-V3)*100$
SF1	1	5	5.2	4.8	0.2	0.4	50.00
	2	5	5.1	4.7	0.3	0.4	75.00
	3	5	5.2	4.7	0.3	0.5	60.00
SF2	1	5	5.2	4.6	0.4	0.6	66.67
	2	5	5.1	4.5	0.5	0.6	83.33
	3	5	5.1	4.5	0.5	0.6	83.33
SF4	1	5	5.1	4.4	0.6	0.7	85.71
	2	5	5.1	4.3	0.7	0.8	87.50
	3	5	5.1	4.4	0.6	0.7	85.71
SF6	1	5	5.1	4.2	0.8	0.9	88.89
	2	5	5.1	4.2	0.8	0.9	88.89
	3	5	5.1	4.2	0.8	0.9	88.89
SF/5C	1	5	5.1	4.6	0.4	0.5	80.00
	2	5	5.1	4.7	0.3	0.4	75.00
	3	5	5.1	4.6	0.4	0.5	80.00
SF/10C	1	5	5.1	4.7	0.3	0.4	75.00
	2	5	5.1	4.7	0.3	0.4	75.00
	3	5	5.1	4.7	0.3	0.4	75.00
SF/25C	1	5	5.1	4.8	0.2	0.3	66.67
	2	5	5.1	4.8	0.2	0.3	66.67
	3	5	5.1	4.9	0.1	0.2	50.00

ภาคผนวก ค
ความสามารถในการทนต่อแรงอัดของ scaffolds

ตาราง การประเมินความสามารถในการทนต่อแรงอัดของ fibroin scaffolds ด้วยเครื่อง instron

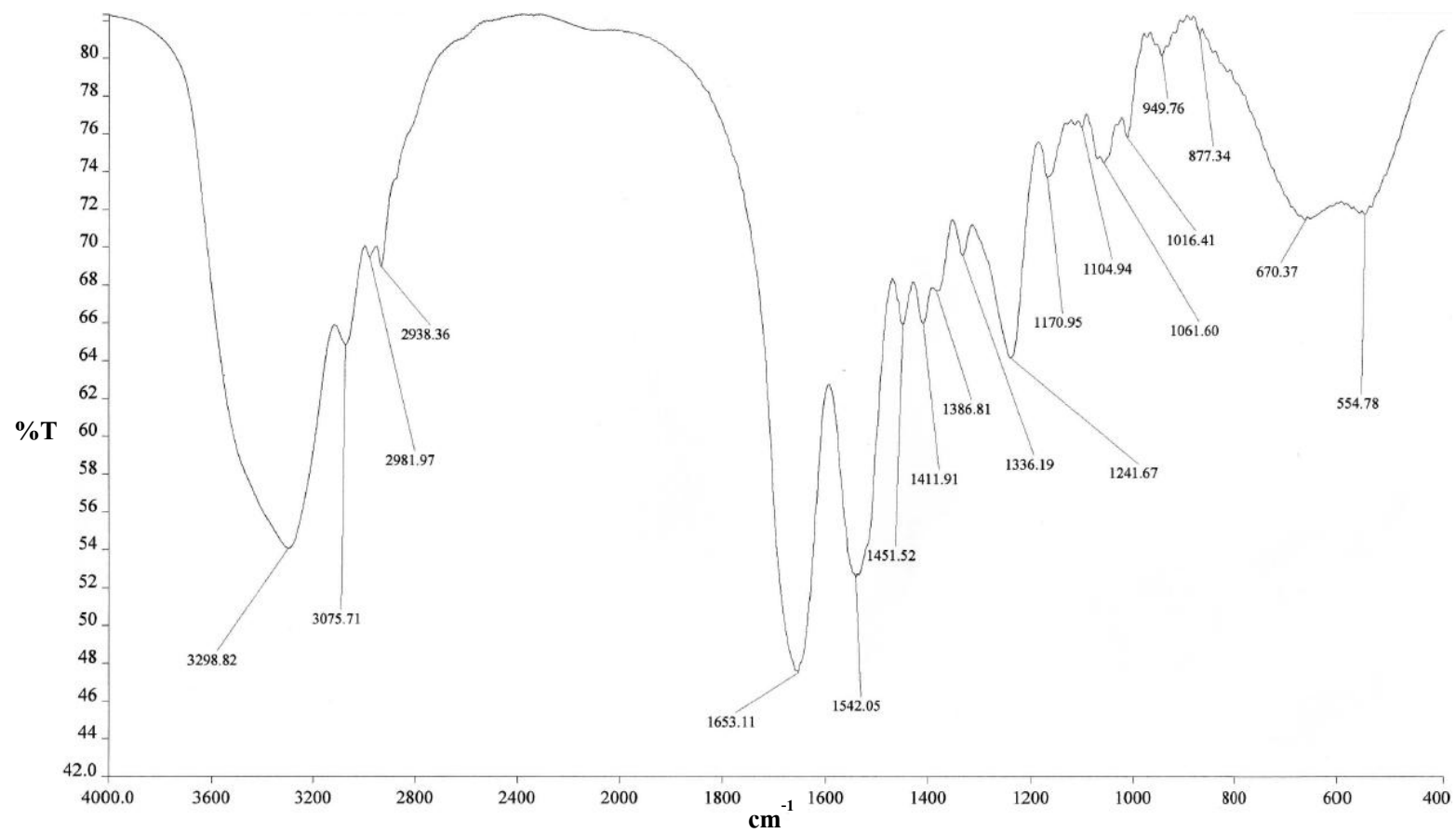
สูตร ตำรับ	ชั้นที่	D (mm)	L0 (mm)	L1 (mm)	L0-L1 (mm)	Strain = (L0-L1)/L0	r (mm)	$A = \pi r^2$ (mm ²)	Maximum load (N)	Stress = F/A (MPa)	Stress (kPa)	Modulus = Stress/strain (kPa)
SF1	1	10.23	4.50	1.50	3.00	0.67	5.12	82.23	4.21	0.05	51.20	76.80
	2	8.74	7.23	1.00	6.23	0.86	4.37	60.02	1.04	0.02	17.33	20.11
	3	7.45	7.51	0.90	6.61	0.88	3.73	43.61	1.48	0.03	33.94	38.56
SF2	1	8.74	7.23	1.85	5.38	0.74	4.37	60.02	2.22	0.04	36.99	49.71
	2	10.19	6.50	1.85	4.65	0.72	5.10	81.59	2.88	0.04	35.30	49.34
	3	9.37	6.80	0.80	6.00	0.88	4.69	68.98	2.69	0.04	38.99	44.19
SF4	1	11.43	9.98	0.85	9.13	0.91	5.72	102.65	4.72	0.05	45.98	50.26
	2	11.25	8.85	2.00	6.85	0.77	5.63	99.44	4.40	0.04	44.25	57.17
	3	11.06	7.16	0.55	6.61	0.92	5.53	96.11	5.05	0.05	52.54	56.92
SF6	1	11.40	11.15	1.00	10.15	0.91	5.70	102.11	14.38	0.14	140.83	154.70
	2	11.49	10.88	0.85	10.03	0.92	5.75	103.73	12.88	0.12	124.17	134.69
	3	11.79	9.40	0.90	8.50	0.90	5.90	109.22	15.26	0.14	139.72	154.52
SF/5C	1	11.83	5.65	0.40	5.25	0.93	5.92	109.96	8.84	0.0804	80.39	86.52
	2	8.28	5.83	1.20	4.63	0.79	4.14	53.87	5.31	0.0986	98.58	124.12
	3	8.09	5.70	0.65	5.05	0.89	4.05	51.42	3.34	0.0650	64.95	73.31
SF/10C	1	10.15	4.52	2.00	2.52	0.56	5.08	80.95	6.95	0.0859	85.86	154.00
	2	8.56	7.14	2.00	5.14	0.72	4.28	57.57	4.45	0.0773	77.29	107.37
	3	9.05	7.00	0.80	6.20	0.89	4.53	64.35	3.41	0.0530	52.99	59.83
SF/25C	1	6.38	4.46	2.00	2.46	0.55	3.19	31.98	38.00	1.1882	1188.17	2154.16
	2	6.31	6.44	2.00	4.44	0.69	3.16	31.28	16.78	0.5364	536.38	777.99
	3	5.66	5.89	2.00	3.89	0.66	2.83	25.17	27.64	1.0981	1098.10	1662.67

ภาคผนวก ง
ความสามารถในการดูดซับน้ำของ scaffolds

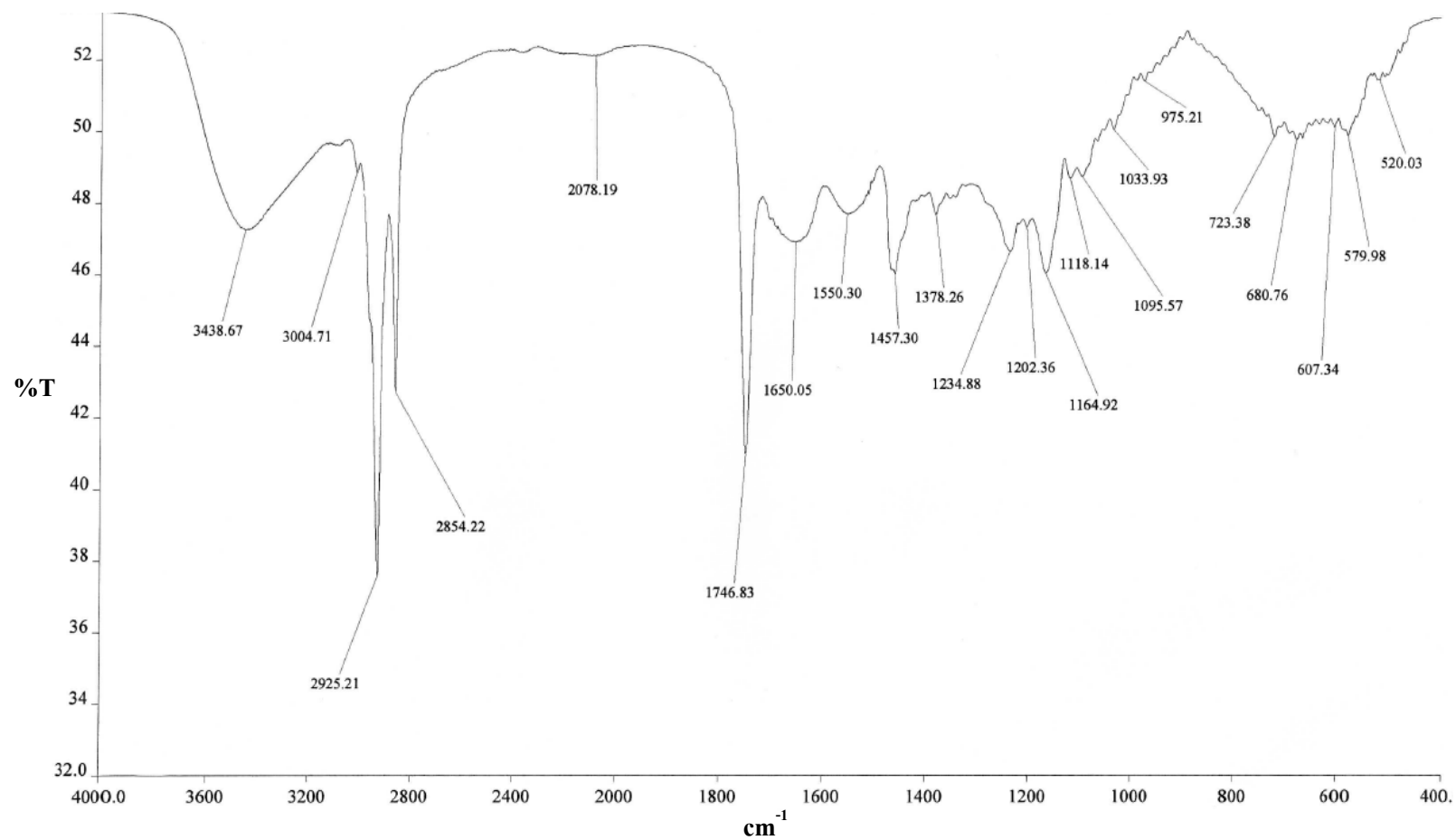
ตาราง การประเมินความสามารถในการดูดซับน้ำของ fibroin scaffolds สูตรตำรับต่างๆ

สูตรตำรับ	ชั้นที่	Wd (g)	Ws (g)	Swelling ratio (Ws-Wd)/Wd	% Water uptake [(Ws-Wd)/Ws]*100
SF1	1	0.0218	0.0013	15.769	94.04
	2	0.0257	0.0018	13.278	93.00
	3	0.0186	0.0007	25.571	96.24
SF2	1	0.0391	0.0026	14.038	93.35
	2	0.0449	0.0030	13.967	93.32
	3	0.0395	0.0025	14.800	93.67
SF4	1	0.0981	0.0056	16.518	94.29
	2	0.0701	0.0053	12.226	92.44
	3	0.0902	0.0059	14.288	93.46
SF6	1	0.1122	0.0078	13.385	93.05
	2	0.1007	0.0085	10.847	91.56
	3	0.0967	0.0084	10.512	91.31
SF/5C	1	0.0449	0.0020	21.450	95.55
	2	0.0291	0.0019	14.316	93.47
	3	0.0368	0.0023	15.000	93.75
SF/10C	1	0.0476	0.0024	18.833	94.96
	2	0.0497	0.0018	26.611	96.38
	3	0.0263	0.0015	16.533	94.30
SF/25C	1	0.0312	0.0014	21.286	95.51
	2	0.0199	0.0009	21.111	95.48
	3	0.0280	0.0013	20.538	95.36

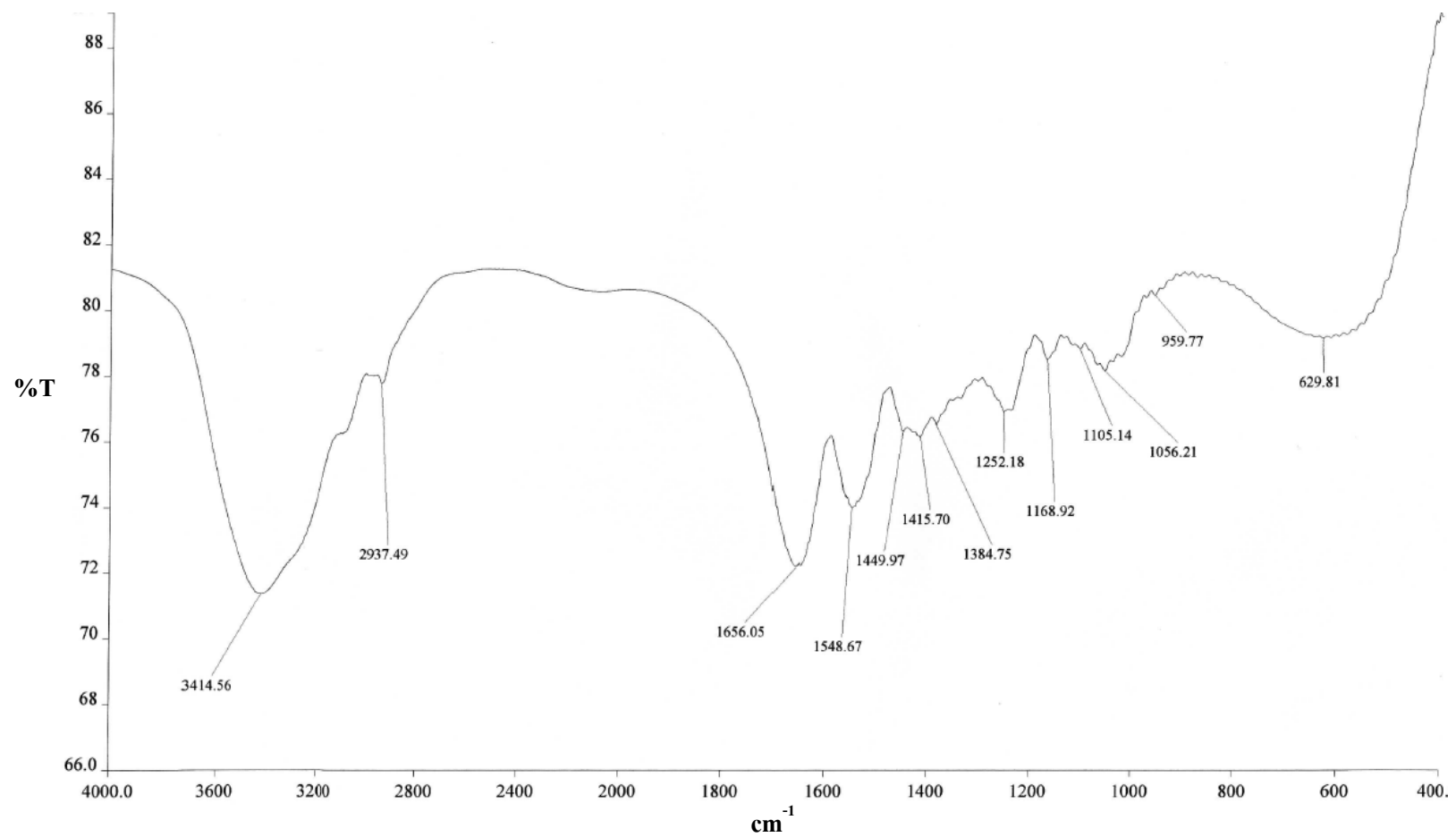
ภาคผนวก จ
FTIR spectrum



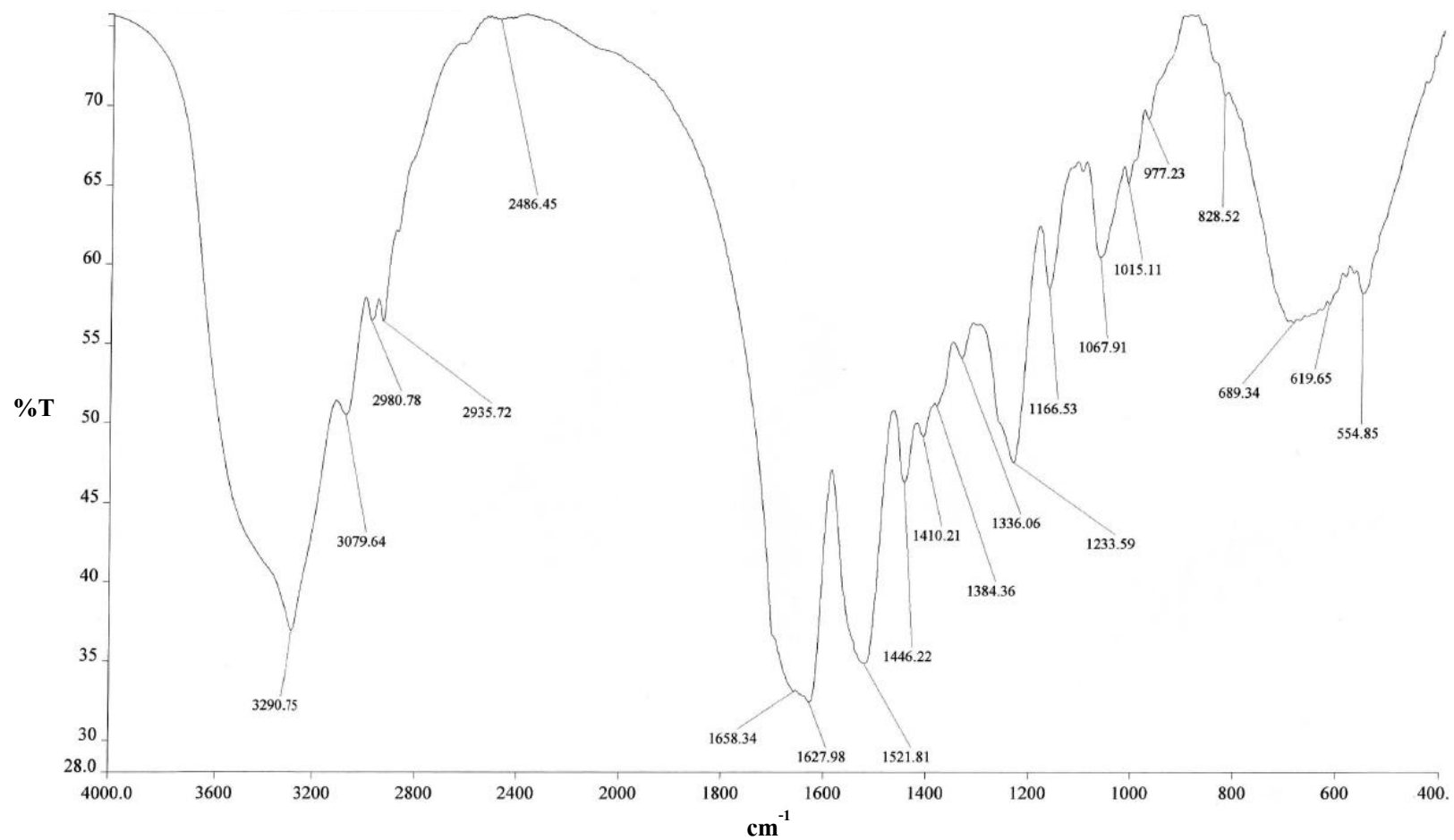
FTIR spectrum ของ fibroin powder



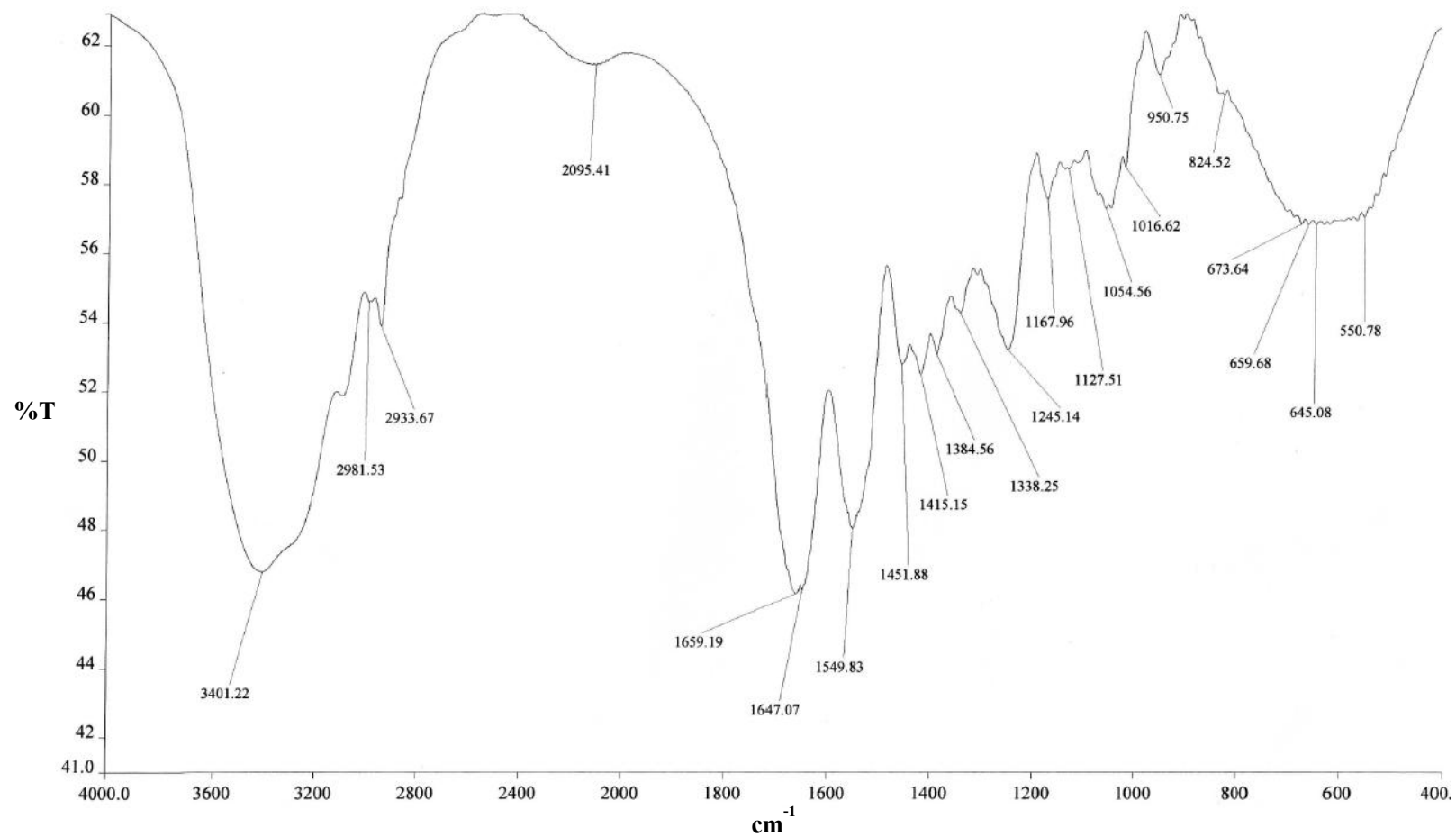
FTIR spectrum of lyophilized collagen



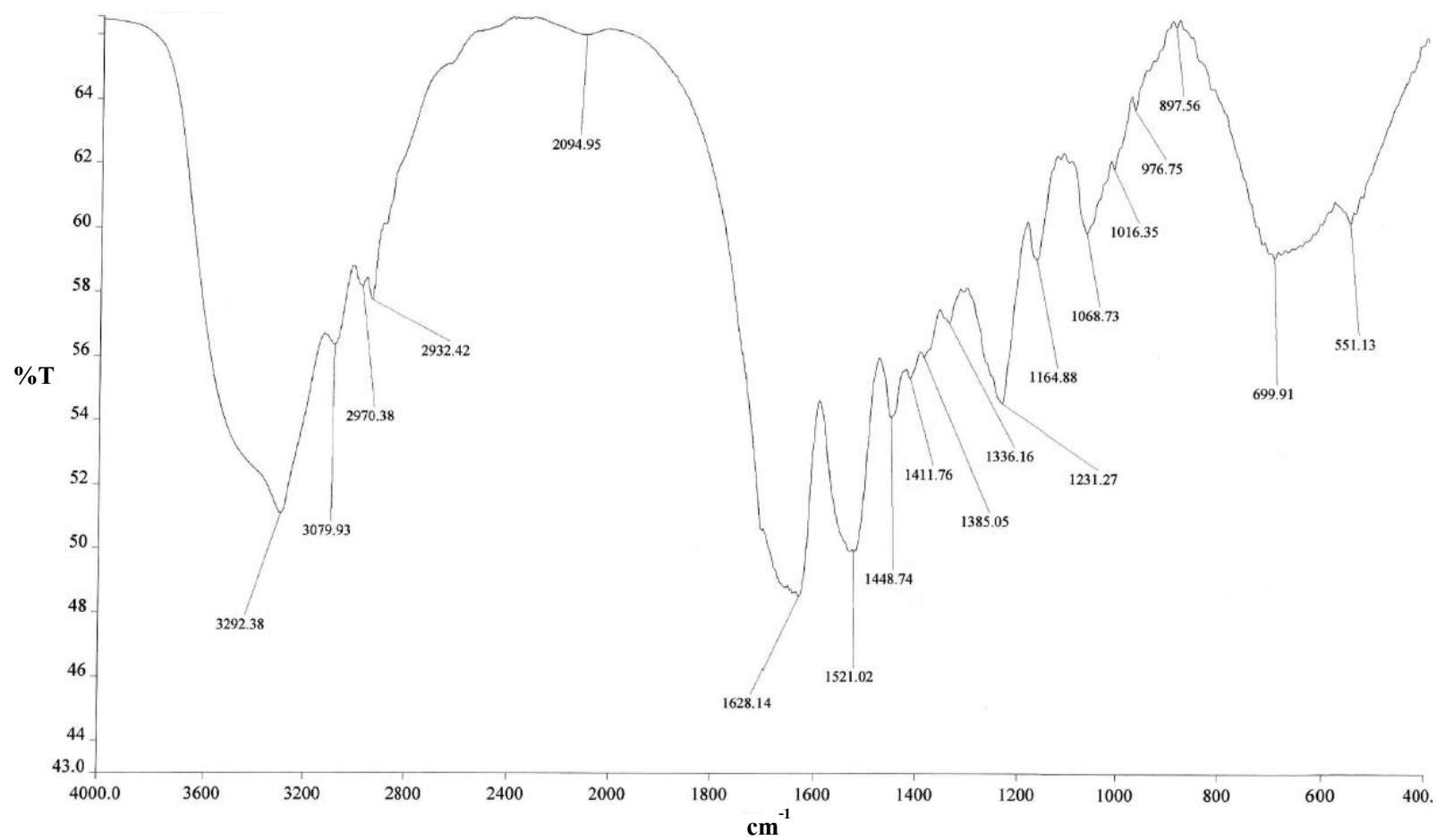
FTIR spectrum spectrum ของ fibroin scaffold สูตรตำรับ SF2 ที่ไม่ได้ผ่านการ treat ด้วย methanol



FTIR spectrum spectrum ของ fibroin scaffold สูตรตำรับ SF2 ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol



FTIR spectrum ของ fibroin/collagen scaffold สูตรตำรับ SF/25C ที่ไม่ได้ผ่านการ treat ด้วย methanol



FTIR spectrum ของ fibroin/collagen scaffold สูตรตำรับ SF/25C ที่ผ่านการ treat ด้วย methanol