ผลของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนต่อสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติไฟโบรอินจากไหมไทยสายพันธุ์ผสมนางน้อยศรีสะเกษ 1 และ ม.

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.

วรเดช พิชัยอุตกฤษฏ์[1*] วิริยา จูวัฒนสำราญ[1] และ ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง[2]

Woradej Pichaiaukrit[1*] Wiriya Juwattanasamran[1] และ Teerasak Dumrongrungruang[2]

[1, 1]อาจารย์ประจำสาขาวิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต*
ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000
Lecturer in Faculty of Dental Medicine, Rangsit University,
Phahonyothin Rd, Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000
[2]อาจารย์ประจำภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
123 ถนนมิตรภาพ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002
Associate Professor, Department of Oral Diagnosis, Faculty of Dentistry,
KhonKaen University123 Mittraparp Highway, KhonKaen, Thailand 40002
**Corresponding author, E-mail: woradej059@gmail.com*

บทคัดย่อ

รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีบทบาทหน้าที่สำคัญในการทำให้เกิดการยึดติด การเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ และควรมีสมบัติเชิงกลที่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อในบริเวณที่ทำการบูรณะเพื่อคงสภาพของโครงสร้างและหน้าที่ของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากฝังและระหว่างการสร้างเนื้อเยื่อ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินผลของความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดรูพรุนต่อขนาดรูพรุน ค่าร้อยละรูพรุน ความหนาแน่น และค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์ผสมนางน้อยศรีสะเกษ 1 และ ม. โครงเลี้ยงเซลล์สร้างจากสารละลายไฟโบรอินในตัวทำละลายเฮ็กซะฟลูออโรไอโซโพรพานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้น้ำตาลซูโครสที่มีขนาดอนุภาค 250-450 ไมโครเมตรเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุนในอัตราส่วนดังนี้ 5:1, 10:1, 15:1 และ 20:1 จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนน้ำตาลซูโครส ส่งผลให้ค่าร้อยละรูพรุน ความหนาแน่นในสภาวะแห้ง และค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยพบว่าค่าร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์อยู่ในช่วงร้อยละ 58.54 - 90.92 ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งอยู่ในช่วง 6.30 – 24.94 x 10^{-5} กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และค่าโมดูลัสแรงกดอยู่ในช่วง 13.90 -743.74 กิโลปาสคาล

คำสำคัญ: *สมบัติทางกายภาพ โครงเลี้ยงเซลล์ ไฟโบรอินไหม*

Abstract

Porosity of scaffolds plays an important role for cell attachment, proliferation and differentiation. Scaffolds with mechanical properties that mimic the tissue to be restored are also critical to maintain the morphology and function of scaffold after implantation and during tissue regeneration. The objective of this study was to evaluate the effect of porogen concentration on the pore size, % porosity, density and compressive modulus of fibroin-based, three-dimensional scaffolds from mixed strain of Thai silk, Nangnoi Si Sa Ket 1 and Mor. The scaffolds were fabricated by dissolution of silk fibroin in hexafluoroisopropanol at 16% (w/v) and use sucrose (size 250-450 μm) as porogen in different concentration at 5:1, 10:1, 15:1, and 20:1, and were made by solvent casting and salt leaching technique. The result presented that the concentration of porogen effect on the % porosity, density in dry state and compressive modulus of the scaffold. The scaffold had porosities of 58.54 - 90.92 %, the density in dry condition was 6.30 – 24.94 x 10^{-5} g/mm^3, and the compressive modulus were 13.90 -743.74 kPa.

Keyword: *mechanical properties, scaffolds, silk fibroin*

1. บทนำ

โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นโครงร่างให้เซลล์ยึดเกาะ (adhesion) ในระยะเริ่มต้น แล้วเกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation) และเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของเซลล์ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และยังทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่ลอกเลียนแบบสภาพแวดล้อมให้ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อที่ต้องการจะสร้างขึ้น ซึ่งสมบัติเชิงกล (mechanical properties) ของโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีค่าใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อในบริเวณที่จะทำการบูรณะเพื่อคงสภาพของโครงสร้างและหน้าที่ของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากฝังและระหว่างการสร้างเนื้อเยื่อ

ชีววัสดุ (biomaterial) ที่สามารถนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์นั้นแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ พอลิเมอร์ (polymer) เซรามิก (ceramic) และคอมโพสิต (composite) ซึ่งพอลิเมอร์จากธรรมชาติเป็นชีววัสดุชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากเป็นชีววัสดุที่มีความสามารถสลายทางชีวภาพ (biodegradable) และสามารถช่วยส่งเสริมการทำหน้าที่ของเซลล์ ซึ่งตัวอย่างของพอลิเมอร์จากธรรมชาติ เช่น เซลลูโลส (cellulose) คอลลาเจน(collagen) ไคโตซาน (chitosan) และ ไหมจากหนอนไหม (Dhandayuthapani et al., 2011)

ไหมจากหนอนไหมสายพันธุ์*Bombyx mori* ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดได้แก่ ไฟโบรอิน (fibroin) และเซริซิน (sericin) ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนแกนกลางของเส้นใยไหม ส่วนเซริซินเป็นโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกาว (glue-like protein) ทำหน้าที่ประสานและห่อหุ้มไฟโบรอินสองเส้นเข้าไว้ด้วยกัน ทำให้ไหมมีสมบัติเหนียวและยืดได้น้อย (Vepari & Kaplan, 2007) ปัจจุบันมีการนำ ไฟโบรอินมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะทางกายสัณฐานวิทยา (morphology) ที่แตกต่างกันออกไปตามการนำไปใช้งาน เช่น เส้นใย (Kim et al., 2014) เจล (gel) (Diab et al., 2012) แผ่นฟิล์ม (film) (Flanagan et al., 2014) ทรงกลม (sphere) และแคปซูล (capsule) (Wang et al., 2007) และ โฟม (foam)

โฟมมีลักษณะทางกายสัณฐานวิทยาเป็นรูปร่าง 3 มิติที่มีรูพรุนซึ่งสามารถสร้างได้ด้วยการทำแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) จากสารละลายไหมในน้ำ (aqueous silk solution) การขึ้นรูปด้วยสารละลายร่วมกับการชะละลายสารที่เป็นอนุภาค (solvent casting with particulate leaching) และแก๊สโฟมมิ่ง (gas foaming) การขึ้นรูปด้วยสารละลายร่วมกับการชะละลายสารที่เป็นอนุภาคนั้น อาจขึ้นรูปจากสาระลายไหมในน้ำและใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน (porogen) เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแผ่นบีต้า (β-sheet) ได้ (Makaya et al., 2009) หรืออาจนำสารละลายไหมในน้ำมาทำแห้งเยือกแข็ง จากนั้นจึงทำการละลายในตัวทำละลาย เช่นเฮ็กซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (HFIP) และใช้โซเดียมคลอไรด์ (Kim et al., 2004; Nazarov et al., 2004; Hofmann et al., 2007; Thimm et al., 2011; Rockwood et al., 2011; Correia et al., 2012) หรือน้ำตาลซูโครส (Makaya et al., 2009; Kuboyama et al., 2013) เป็นสารที่ทำให้รูพรุน แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดแผ่นบีต้าด้วยการนำไปแช่ในเมธานอล ซึ่งสารที่ทำให้เกิดรูพรุนนั้นถูกละลายออกโดยการนำไปแช่ในน้ำ

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากสาระลายไหมในน้ำ และโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากการนำสารละลายไหมในน้ำมาทำแห้งเยือกแข็งแล้วทำการละลายใน HFIP และใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน (Kim et al., 2005; Correia et al., 2012) ส่วนการศึกษาของ Hofmann et al., (2007) และ Thimm et al., (2011) ที่เปรียบเทียบผลของขนาดอนุภาคโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ต่อสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลโดยสร้างโครงเลี้ยงเซลล์จากการนำสารละลายไหมในน้ำมาทำแห้งเยือกแข็งแล้วทำการละลายใน HFIP

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากจากสาระลายไหมในน้ำและใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน และโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากจากการนำสารละลายไหมในน้ำมาทำแห้งเยือกแข็งแล้วทำการละลายใน HFIP และใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน (Makaya et al., 2009) และมีการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากการนำสารละลายไหมในน้ำมาทำแห้งเยือกแข็งแล้วทำการละลายใน HFIP (Nazarov et al., 2004)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่ายังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบถึงผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากการนำสารละลายไหมในน้ำมาทำแห้งเยือกแข็งแล้วทำการละลายใน HFIP ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้

2. วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่สร้างจากการนำสารละลายไหมในน้ำมาทำแห้งเยือกแข็งแล้วทำการละลายใน HFIP

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุ

การศึกษานี้ใช้รังไหมไทยสปีชีส์ *B. mori* สายพันธุ์ผสมระหว่างสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1และสายพันธุ์ ม. จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดขอนแก่น ส่วนสารเคมีสำคัญที่ใช้ได้แก่ โซเดียม

คาร์บอเนตแอนไฮดรัส (sodium carbonate anhydrous) แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (calcium chloride dihydrate) เอธานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) เมธานอล (methanol) น้ำตาลซูโครส และ 1, 1, 1, 3, 3, 3-เฮ็กซะฟลูออโร-2-โพรพานอล (1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol: HFIP)

3.2 การสกัดไฟโบรอินจากรังไหม

ต้มรังไหมไทยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัสความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที เพื่อกำจัด เซริซินออกจากเส้นไหม หลังการต้มทุกครั้งล้างด้วยน้ำอุ่น จากนั้นทำการอบให้ไหมแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไหมไปละลายในตัวทำละลายเทอร์นารี (ternary solvent) ที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์ ต่อ เอธานอล ต่อ น้ำ ในอัตราส่วนโมลเท่ากับ 1 ต่อ 2 ต่อ 8 โดยทำการละลายในขวดแก้วที่มีฝาปิดในตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1ชั่วโมง เพื่อให้ได้สารละลายไฟโบรอิน

นำสารละลายที่ได้ไปทำการกรองผ่านเยื่อไดอะไลซิส (dialysis) ที่มีความสามารถในการกักกันสารตามมวลโมเลกุลของสาร (molecular weight cut off) เท่ากับ 12,000 ดาลตัน (Dalton) ทำการกรองในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง โดยนำน้ำที่ผ่านการกรองไปวัดการนำไฟฟ้าด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้า จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนออกจากสารละลายไฟโบรอิน และสุดท้ายนำไปทำแห้งเยือกแข็ง (lyophilized) เพื่อให้ได้ไฟโบรอินที่มีโครงสร้างแบบฟองน้ำ (fibroin sponge)

3.3 การสร้างโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุน

ละลายไฟโบรอินที่มีโครงสร้างแบบฟองน้ำในตัวทำละลาย HFIP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Bhumiratanaet al., 2011) หลังจากที่ไฟโบรอินที่มีโครงสร้างแบบฟองน้ำละลายหมดแล้ว จึงเติมน้ำตาลซูโครสที่ได้ผ่านการร่อนผ่านตะแกรง (sieve) โดยใช้ความละเอียดของตะแกรงที่ 450 และ 250 ไมโครเมตร ซึ่งน้ำตาลซูโครสที่ใช้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 และ 20 เท่าของน้ำหนักไฟโบรอินที่มีโครงสร้างแบบฟองน้ำ จากนั้นถึงเทใส่แบบหล่อที่ทำจากพอลิสไตรีน (polystyrene) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตร สูง 18 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดแผ่นบีตาโดยการแช่ในเมทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ต่อจากนั้นทำการละลายน้ำตาลซูโครสโดยการแช่ในน้ำปราศจากไอออน นาน 2 วัน จากนั้นทำการตัดโครงเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความสูง 5 มิลลิเมตร และทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง

3.4 ลักษณะทางกายภาพ

3.4.1 ลักษณะทางกายสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางกายสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ศึกษาเกี่ยวกับการกระจาย ขนาด และความต่อเนื่องของรูพรุนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด โดยโครงเลี้ยงเซลล์ถูกสุ่มอย่างง่ายกลุ่มละ 1 ชิ้น จากนั้นนำมาตัดตามขวาง แล้วนำไปติดบนสตัปทองเหลืองและเคลือบด้วยทอง โดยในแต่ละชิ้นตัวอย่างนั้นทำการถ่ายภาพที่กำลังขยาย 35 เท่า ทั้งหมด 5 ภาพในส่วนที่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาวัดขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยโปรแกรม

SemAfore version 5.21 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับวัดขนาดภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.2 ร้อยละของรูพรุน

ร้อยละของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกวัดด้วยวิธีการแทนที่ของของเหลว (liquid displacement) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้เฮ็กเซน (hexane) เนื่องจากเฮ็กเซนสามารถซึมผ่านเข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ได้โดยไม่ทำให้เกิดการบวมน้ำหรือหดตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ถูกสุ่มอย่างง่ายมากลุ่มละ 5 ชิ้น จากนั้นชั่งน้ำหนักหนักเฮ็กเซนที่ใส่อยู่ในหลอดรูปกรวย (W_1) แล้วจึงแล้วจึงใส่โครงเลี้ยงเซลล์ลงไปในเฮ็กเซนและแช่ไว้นาน 1 นาทีแล้วชั่งน้ำหนักเฮ็กเซนที่มีโครงเลี้ยงเซลล์แช่อยู่ (W_2) และนำโครงเลี้ยงเซลล์ออกจากเฮ็กเซนทำการชั่งน้ำหนักเฮ็กเซนที่คงเหลืออยู่ในหลอดรูปกรวย (W_3) จากนั้นเปลี่ยนน้ำหนักของเฮ็กเซนทั้ง W_1W_2 และ W_3 เป็นปริมาตร V_1V_2และ V_3 ตามลำดับ โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ปริมาตร} = \text{น้ำหนัก} / \text{ความหนาแน่น} \qquad (1)$$

โดยที่ความหนาแน่นของเฮ็กเซนเท่ากับ 0.6548 กรัมต่อมิลลิลิตรและคำนวณค่าร้อยละรูพรุนจากสูตร

$$\text{Porosity (\%)} = (V_1-V_3)/(V_2-V_3) \qquad (2)$$

(Nazarov et al., 2004)

3.4.3 ความหนาแน่น

ความหนานแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกศึกษาทั้งในสภาวะแห้งและสภาวะชุ่มน้ำ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ถูกสุ่มอย่างง่ายมากลุ่มละ 5 ชิ้น จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักและหาปริมาตร โดยที่รัศมีและความสูงของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกวัดด้วยเวอร์เนียร์คาร์ลิเปอร์ (vernier caliper) ส่วนสภาวะชุ่มน้ำนั้นเกิดจากการนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปแช่ในน้ำปราศจากประจุจนชุ่มน้ำ จากนั้นซับให้แห้งด้วยกระดาษเป็นจำนวน 5 ครั้งแล้วจึงนำมาวัดรัศมีและความสูง

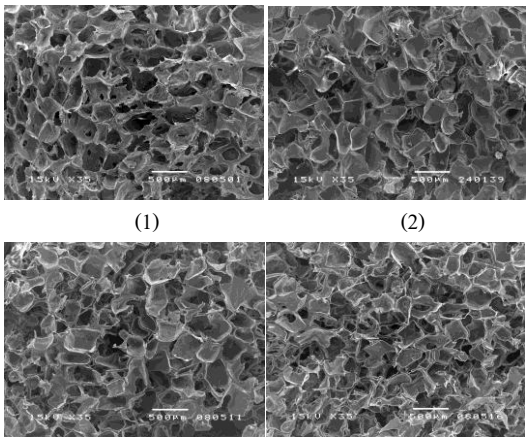
3.5 สมบัติเชิงกล

สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกศึกษาในสภาวะชุ่มน้ำ โดยศึกษาจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกสุ่มอย่างง่ายมากลุ่มละ 5 ชิ้น จากนั้นนำไปแช่ในน้ำปราศจากประจุจนชุ่มน้ำ และซับให้แห้งด้วยกระดาษเป็นจำนวน 5 ครั้ง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงด้วยเวอร์เนียร์คาร์ลิเปอร์ จากนั้นนำไปวัดค่าโมดูลัสแรงกด (modulus of elasticity) ด้วยเครื่อง Shimadzu 500 N โดยใช้แรงกด 0.1 กิโลนิวตัน ความเร็วหัวกด 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที และค่า strain ที่ร้อยละ 10 (Correia et al., 2012)

4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

4.1 ลักษณะทางกายสัณฐานวิทยา

โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่ถูกสร้างด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง การขึ้นรูปด้วยสารละลายและการชะละลายน้ำตาล มีลักษณะคล้ายฟองน้ำที่มีรูพรุน เมื่อนำไปตัดขวางและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 35 เท่า พบว่ารูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะค่อนข้างเหลี่ยม มีความต่อเนื่องกันโดยตลอด และไม่มีรูพรุนขนาดเล็ก (microporous) ภายในผนังของรูพรุน ดังรูปที่ 1 และเมื่อวัดค่าเฉลี่ยรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5 10 15 และ 20 เท่าเป็นดังนี้ 321.02 $\pm$ 64.24 295.67 $\pm$ 63.01 305.93 $\pm$ 67.89 และ 264.11 $\pm$ 71.67 ไมโครเมตร ตามลำดับ



(1) (2)

(3) (4)

รูปที่ 1 ภาพตัดขวางโครงเลี้ยงเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 35 เท่า (1) น้ำตาลซูโครส 5 เท่า (2) น้ำตาลซูโครส 10 เท่า (3) น้ำตาลซูโครส 15 เท่า และ (4) น้ำตาลซูโครส 20 เท่า

4.2 ร้อยละรูพรุน

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำตาลซูโครส 20 เท่า มีค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนสูงที่สุดคือ 89.05 $\pm$ 0.90 ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำตาลซูโครส 5 เท่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนต่ำที่สุดคือ 61.58 $\pm$ 3.43 ดังตารางที่ 1 และเมื่อทดสอบทางสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p-value* < 0.05

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ปริมาณน้ำตาลซูโครส(เท่า)	ค่าร้อยละรูพรุน
5	$61.58 \pm 3.43^{a, b, c}$
10	$81.84 \pm 5.12^{a, d, e}$
15	$88.78 \pm 2.53^{b, d}$
20	$89.05 \pm 0.90^{c, e}$

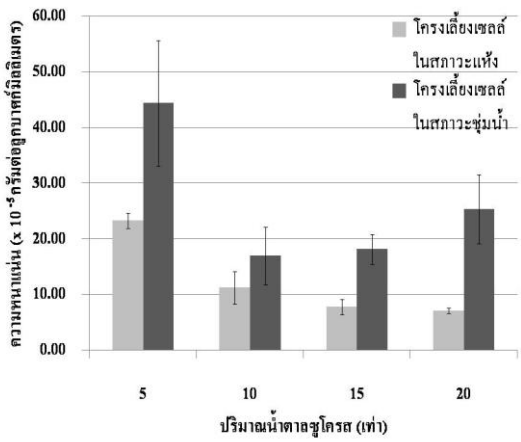
a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p-value* < 0.05

4.3 ความหนาแน่น

ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งมีค่าลดลงเมื่อปริมาณซูโครสที่ใช้เพิ่มขึ้น โดยพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำตาลซูโครส 5 เท่า มีความหนาแน่นมากที่สุดคือ 23.32 $\pm$ 1.37 x10 $^{-5}$กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำตาลซูโครส 20 เท่ามีความหนาแน่นน้อยที่สุดคือ 7.10 $\pm$ 0.46 x10 $^{-5}$กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ดังรูปที่ 2 และเมื่อทดสอบทางสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p-value* < 0.05 โดยพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ใช้น้ำตาลซูโครส 5 เท่าและ 10 เท่า, 5 เท่าและ 15 เท่า, 5 เท่าและ 20 เท่า, และ 10 เท่าและ 20 เท่า

ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะชุ่มน้ำพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำตาลซูโครส 5 เท่า มีความหนาแน่นมากที่สุด รองลงไปคือโครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำตาลซูโครส 20 15 และ 10 ตามลำดับ ดังรูปที่ 2 และเมื่อทดสอบทางสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะชุ่มน้ำมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p-value* < 0.05 โดยพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ใช้น้ำตาลซูโครส 5 เท่าและ 10 เท่า และ 5 เท่าและ 15 เท่า

มหาวิทยาลัยรังสิต



รูปที่ 2 ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ในสภาวะแห้งและชุ่มน้ำ

4.4 สมบัติเชิงกล

ค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้เพิ่มมากขึ้น ดังตารางที่ 2 และเมื่อทดสอบทางสถิติ one-way ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p-value* < 0.05

ตารางที่ 2 ค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ (ค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ปริมาณน้ำตาลซูโครส (เท่า)	ค่าโมดูลัสแรงกด (กิโลปาสคาล)
5	564.92±157.02[a,b, c]
10	47.88±12.67[a]
15	28.03±10.17[b]
20	19.22±4.61[c]

a, b, และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p-value* < 0.05

5. การอภิปรายผล

โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนในการศึกษานี้สร้างด้วยวิธีการขึ้นรูปด้วยสารละลาย และการชะละลาย ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และสามารถควบคุมขนาดของรูพรุนได้ ซึ่งขนาดของรูพรุนนั้นขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน นอกจากนี้สารที่ทำให้เกิดรูพรุนนั้นควรเป็นสารที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย แต่สามารถละลายได้ในน้ำซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นสารที่ทำให้เกิดรูพรุน จากเหตุผลข้างต้นจึงนำมาสู่สมมุติฐานของงานวิจัยที่ว่า น้ำตาลซูโครสสามารถนำมาใช้แทนโซเดียมคลอไรด์ได้หรือไม่ และส่งผลอย่างไรต่อโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าน้ำตาลซูโครสสามารถนำมาใช้แทนโซเดียมคลอไรด์ได้ เนื่องจากน้ำตาลซูโครสไม่ละลายใน HFIP คลอโรฟอร์ม และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ชนิดอื่นๆ (Makaya et al., 2009) ดังนั้นเมื่อละลายน้ำตาลซูโครสออกโดยการนำไปแช่ในน้ำจึงทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนซึ่งรูปร่างของรูพรุนมีลักษณะค่อนข้างเหลี่ยม ในขณะที่รูปร่างของรูพรุนที่ใช้โซเดียมคลอไรด์นั้นมีลักษณะค่อนข้างกลม (Makaya et al., 2009)

ขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ302.70 ± 68.89 ไมโครเมตรและไม่มีลักษณะของรูพรุนขนาดเล็กภายในผนังของรูพรุน แต่การที่รูพรุนมีขนาดลดลงเมื่อปริมาณซูโครสเพิ่มมากขึ้นนั้นอาจเนื่องมาจากน้ำตาลซูโครสที่มากขึ้นส่งผลให้รูพรุนอยู่ใกล้กันมากขึ้น และอาจส่งผลให้ขณะตัดตามขวางได้ขนาดรูพรุนที่เล็กลง

โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากรูพรุนช่วยส่งเสริมการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวน และการย้ายที่ (migration) ของเซลล์ ถึงแม้ว่ายังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดถึงขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของเซลล์และการสร้างเนื้อเยื่อก็ตาม แต่จากการศึกษาของ Boyan et al., (1996) พบว่าขนาดรูพรุนที่มีเหมาะสมสำหรับการสร้างกระดูกควรอยู่ระหว่าง 200-400 ไมโครเมตร ในขณะที่การศึกษาของ Ishaug et al.,

(1997) พบว่าขนาดรูพรุนที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 150-750 ไมโครเมตร นอกจากนี้การศึกษาของ Hulbert et al., (1970) พบว่ารูพรุนที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 100-200 ไมโครเมตร ส่งผลให้เกิดการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกภายในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการศึกษานี้อยู่ระหว่าง 250-400 ไมโครเมตร ดังนั้นอาจนำมาประยุกต์ใช้กับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้

ค่าร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ในการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Nazarov et al., (2004) ที่พบว่าเมื่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 10 เท่าเป็น 20 เท่า ส่งผลให้ค่าร้อยละรูพรุนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 84.0 $\pm$ 2.0 เป็นร้อยละ98.0 $\pm$ 1.0 ตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเมื่อปริมาณสารที่ทำให้เกิดรูพรุนเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ปริมาตรของสารละลายไฟโบรอินไหมในตัวทำละลายเท่ากัน จึงส่งผลให้ปริมาณรูพรุนเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีค่าร้อยละรูพรุนอยู่ระหว่างร้อยละ 92-98 ช่วยส่งเสริมการขนส่งสารอาหารและกำจัดของเสียออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ (Kim et al., 2005, Meinel et al., 2004 และ Marolt et al., 2006) แต่ค่าร้อยละรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการศึกษานี้อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 60-80 เท่านั้น ดังนั้นควรมีการปรับปรุงให้โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนมากกว่านี้เพื่อประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการนำไปใช้งานต่อไป

ความหนาแน่นของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ในการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Nazarov et al., (2004) ที่พบว่าเมื่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 10 เท่าเป็น 20 เท่า ส่งผลให้ความหนาแน่นลดลงจาก 120 $\pm$ 2 เหลือเพียง 40 $\pm$ 13 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเมื่อปริมาณสารที่ทำให้เกิดรูพรุนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีรูพรุนเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้ความหนาแน่นลดลง

สมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Nazarov et al., (2004) ที่พบว่าเมื่อใช้โซเดียมคลอไรด์ที่มีขนาด 150-250 ไมโครเมตร และใช้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 10 เท่าเป็น 20 เท่า ส่งผลให้ค่าโมดูลัสแรงกดเพิ่มขึ้นจาก 100 $\pm$ 2 เป็น 450 $\pm$ 94 กิโลปาสคาล ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากในการศึกษานี้ใช้น้ำตาลซูโครสที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าคือ 250-450 ไมโครเมตร และเมื่อเพิ่มปริมาณจาก 10 เท่าเป็น 20 เท่า ส่งผลให้อนุภาคของน้ำตาลซูโครสอยู่ใกล้กันมากขึ้น และส่งผลให้ผนังของโครงเลี้ยงเซลล์บางกว่า และมีสมบัติเชิงกลที่ลดลง นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการศึกษานี้ยังมีค่าโมดูลัสแรงกดต่ำกว่ากระดูกโปร่ง (cancellous bone) และกระดูกทึบ (cortical bone) ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 4-12 และ 130-180 เมกะปาสคาล ตามลำดับ ดังนั้นควรเติมชีววัสดุบางชนิดลงไป หรือทำการเชื่อมขวาง (cross-link) เพิ่มเติมเพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์มีสมบัติเชิงกลที่ดีขึ้น

6. บทสรุป

การศึกษานี้ได้แสดงถึงผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ต่อค่าร้อยละรูพรุน ความหนาแน่น และค่าโมดูลัสแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีรูพรุนที่สร้างจากไฟโบรอินไหมด้วยวิธีการขึ้นรูปด้วยสารละลาย และการชะละลาย ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีค่าร้อยละรูพรุนเพิ่มมากขึ้น แต่ความหนาแน่นและค่าโมดูลัสแรงกดลดลง ดังนั้นก่อนนำโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ต่อควรทำการศึกษาถึงปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมก่อน เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ค่าร้อยละรูพรุน ความ

หนาแน่น และค่าโมดูลัสแรงกดที่เพียงพอต่อการประยุกต์ใช้สำหรับการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป และนอกจากนี้ควรทำการศึกษานอกกาย (*in vitro*) และการศึกษาในกาย (*in vivo*) เพื่อประเมินความเข้ากันทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติมด้วย

7. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร. โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้คำปรึกษาและแนะนำเกี่ยวกับการศึกษานี้ และการศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยรังสิต (สัญญาเลขที่ 51/54)

8. เอกสารอ้างอิง

Bhumiratana, S., Grayson, W.L., Castaneda, A., Rockwood, D.N., Gil, E.S., Kaplan, D.L., Vunjak-Novakovic, G. (2011). “Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds” Biomaterials. 32: 2812-2820.

Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D, Schwartz, Z. (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials. 17: 137-146.

Correia, C., Bhumiratana, S., Yan, L.P., Oliveira A.L., Gimble, J.M., Rockwood, D., Kaplan, D.L., Sousa R.A., Reis R.L., Vunjak-Novakovic, G. (2012). Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. ActaBiomaterialia. 8: 2483-2492.

Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D.S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. International Journal of Polymer Science. 1-19.

Diab, T., Pritchard, E.M., Uhriq, B.A., Boerckel, J.D., Kaplan, D.L., Guldberg, R.E. (2012). A silk hydrogel-based delivery system of bone morphogenetic protein for the treatment of large bone defects. J MechBehav Biomed Mater. 11: 123-131.

Flanagan, K.E., Tien, L.W., Elia, R., Wu, J., Kaplan, D.L. (2014). Development of a suturelessdural substitute from *Bombyxmori* silk fibroin. J Biomed Mater Res B ApplBiomater. 1-10.

Hofmann S., Hagenmüller, H., Koch, A.M., Müller, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., Merkle, H.P., Meinel, L. (2007). “Control of in vitro tissue-engineered bone-like structure using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds” Biomaterials. 28: 1152-1162.

Hulbert, S.F., Young, F.A., Mathews, R.S., Klawitter, J.J., Talbert, C.D., Stelling, F.H. (1970). Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prosthese. J Biomed Mater Res. 4: 433-456.

Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G. (1997). Bone formation by three-dimensional stromal

osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res. 36: 17-28.

Kim, H., Che, L., Ha, Y., Ryn, W. (2014). Mechanically-reinforced electrospun composite silk fibroin nanofibrous containing hydroxyapatite nanoparticles. Materials Science and Engineering C. 40: 324-335.

Kim, H.J., Kim, U.J., Vunjak-Novakovic, G., Min, B.H., Kaplan, D.L. (2005). Influence of macropoous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. Biomaterials. 26: 4442-4452.

Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M., Kaplan, D.L. (2005). Three dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. Biomaterials. 26: 2775–2785.

Kuboyama, N., Kiba, H., Arai, K., Uchida, R., Tanimoto, Y., Bhawal, U.K., Abiko, Y., Miyamoto, S., Knight, D., Asakura, T., Nishiyama, N. (2013). "Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration" J Biomed Mater Res Part B. 101, 2: 295-302.

Makaya, K., Terada, S., Ohgo, K., Asakura, T. (2009). Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/ hexafluoroisopropanol in cartilage formation. J BiosciBioeng. 108: 68-75.

Marolt, D., Augst, A., Freed, L.E., Vepari, C., Fajardo, R., Patel, N, et al. (2006). Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. Biomaterials. 27: 6138-6149.

Meinel, L., Karageorgiou, V., Hofmann, S., Fajardo, R., Snyder, B., Li, C.M, et al. (2004). Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. J Biomed Mater Res A. 71A: 25-34.

Mondal, M., Trivedy, K., Kumar, S.N. (2007). The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, BombyxmoriLinn., -a review. Caspian J Env Sci. 5: 63-76.

Nazarov, N., Jin, H.J., Kaplan, D.L. (2004). Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. Biomacromolecules. 5: 718-726.

Thimm, B.W., Wüst, S., Hofmann S., Hagenmüller, H., Müller, R. (2011). "Initial cell pre-cultivation can maximize ECM mineralization by human mesenchymal stem cells on silk fibroin scaffolds" Acta Biomaterialia. 7: 2218-2228.

Vepari, C., Kaplan, D.L. (2007). Silk as a biomaterial. ProgPolym Sci. 32: 991-1007.

Wang, X., Wenk, E., Matsumoto, A., Meinel, L., Li, C., Kaplan, D.L. (2007). Silk microspheres for encapsulation and controlled release. J Control Release. 117: 360-370.