

สกัดจากไผ่ใหม่เนื่องจากเป็นสารที่มีวัตถุดิบในประเทศเป็นจำนวนมากและหาซื้อได้ง่าย ทางผู้วิจัยใช้กรรมวิธี cross-link สารละลายที่สกัดจากไผ่ใหม่โดยวิธีการฉายรังสีแกมมาและสามารถผลิตไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติไม่เป็นพิษกับเซลล์ทั้งไฟโบรบลาสต์และเคอราติโนไซต์ และจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไฮโดรเจลที่ได้จากการ cross-link สารละลายที่สกัดจากไผ่ใหม่มีความยืดหยุ่นดี อาจจะสามารถพัฒนาไปเป็นโครงร่างของชั้นผิวหนังแท้ในการดำรงอยู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามียางานว่าสารสกัดจากไผ่ใหม่สามารถพัฒนาเพื่อใช้ในวิศวกรรมชีวการแพทย์ได้ [24]

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Craniofacial tissue engineering by stem cells. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. J Dent Res. 2006 Nov;85(11):966-79. Review.
2. Cleft lip and palate surgery: an update of clinical outcomes for primary repair. Campbell A, Costello BJ, Ruiz RL. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2010 Feb;22(1):43-58. Review.
3. The role of foot surgery in patients with diabetes. Giurini JM, Rosenblum BI. Clin Podiatr Med Surg. 1995 Jan;12(1):119-27. Review.
4. Endovascular management of acute limb ischemia. Peeters P, Verbist J, Keirse K, Deloose K, Bosiers M. J Cardiovasc Surg (Torino). 2010 Jun;51(3):329-36. Review.
5. The mangled foot and leg: salvage versus amputation. Shawen SB, Keeling JJ, Branstetter J, Kirk KL, Ficke JR. Foot Ankle Clin. 2010 Mar;15(1):63-75. Review.
6. Clinical implications of aging skin: cutaneous disorders in the elderly. Farage MA, Miller KW, Berardesca E, Maibach HI. Am J Clin Dermatol. 2009;10(2):73-86. doi: 10.2165/00128071-200910020-00001. Review.
7. Histology and pathology of the human intervertebral disc. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. J Bone Joint Surg Am. 2006 Apr;88 Suppl 2:10-4. Review.
8. Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. Poole AR, Rizkalla G, Ionescu M, Reiner A, Brooks E, Rorabeck C, Bourne R, Bogoch E. Agents Actions Suppl. 1993;39:3-13. Review.
9. Breast reconstruction with SGAP and IGAP flaps. LoTempio MM, Allen RJ. Plast Reconstr Surg. 2010 Aug;126(2):393-401. Review.
10. Review of methods used in the reconstruction and rehabilitation of the maxillofacial region. O'Fearraigh P. J Ir Dent Assoc. 2010 Feb-Mar;56(1):32-7. Review.
11. Protective effect of glucocorticoid-free immunosuppressive regimen in allogenic islet Transplantation. Du CY, Xu EK. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2006 Feb;5(1):43-7.
12. Effects of cyclosporine on human dendritic cell subsets. Ciesek S, Ringe BP, Strassburg CP, Klempnauer J, Manns MP, Wedemeyer H, Becker T. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):20-4.

13. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. Chen FM, Zhang M, Wu ZF. *Biomaterials*. 2010 Aug;31(24):6279-308. Epub 2010 May 21. Review.
14. A two-stage approach using an autogenous masticatory mucosal graft and an autogenous connective tissue graft to treat gingival recession: a case report. Park JB. *J Int Acad Periodontol*. 2010 Apr;12(2):45-8.
15. Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession: a proof-of-concept study. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, Deshmukh VL, Wani MR, Miller PD Jr. *J Periodontol*. 2010 Apr;81(4):616-25.
16. Reconstruction of a human hemicornea through natural scaffolds compatible with the growth of corneal epithelial stem cells and stromal keratocytes. Barbaro V, Ferrari S, Fasolo A, Ponzin D, Di Iorio E. *Mol Vis*. 2009 Oct 17;15:2084-93.
17. Lamina propria replacement therapy with cultured autologous fibroblasts for vocal fold scars. Chhetri DK, Head C, Revazova E, Hart S, Bhuta S, Berke GS. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Dec;131(6):864-70.
18. The effect of cell-based therapy with autologous synovial fibroblasts activated by exogenous TGF-beta1 on the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament. Okuizumi T, Tohyama H, Kondo E, Yasuda K. *J Orthop Sci*. 2004;9(5):488-94.
19. Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. Mizoguchi M, Suga Y, Sanmano B, Ikeda S, Ogawa H. *J Dermatol Sci*. 2004 Sep;35(3):199-206.
20. Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve Reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. Sanmano B, Mizoguchi M, Suga Y, Ikeda S, Ogawa H. *J Dermatol Sci*. 2005 Jan;37(1):29-39. Epub 2004 Nov 30
21. Characterization of a new degradable polymer scaffold for regeneration of the dermis: In vitro and in vivo human studies. Huss FR, Nyman E, Gustafson CJ, Gisselgård K, Liljensten E, Kratz G. *Organogenesis*. 2008 Jul;4(3):195-200.
22. Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. Han CM, Zhang LP, Sun JZ, Shi HF, Zhou J, Gao CY. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010 Jul;11(7):524-30.
23. Electrospun poly(D/L-lactide-co-L-lactide) hybrid matrix: a novel scaffold material for soft tissue engineering. Kluger PJ, Wyrwa R, Weisser J, Maierle J, Votteler M, Rode C, Schnabelrauch M, Walles H, Schenke-Layland K. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Sep;21(9):2665-71. Epub 2010 Jul 17.
24. Silk: a potential medium for tissue engineering. Sobajo C, Behzad F, Yuan XF, Bayat A. *Eplasty*. 2008;8:e47. Epub 2008 Oct 10.

วัตถุประสงค์

1. นวัตกรรมใหม่ทางการแพทย์ พัฒนาเพื่อการรักษาผู้ป่วยโดยการปลูกถ่ายกลับผิวหนังสังเคราะห์ (Reconstructed Skin Equivalent) เพื่อพัฒนาใช้ส่วนประกอบทางชีวภาพทั้งหมดที่ได้มาจากตัวผู้ป่วยเอง โดยจะลดอัตราการปนเปื้อนทางชีวภาพหากใช้ส่วนประกอบทางชีวภาพจากผู้ป่วยคนอื่น (Contamination) หรือมีการต่อต้านเนื้อเยื่อหากไม่ใช่ของตัวผู้ป่วยเอง (Tissue rejection)
2. พัฒนาระบบการค้นคว้าการประดิษฐ์โครงร่างของผิวหนังสังเคราะห์หนังแท้ (dermal scaffold) ในห้องทดลองในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้จริงทางคลินิก โดยมีการคำนวณต้นทุน และคิดระเบียบวิธีวิจัยที่สามารถนำไปผลิตใช้ได้ในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มใหญ่ขึ้น และ/หรือ ระเบียบวิธีวิจัยและเทคนิคสามารถจดทะเบียนลิขสิทธิ์ทางการค้าได้
3. สามารถลดการนำเข้าผิวหนังสังเคราะห์จากต่างประเทศ เนื่องจากปัจจุบัน ผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องใช้ จะต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้น และอีกทั้งมีราคาแพงมาก (ประมาณ 40,000 บาท ต่อชิ้น ขนาด 10X10 ตารางเซนติเมตร)

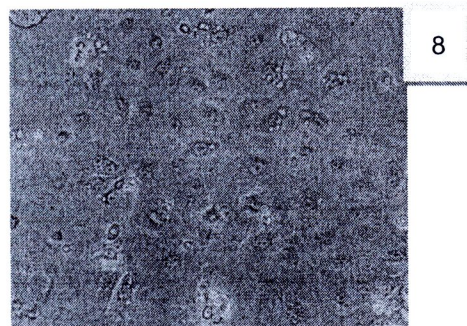
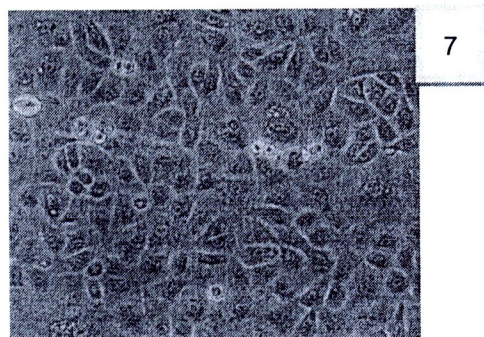
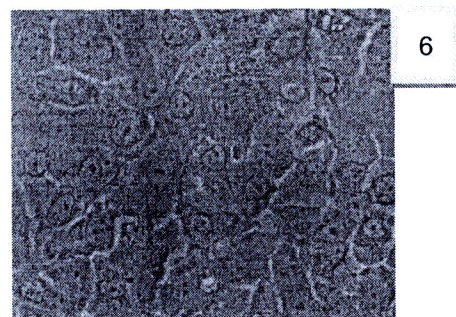
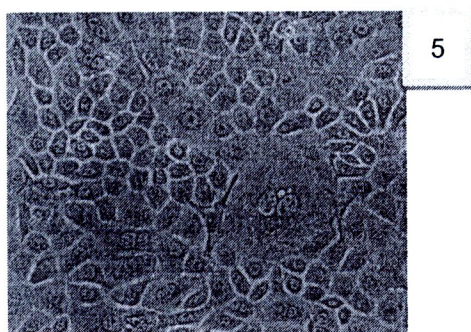
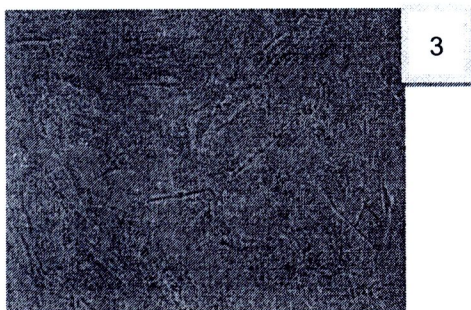
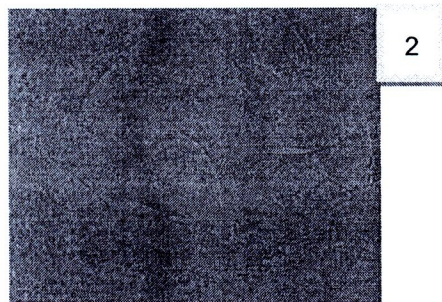
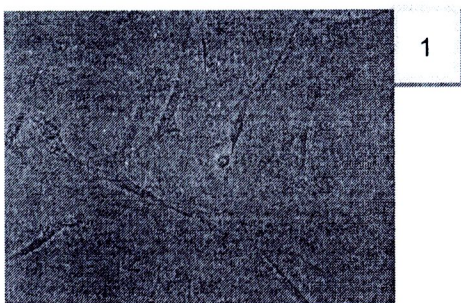
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

1. เซลล์และการเลี้ยงเซลล์

การเลี้ยงเซลล์ Fibroblasts และเซลล์ Keratinocyte

ภาพเซลล์ Fibroblasts ที่เลี้ยงใน 100 x 20 mm TC dish ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM รูปที่ 1, 2 แสดงรูปเซลล์ Fibroblasts ที่เพิ่งเริ่มเลี้ยงเซลล์จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เมื่อเลี้ยงในระยะเวลาที่นานขึ้น เซลล์ Fibroblasts จะเกาะตัวกันแน่นดังที่แสดงในรูปที่ 3, 4 และใช้ Fibroblast ที่ passages ประมาณ 3-5 ในการทดสอบ รูปที่ 5-8 แสดงรูป เซลล์ Fibroblast (รูป 1-4) และ Keratinocyte (รูป 5-8) ที่เลี้ยงใน 100 x 20 mm TC dish ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Fibroblast หรือ Keratinocyte media ตามลำดับ

รูปแสดงผลการเลี้ยงเซลล์ monolayer (fibroblast ,Keratinocyte)



2. การทำผิวหนังสังเคราะห์จาก animal collagen gel (standard method)

มีวิธีการทำดังต่อไปนี้

Method 1

1. Dissolve each vial of the lyophilized Collagen in 3.3 ml sterile 0.2% acetic acid (v/v). pH 3.0 or 1 mM hydrochloric acid, pH 3.0 .This gives a final concentration of 3 mg/ml.

Note : If 2 ul/ml phenolred is added. The change of the pH is easier to control.

2. Let it stand overnight for swelling up.
3. Pipette 100 ul of this collagen solution per 1 cm² surface area to be covered into the culture vessel.

Note: this gives an approximately 1 mm thick collagen gel layer.

4. The collagen solution is then exposed to ammonia vapors at 15 – 25 °C or 37 °C.
5. An example for preparing a collagen gel in a 35 mm dish :
 - Pipette 100 ul 25% ammonia solution (v/v) into a 60-mm petri dish
 - A 35-mm dish containing 1 ml collagen solution is placed in the 60-mm dish which is then closed.

Note : If phenolred is present in the collagen solution. The change of the pH can be easily observed (color change to neutral).

- If there is no pH indicator in the collagen solution the 35-mm dish should be removed after max. 2 min

Note : If the gel layer is thicker the gel needs longer to solidify

6. After about 2 min the gel should be solidified. Equilibrate the gel with an appropriate amount of medium for 30 min

Note : This is necessary to remove excess ammonia which is toxic to the cells. A longer period for equilibration is needed for a thicker collagen layer.

7. Aspirate the medium
8. Then the cell can be seeded onto the gel.

Additional reagents required

- Sterile 0.2% acetic acid (v/v). pH 3.0 or 1 mM hydrochloric acid . pH 3.0.
- Sterile 10 x (5 x) concentrated medium with sodium bicarbonate. pH 7.4.
- Sterile (10x) 0.2 M Hepes. pH 7.3 (dilute 1 M Hepes tissue culture tested. 1 : 5 with sterile double dist. Water)

Method 2

1. Dissolve each vial of the lyophilized Collagen in 3.3 ml sterile 0.2% acetic acid (v/v). pH 3.0 or 1 mM hydrochloric acid, pH 3.0 .This gives a final concentration of 3 mg/ml.
2. Mix the following solution at $2 - 8^{\circ}\text{C}$. avoid the formation of air bubbles:
 - 1 (or 2) parts of sterile 10 x (5 x) concentrated medium. With sodium bicarbonate. pH 7.4.
 - 1 part of sterile (10 x) 0.2 M Hepes, pH 7.3 (dilute 1 M Hepes, tissue culture tested. 1: 5 with sterile double dist. Water)
 - 8 (or 7) parts of the sterile collagen solution.

Note: The mixture remains liquid at $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

3. Pipette 100 ul of this neutralized collagen solution per 1 cm^2 surface area to be covered into the culture vessel.

Note: this gives an approximately 1 mm thick collagen gel layer.

4. Incubate for approx. 2 – 3 h at $15 - 25^{\circ}\text{C}$ or 37°C in a humidified atmosphere to allow gel formation

Note: The culture dishes can be stored at $2 - 8^{\circ}\text{C}$ under sterile condition.

5. Before inoculating the cell suspension it is recommended to cover the gel with medium for about 15 min for equilibration.
6. The cells are plated as usual.

Note: To allow the formation of a homogeneous gel and to avoid clump formation do not or very carefully move culture vessels during gel formation

Procedure Coating of cell culture dishes with collagen (=collagen film). Please refer to the following table.

1. Dissolve each vial of the lyophilized Collagen with 5 ml sterile 0.2% acetic acid (v/v). to gives a final concentration of 2 mg/ml.
2. Pipette 2.5 ul of this solution (2 mg/ml) per 1 cm^2 surface area to be covered (5 ul/cm²)

Note: this can be increased or decreased to fit the application.

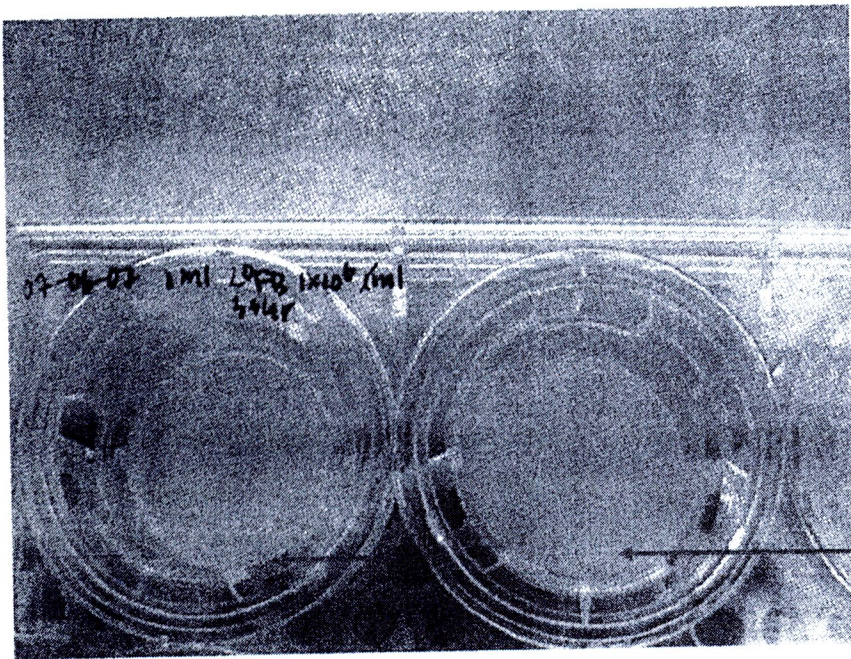
3. Carefully spread the collagen solution with a sterile rubber policeman on the bottom of the culture dish.
4. Air dry for about 60 min at $15 - 25^{\circ}\text{C}$ in the laminar flow hood
5. It is possible but not essential. To wash the coated surface with medium or buffer.
6. The dishes can be use immediately or stored under sterile conditions.

ผลการทดลอง

จากการทดลอง พบว่า Collagen ไม่ set ตัว ทำให้ไม่สามารถทำการทดลอง Standard method จาก animal collagen gel เพื่อใช้เป็น Standard reference ของการทดลองนี้ได้ เนื่องจากไม่สามารถนำเข้า Collagen type I gel set จาก บริษัท Nitta gelatin Inc. ประเทศญี่ปุ่นได้ เพราะ

1. ไม่มี sale representative ในประเทศไทย
2. ไม่สามารถนำเข้ามาได้เองเพราะติดกฎเกณฑ์ของศุลกากร เพราะเป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์เท้ากบ
3. เมื่อใช้ Collagen จากบริษัท Roche ซึ่งมีลักษณะเป็นผง ไม่สามารถขึ้นรูปเป็น solid gel ได้ (failed experiment 2 ครั้ง)

ภาพจากการทดลอง



เนื้อ Collagen gel ที่ไม่เซตตัว
หลังจาก incubation ที่
37° Celsius เป็นเวลา
เกิน 2 ชั่วโมง

ภาพประกอบ collagen ที่ไม่ set ตัว

แนวทางแก้ไข

เนื่องจากผิวหนังสังเคราะห์มีส่วนประกอบหลักๆ 2 ชั้น คือ

1. ชั้นเสมือนหนังแท้ : ประกอบด้วยเซลล์ fibroblasts ลอยอยู่ใน dermal scaffold.
2. ชั้นเสมือนหนังกำพร้า : ประกอบด้วยเซลล์ keratinocytes ทับซ้อนกัน

ในธรรมชาติ dermal scaffold เป็นสารที่ผลิตจาก fibroblasts เช่น hyaluronic acid , collagen fiber และ elastin fiber เป็นต้น แต่ผิวหนังสังเคราะห์จำเป็นต้องสร้างชั้น dermal scaffold ขึ้นมาเพื่อให้เซลล์ fibroblasts ได้ยึดเกาะเป็นโครงร่าง จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสามารถประดิษฐ์ได้จากสิ่งต่าง ๆ ดังสรุปในตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 Systematic classification of currently available biologic and synthetic skin substitutes

Biologicals (Naturally occurring tissues)
- Cutaneous allografts (-irradiated, deep frozen, glycerolized) - Cutaneous xenografts - Amniotic membranes
Skin substitutes
- Synthetic bilaminates - Collagen based composites
Collagen based dermal analogs
- De-epithelized allograft
Culture-derived tissue
- Cultred autologous keratinocytes (sheet grafts. Cell suspensions) - Bilayer human tissue - Polyglycolic or acid mesh - Fibroblast seeded dermal analogs - Collagen-glycosaminoglycan matrix - Epithelial seeded dermal analogs

แต่เนื่องจาก collagen solution set (Roche.USA) ไม่สามารถขึ้นรูปตัวเป็น hydrogel ได้ และล้มเหลวถึง 2 ครั้ง และไม่สามารถสั่งจากแหล่งผลิตอื่นได้ ทางผู้วิจัยจึงพิจารณาเปลี่ยนสารที่จะใช้พัฒนาเป็น dermal scaffold ซึ่งต่อมาได้พิจารณาใช้ silk fibroin เนื่องจากเป็นสารที่หาได้ในประเทศไทย และทบทวนวรรณกรรมพบว่าคุณสมบัติเบื้องต้นมีแนวโน้มที่ดีในทางชีวภาพ [24]

ผู้วิจัยจึงพิจารณาเปลี่ยนการสังเคราะห์ dermal scaffold เป็นสารสกัดจาก silk fibroin โดย co-operate กับ คณะวิศวกรรมศาสตร์ ม.มหิดล เนื่องจาก

1. Silk fibroin เป็นสารที่มี evidence ในการทำเป็น scaffold ของ Tissue engineering แต่ไม่มีรายงานว่ามีการนำมาเป็น skin scaffold จึงถือว่าเป็น New experiment
2. น่าสนใจเนื่องจากมี center ที่สามารถ supply skin scaffold จาก Silk fibroin ได้ในประเทศไทย และสามารถกำหนดคุณลักษณะ (specification) ของสารตามที่ต้องการได้

ทางผู้วิจัยได้ทบทวนการศึกษาวิจัยของการสังเคราะห์ผิวหนังเทียม แสดงรายละเอียดในตารางที่ 2 (Table 2) พบว่ายังไม่มีมีการประดิษฐ์ dermal scaffold จาก silk fibroin ดังนั้นจึงถือเป็นโอกาสที่ดีเพื่อจะได้คิดค้นสิ่งประดิษฐ์ใหม่

Table 2 Currently commercially available or marketed matrices and products for tissue engineered skin substitutes

Material	Brand Name	Manufacturer
Collagen gel + cult.Allog	Apligraf TM	Organogenesis,
HuKm + allog. HuFi	(earlier name : Graftskin TM)	Canton. MA
Cult.Autol Huk	Epicell TM	Genzyme Biosurgery
		Cambridge. MA
PGA/PLA + ECMP DAHF	Transcyte TM	Advanced Tissue
		Lajolla, CA
Collagen GAG-	Integra TM	Integra LifeScience,
Silicone foil		Planinsborough.NJ
Acellular dermis	AlloDerm TM	Lifecell Corporation,
		Branchberg,NJ
HAM + cult.HuK	Laserskin TM	Fidia Advanced
		Biopolymers, Padua.Italy
PGA/PLA + allog.HuFi	Dermagraft TM	Advanced Tissue Sciences,
		LaJolla.CA
Collagen + allog.HuFi +	Orcel TM	Ortec International.Inc.,New
Allog Huk		York.NY
Fibrin sealant + cult.autol	Bioseed TM	BioTissue Technologies
HuK		Freiburg.Germany
PEO/PBT + autol.HuFi+	Polyactive TM	HC Implants
cult autol HuK		
HAM + HuFi	Hyalograft 3D TM	Fidia Advanced
		Biopolymers, Padua.Italy
Silicone + nylon mesh +	Biobrane TM	Dow Hickham/Berrek
Collagen		Pharmac.,Sugar Land, TX

ECMP = extracellular matrixprotein,DAHF = derived from allog. Hufi. GAG = glycosanminoglycan. PGA = polycolic acid (DexonTM). PLA = polylactic acid (VicrylTM).PEO =polyethylene oxide.PBT = polybutyliterephthalate, cult. = cultured;autol. = autologous, allog. = allogeneic. HuFi = human fibroblasts. HuK =human keratinocytes. HAM = microperforated Hyaluronic Acid Membrane (benzilic esters of hyaluronic acid =HYAFF-11®)



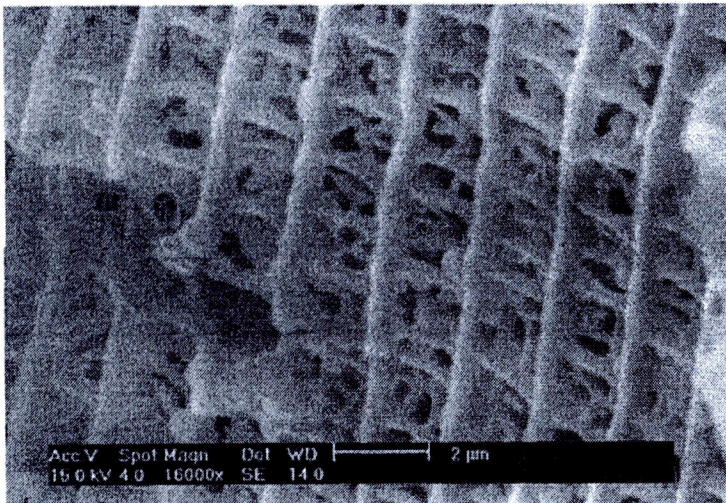
2. การสังเคราะห์ dermal scaffold จาก silk fibroin

เนื่องจากเป็นวัสดุใหม่ จึงจำเป็นต้อง

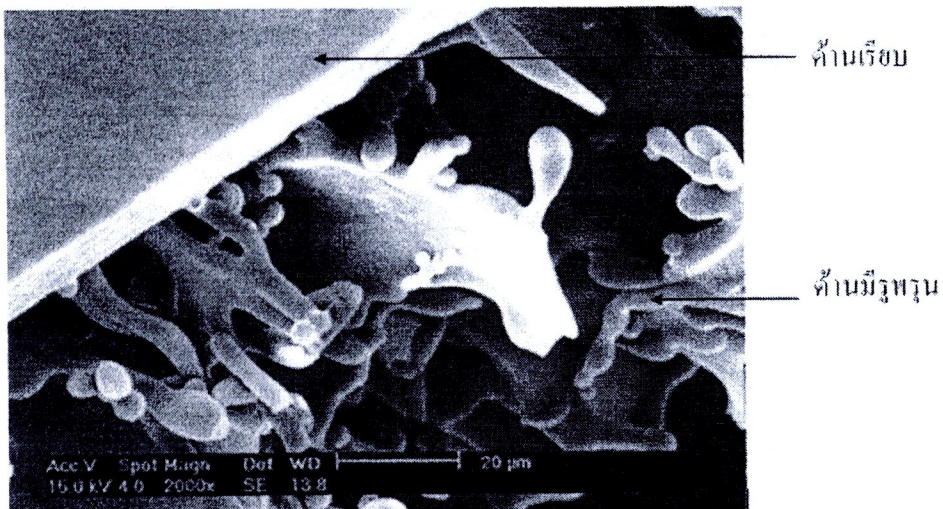
1. ไม่สามารถทำการทดลองในคนได้ จำเป็นต้องลดทอนที่เป็น human trial ออกไปก่อนจนกว่าจะมีการทดสอบผ่านระดับ vitro และ animal model
2. Attachment test และ cytotoxicity test เพื่อยืนยันว่าวัสดุที่ใช้เป็นวัสดุที่สามารถให้เซลล์ยึดเกาะ (attachment) และทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ (proliferate) โดยการ test
 - 2.1 Cell toxicity test โดย MTT method เพื่อดูความเป็นพิษต่อเซลล์ fibroblast และ keratinocytes
 - 2.2 Attachment test Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อดูการยึดเกาะของเซลล์ fibroblast

การทดสอบ Attachment test โดย : Scanning Electron Microscope (SEM)

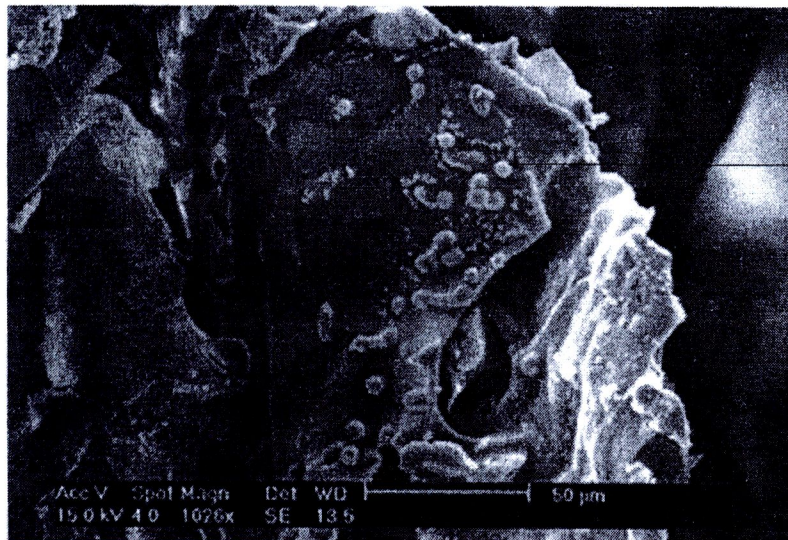
1. แสดงภาพตัดด้านล่างของ silk scaffold



2. แสดงภาพตัดสองด้านของ silk scaffold

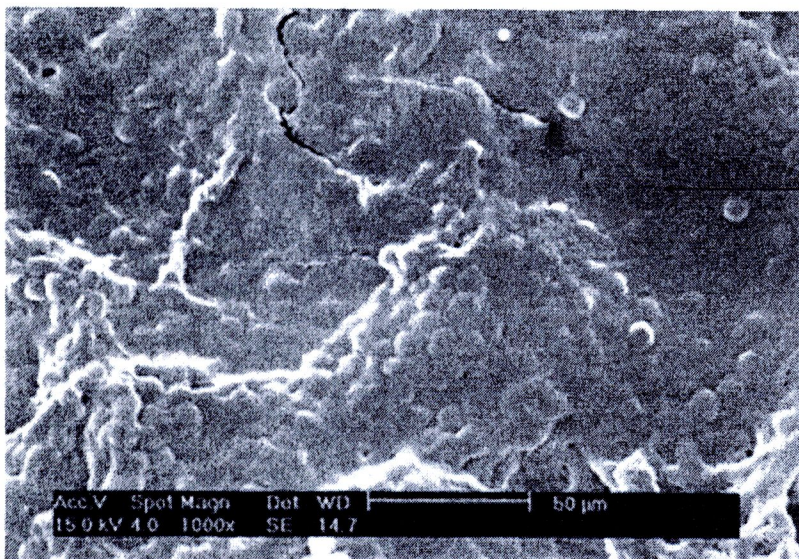


3. ภาพถ่ายหลังเลี้ยง fibroblasts 48 ชั่วโมง



Fibroblasts
attached on silk
scaffold

4. ภาพถ่ายหลังเลี้ยง fibroblasts 14 วัน



Fibroblasts
proliferated cover
all the surface of
silk scaffold

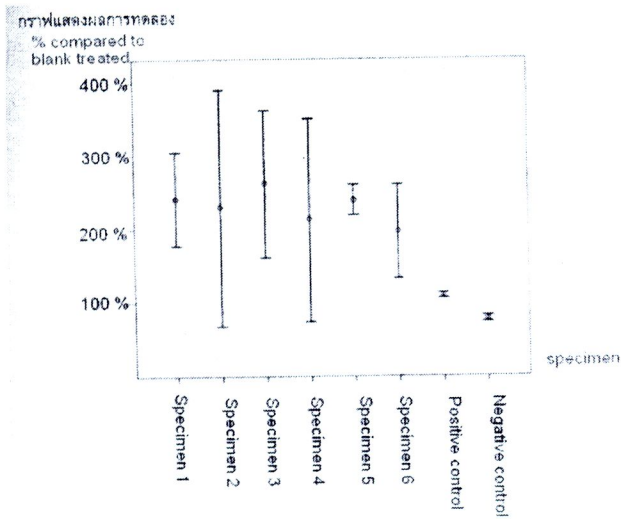
พบว่า silk scaffold มีคุณสมบัติที่สามารถให้ fibroblasts เกาะได้ และสามารถให้เซลล์เหล่านั้นเจริญงอกงามบนตัวมันด้วยเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง และ migrate จนเต็มพื้นที่ ในเวลา 14 วัน อันเป็นคุณสมบัติ เบื้องต้นของ Biomaterial scaffold

การทดสอบ Cytotoxicity test โดย MTT method : Fibroblast และ keratinocytes

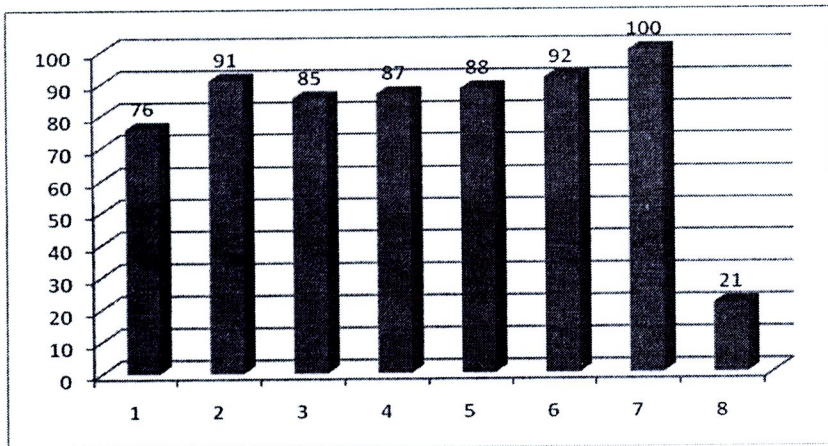
ทดสอบ Cell toxicity test โดย MTT method กับ โหมฟันธ์ดอกบัวที่ Degum ต่าง ๆ กัน
เซลล์ Fibroblasts

	1	2	3	4	5	6	รวม	%	หมายเลข
A	0.229	0.247	0.267	0.245	0.244	0.221	1.453	76	1
B	0.238	0.307	0.306	0.313	0.291	0.291	1.746	91	2
C	0.256	0.317	0.199	0.306	0.294	0.265	1.637	85	3
D	0.263	0.307	0.285	0.282	0.244	0.282	1.663	87	4
E	0.247	0.311	0.307	0.277	0.288	0.263	1.693	88	5
F	0.274	0.338	0.3	0.263	0.298	0.286	1.759	92	6
G	0.29	0.334	0.34	0.343	0.31	0.304	1.921	100	7
H	0.067	0.068	0.069	0.069	0.069	0.069	0.411	21	8

- A โหมฟันธ์ดอกบัว degum 0
- B โหมฟันธ์ดอกบัว degum 20
- C โหมฟันธ์ดอกบัว degum 40
- D โหมฟันธ์ดอกบัว degum 60
- E โหมฟันธ์ดอกบัว degum 80
- F โหมฟันธ์ดอกบัว degum 100
- G Positive control
- H Negative control



กราฟแสดง % viable Fibroblast cell Fibroblast เมื่อเทียบกับ Control



โดยที่

- specimen 1 คือ silk scaffold สกัดแบบ DG45-00-D5 60
- specimen 2 คือ silk scaffold สกัดแบบ DG45-15-D5 60
- specimen 3 คือ silk scaffold สกัดแบบ DG45-30-D5 60
- specimen 4 คือ silk scaffold สกัดแบบ DG45-45-D5 60
- specimen 5 คือ silk scaffold สกัดแบบ DG45-60-D5 60
- specimen 6 คือ silk scaffold สกัดแบบ DG45-75-D5 60
- Positive control คือ fibroblast เลี้ยงใน media แบบปกติ
- Negative control คือ media เปล่าไม่มีเซลล์

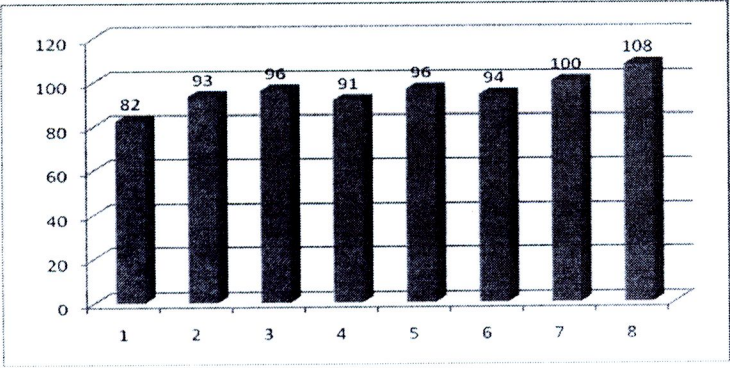
ผลที่ได้จากการทดลอง พบว่า ค่าที่ได้จากการเลี้ยง fibroblasts โดยมี silk scaffold incubate ร่วมสามารถอ่านค่าได้มากกว่า positive control ใน specimen ที่ 1, 3, 5 และ 6 โดย specimen ที่ 2 และ 4 ค่าเฉลี่ย เท่ากับค่าที่อ่านได้จาก positive control ซึ่งแปลผลได้ว่า silk scaffold ทั้ง 6 แบบ ไม่ก่อให้เกิดพิษหรือการตายของเซลล์ อีกทั้งใน specimen ที่ 1, 3, 5 และ 6 ยังสามารถทำให้มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจากปกติอีกด้วย

ทดสอบ Cell toxicity test โดย MTT method กับ ไหมพันธุ์ดอกบัวที่ Degum ต่าง ๆ กัน
เซลล์ Keratinocyte

	1	2	3	4	5	6	รวม	%	หมายเลข
A	0.052	0.049	0.051	0.051	0.051	0.05	0.304	82	1
B	0.061	0.055	0.057	0.059	0.06	0.053	0.345	93	2
C	0.051	0.064	0.06	0.073	0.055	0.052	0.355	96	3
D	0.054	0.064	0.056	0.056	0.054	0.054	0.338	91	4
E	0.053	0.059	0.072	0.058	0.057	0.058	0.357	96	5
F	0.053	0.056	0.061	0.058	0.059	0.06	0.347	94	6
G	0.066	0.061	0.062	0.06	0.061	0.06	0.37	100	7
H	0.066	0.062	0.079	0.068	0.061	0.062	0.398	108	8

- A ไหมพันธุ์ดอกบัว degum 0
- B ไหมพันธุ์ดอกบัว degum 20
- C ไหมพันธุ์ดอกบัว degum 40
- D ไหมพันธุ์ดอกบัว degum 60
- E ไหมพันธุ์ดอกบัว degum 80
- F ไหมพันธุ์ดอกบัว degum 100
- G Positive control
- H Negative control

กราฟแสดง % viable cell เมื่อเทียบกับ Control

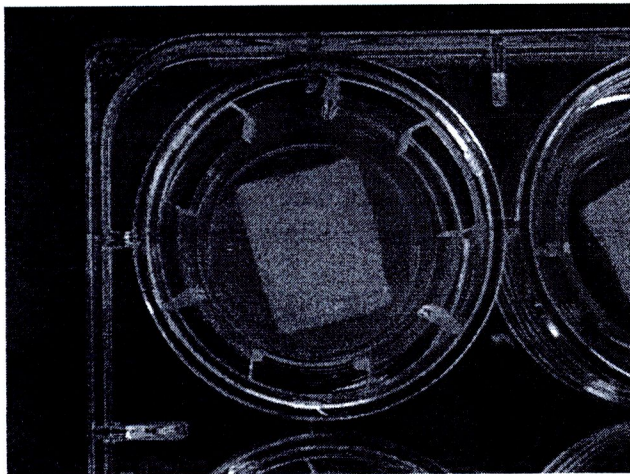
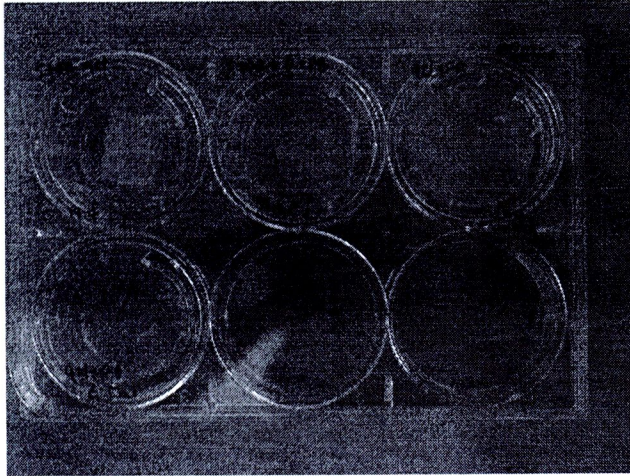


หมายเหตุ จากผลการทดลอง เซลล์ Keratinocyte ดายหมดเนื่องจาก 96 well plate ที่ใช้ไม่ได้เคลือบ
คอลลาเจน แต่ dermal scaffold interaction กับชั้นที่มี fibroblast เป็นส่วนใหญ่ดังนั้นจึงถือผล MTT test ที่มีต่อ
fibroblast เป็นหลัก

การทดลองเพื่อทดสอบคุณสมบัติของการเป็นโครงสร้างผิวหนัง

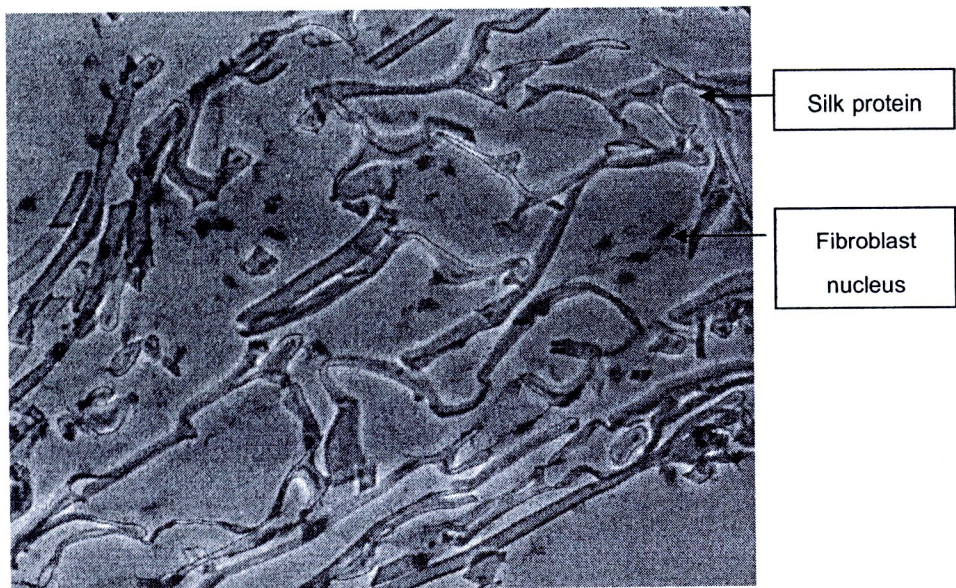
1. ลักษณะทางกายภาพ (Gross morphology) หลังขึ้นรูป
2. ลักษณะทางภาพตัด (Histology) โดย Hematoxylin and Eosin

ลักษณะทางกายภาพ (Gross morphology) หลังขึ้นรูป

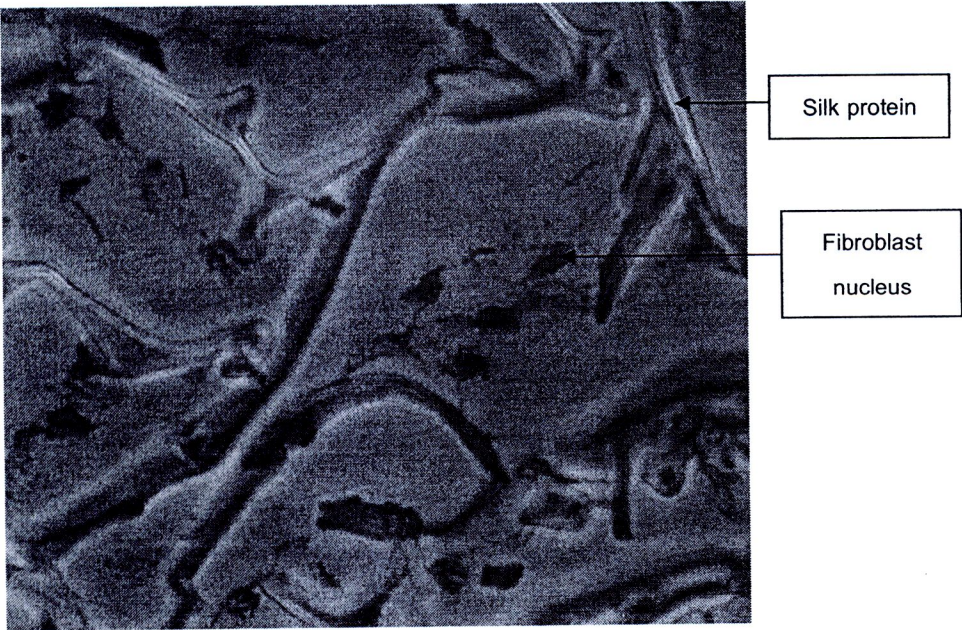


ลักษณะทางภาพตัด (Histology) โดย Hematoxylin and Eosin ของ Skin equivalent ที่ขึ้นรูป
จาก silk scaffold

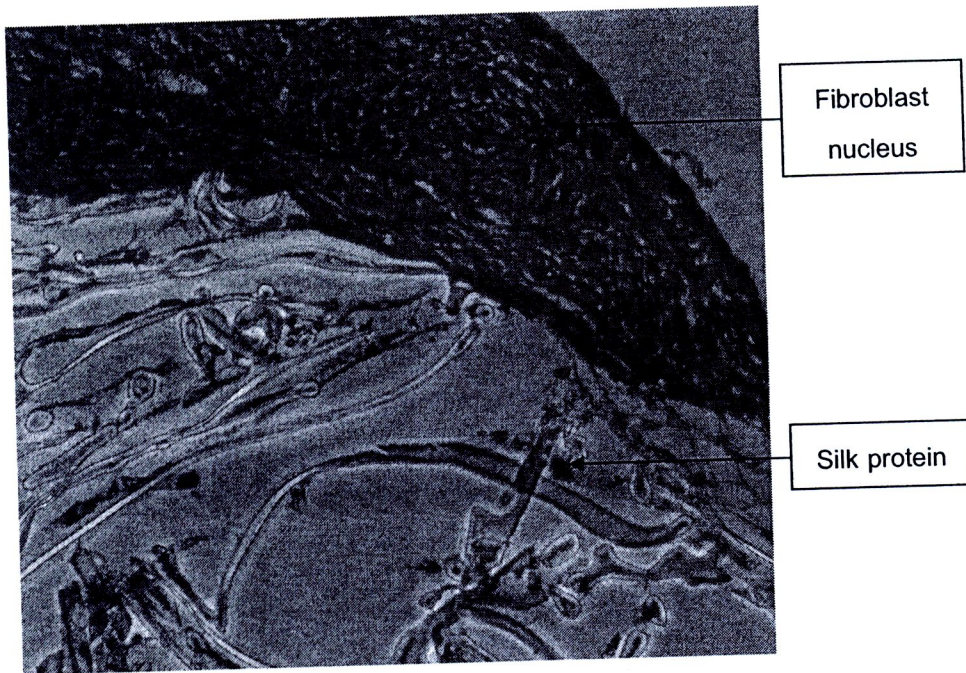
Sample 1 (ตัดหนา 10 um)



H&E 10 um formaline กำลังขยาย 100x



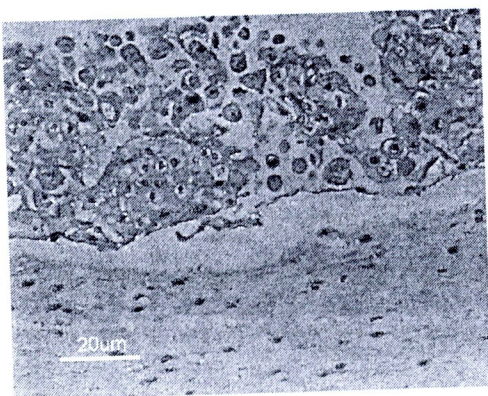
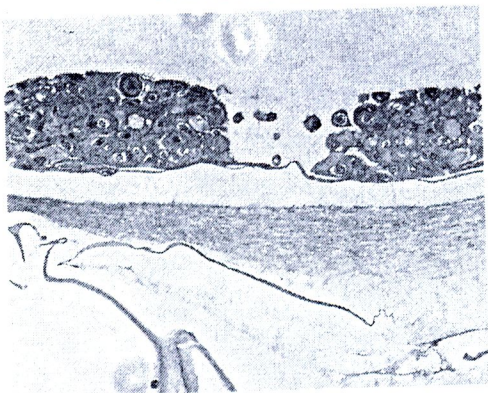
H&E 10 um formaline กำลังขยาย 200x



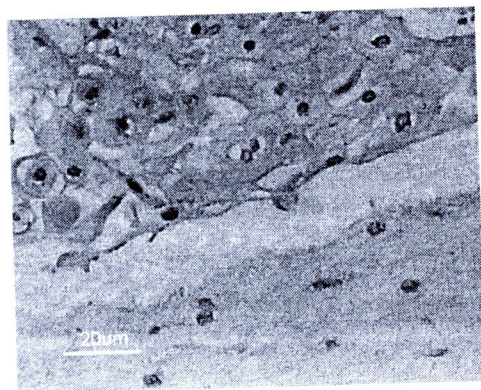
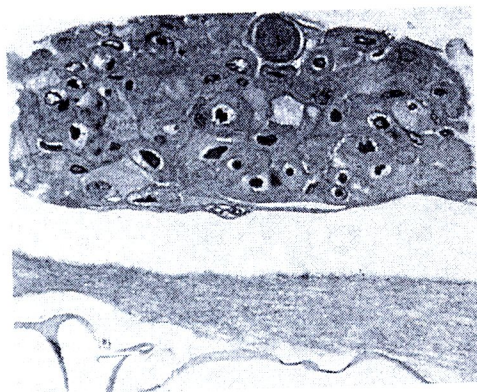
H&E 10 um formaline กำลังขยาย 100x

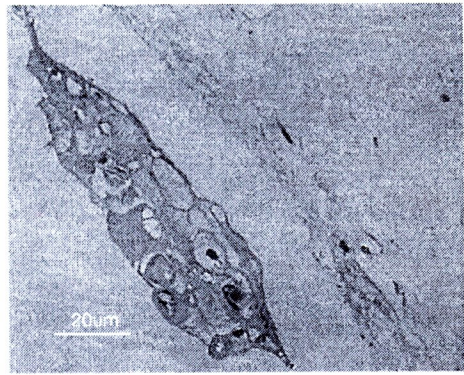
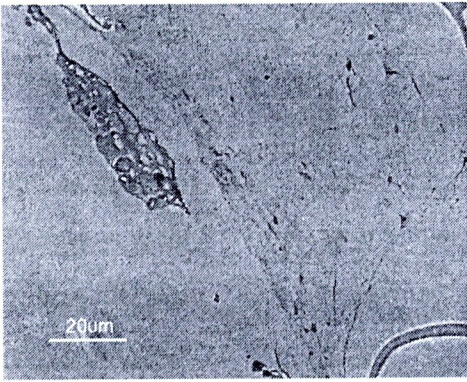
ลักษณะ Microscopic หลังขึ้นรูปและ seed keratinocyte cells แต่ไม่สามารถขึ้นเป็นชั้นได้เนื่องจากผิวหน้า dermal scaffold ไม่เรียบเนียน จึงไม่สามารถเป็นฐานให้ keratinocyte เรียงตัวเป็นชั้นได้

กำลังขยาย 10x



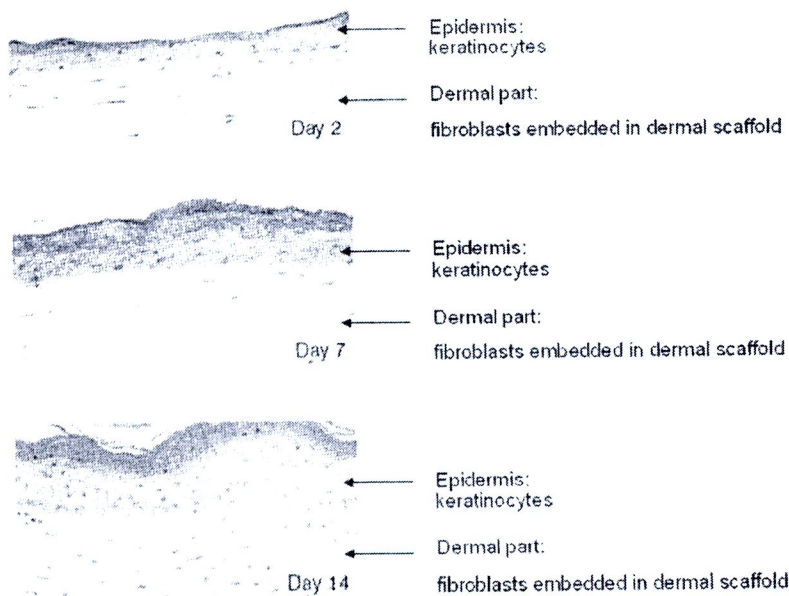
กำลังขยาย 20x





จากการทดสอบ gross morphology พบว่า silk fibro จาก freeze dry มีลักษณะเปราะแตกได้ง่าย และเมื่อตัด Histology ไม่สามารถเป็นโครงร่างให้ fibroblasts ยึดเกาะได้ หรือเป็นฐานให้ keratinocytes ซ้อนทับกันเป็นชั้น ๆ ได้อย่างที่ควรจะเป็น

ตัวอย่าง dermal scaffold ที่ดี



ทางผู้วิจัยได้เล็งเห็นปัญหาจึงคิดค้นวิธีการประดิษฐ์ที่สามารถขึ้นรูป silk fibroin ได้ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อไป ซึ่ง form ที่เหมาะสมคือ Hydrogel

เนื่องจาก silk เป็น protein จากธรรมชาติที่มีการสลายตามธรรมชาติ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า silk fibroin สามารถละลายออกมาเป็น amino acid ได้ ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบสมมุติฐานโดยการนำ freeze dry silk fibroin ทดสอบโดยในการ SDS gel electrophoresis และ วัดค่า FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

ตัวอย่าง silk fibroin

No	รหัส Silk	น้ำหนัก Silk (mg)
1.1	DG-45-00-DS60	80.5
1.2	DG-45-15-DS60	80.7
1.3	DG-45-30-DS60	79.6
1.4	DG-45-45-DS60	82.0
1.5	DG-45-60-DS60	75.4
1.6	DG-45-70-DS60	81.6
2.1	DG-45-00-DS60	45.6
2.2	DG-45-15-DS60	48.8
2.3	DG-45-30-DS60	48.5
2.4	DG-45-45-DS60	46.9
2.5	เกิดการปนเปื้อน	-
2.6	DG-45-70-DS60	50.9
3.1	DG-45-00-DS60	48.0
3.2	DG-45-15-DS60	47.2
3.3	DG-45-30-DS60	46.4
3.4	DG-45-45-DS60	47.7
3.5	DG-45-60-DS60	48.7
3.6	DG-45-70-DS60	50.2

1. การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนโดยวิธี SDS gel

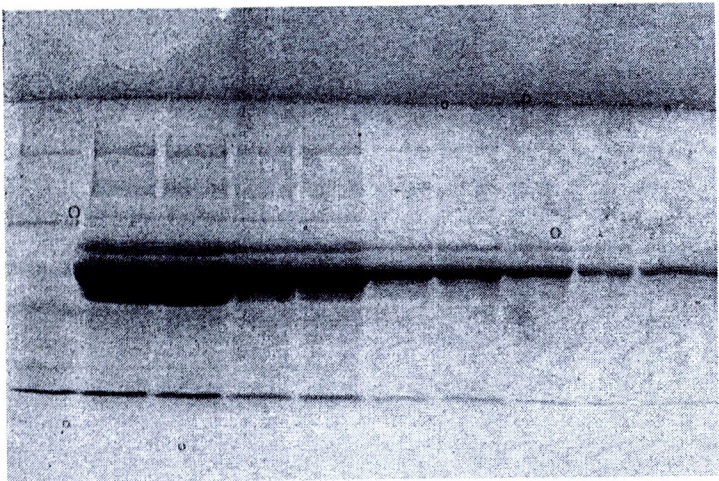
เนื่องจากการทดลอง Cytotoxicity test โดยวิธี MTT assay พบว่า ไม่เพียงแต่ Media ที่ incubate กับ Silk fibroin จะไม่ทำให้เกิด Toxic กับ fibroblast แล้วนั้น กลับยังทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่า Media ที่ไม่ได้ incubate กับ silk ดังนั้นเราจึงตั้งสมมติฐานว่าน่าจะมีโปรตีนจาก silk บางตัวที่ละลายหรือสลายออกมาใน media แล้วส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีขึ้น เราจึงเลือกวิธี Run SDS gel electrophoresis เพื่อหา molecular weight ของสารที่น่าจะเป็น

ผลการ Run SDS gel electrophoresis

การทดสอบหา % Acrylamide และ dilution ของ sample ที่เหมาะสม

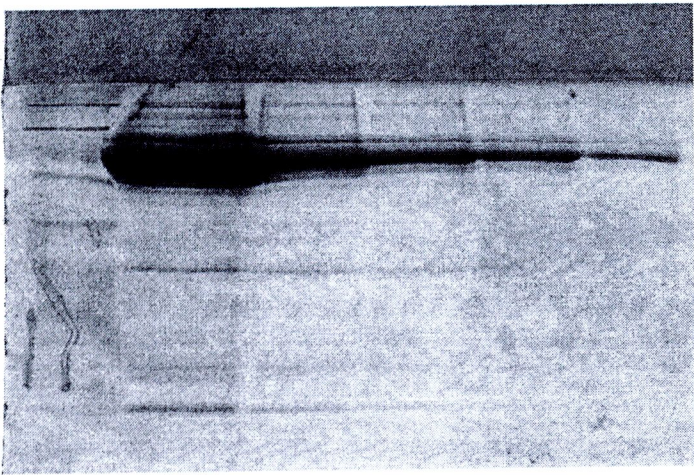
ทดสอบครั้งที่ 1 นำ sample มา dilution ที่ 1 1:2 1:5 1:10 และ 1:20

7.5 % Acrylamide



Marker 1 1:2 1:5 1:10 1:20

12.5 % Acrylamide

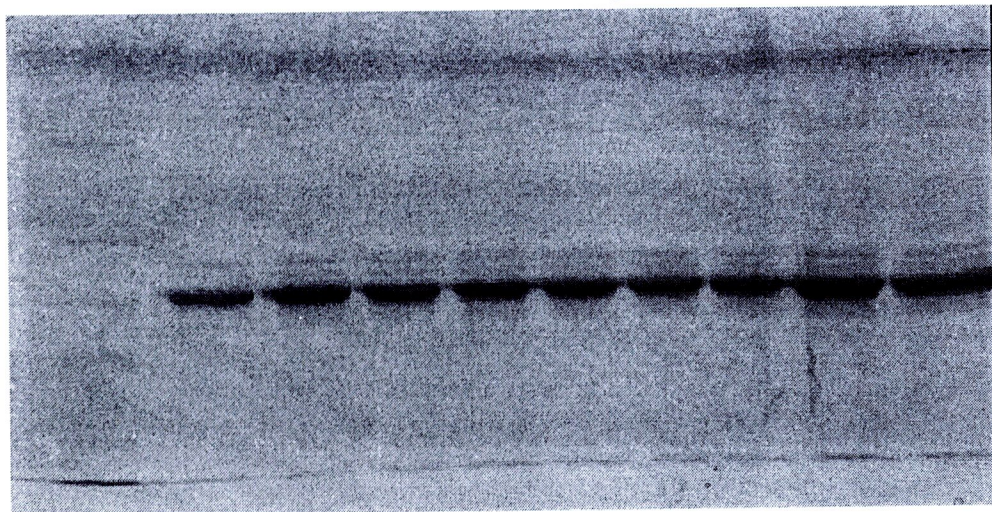


Marker 1 1:2 1:5 1:10 1:20

จากการทดลอง 7.5 % Acrylamide แยกแถบได้ดีกว่าและความเข้มข้นที่ควรใช้คือ 1:10 และ 1:5

ทดสอบครั้งที่ 2 นำ sample มา dilution ที่ 1:5 และ 1:10

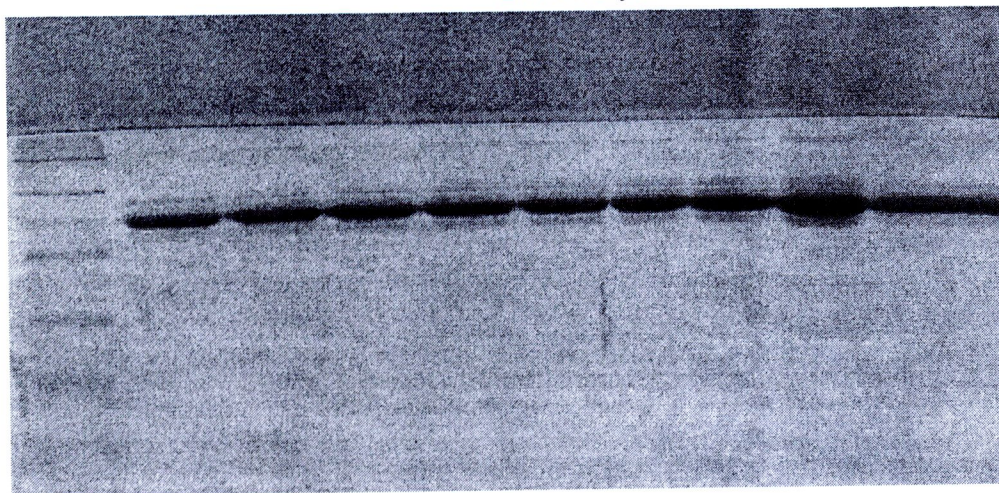
7.5 % Acrylamide



Marker Media 3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6 3.5 3.6

← 1: 10 → → 1: 5 →

12.5 % Acrylamide



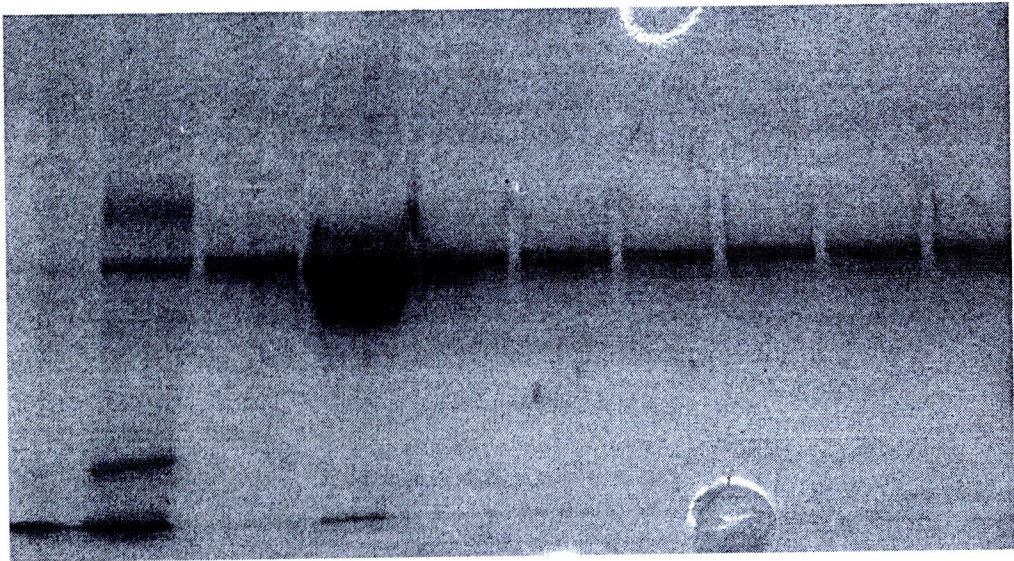
Marker Media 3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6 3.5 3.6

← 1: 10 → ← 1: 5 →

สรุปผลการทดลอง ใช้ 7.5 % Acrylamide เพราะ band สวยกว่า

ทดสอบครั้งที่ 3 sample ที่ dilution 1:10

7.5 % Acrylamide

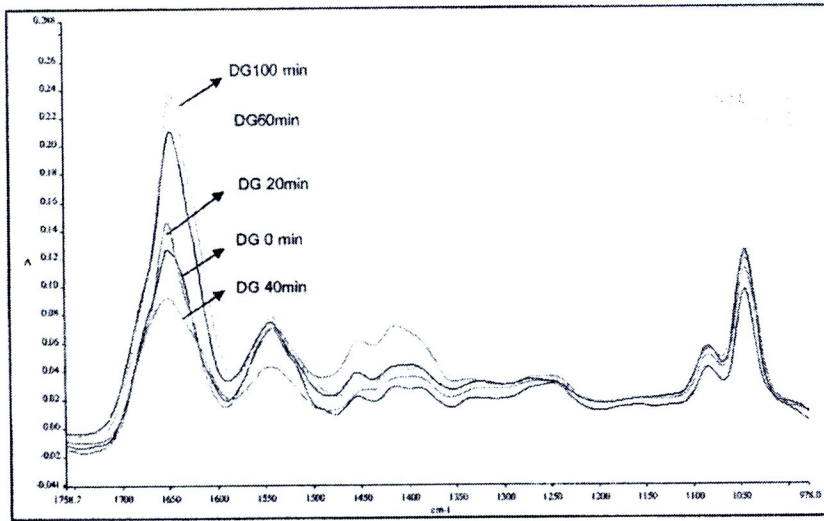


10%FCS/ FCS 3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6
DMEM

- ช่อง 1 Marker
- ช่อง 2 Marker + loading buffer
- ช่อง 3.1 -3.6 media + incubation with silk protein fibroblast for 72 hours



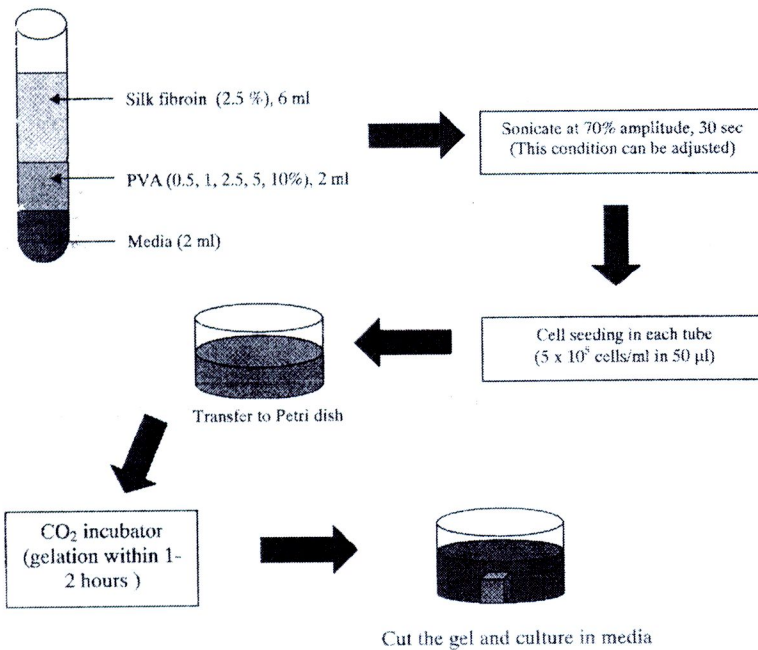
2. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) เพื่อทดสอบว่า silk หลังจากการ incubate กับ fibroblasts เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีโปรตีนเพิ่มขึ้นมาได้จริง
ระเบียบวิธีวิจัย ใช้สารละลาย media – silk 200 ul ในน้ำ 1000 ul เพื่อทำการทดสอบ



3. การพัฒนา silk fibroin ให้เป็น Hydrogel

1. Ultrasound sonication
2. Grammaray irradiation

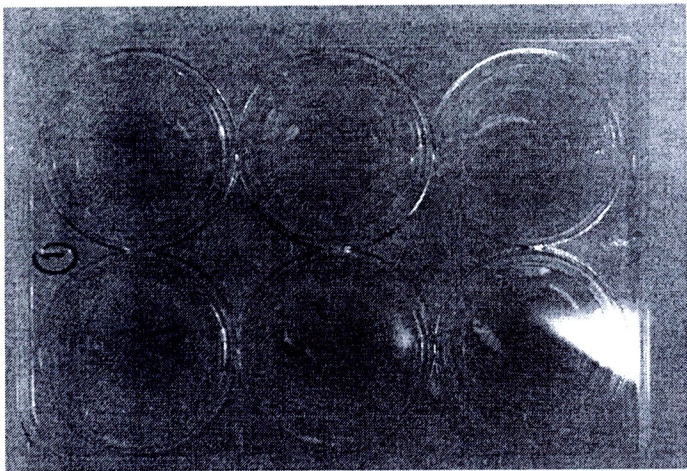
1.การทำ silk scaffold โดยใช้ Silk fibroin ผสมกับ PVA และ cross-link โดย Ultrasound sonication



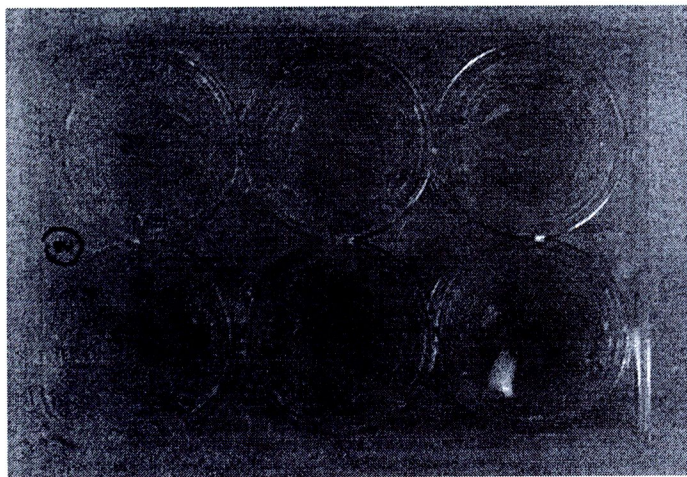
ตัวอย่าง silk scaffold ครั้งที่ 1

หมายเลข	% PVA	ปริมาณรวม	เซลล์ Fibroblasts
1.1	0.5%	2	มีเซลล์
2.1	0.5%	2	ไม่มีเซลล์
3.1	0.5%	1	มีเซลล์
1.2	1.0 %	2	มีเซลล์
2.2	1.0 %	2	ไม่มีเซลล์
3.2	1.0 %	1	มีเซลล์
1.3	2.5 %	2	มีเซลล์
2.3	2.5 %	2	ไม่มีเซลล์
3.3	2.5 %	1	มีเซลล์
1.4	5 %	2	มีเซลล์
2.4	5 %	2	ไม่มีเซลล์
3.4	5 %	1	มีเซลล์
1.5	10 %	2	มีเซลล์
2.5	10 %	2	ไม่มีเซลล์
3.5	10 %	1	มีเซลล์
1.6	0 %	2	มีเซลล์
2.6	0 %	2	ไม่มีเซลล์
3.6	0 %	1	มีเซลล์

รูปจากการทดลอง



Day 0
Plate 1 มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 2 ml



Day 0
Plate 2 ไม่มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 2

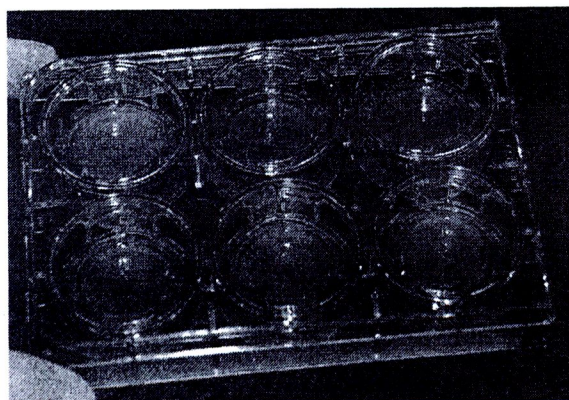


Day 0
Plate 3 มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 1 ml



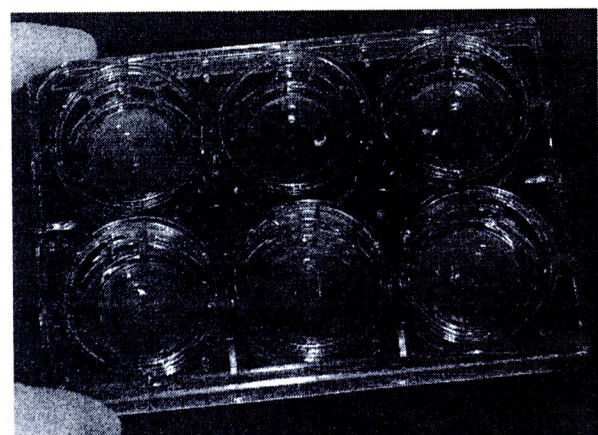
Day 14

Plate 1 มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 2 ml



Day 14

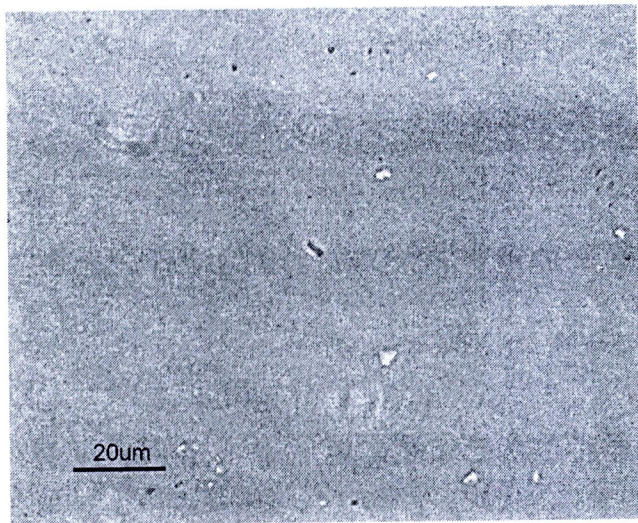
Plate 2 ไม่มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 2



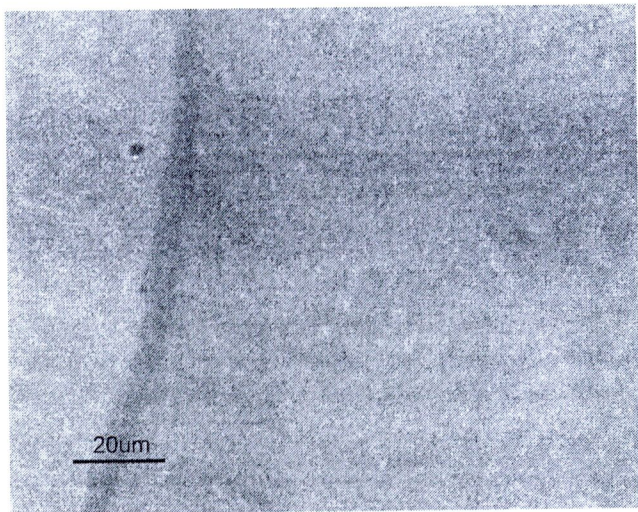
Day 14

Plate 3 มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 1 ml

ลักษณะทางภาพตัด (Histology) โดย Hematoxylin and Eosin ของ Skin equivalent ที่ขึ้นรูป
จาก silk scaffold



silk-H&E หมายเลข 1.1 (0.5%PVA) - 10x

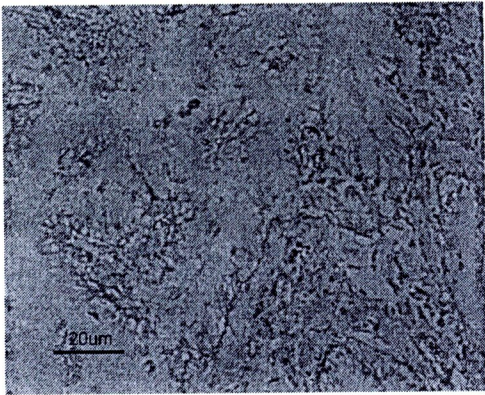


silk-H&E หมายเลข 1.1 (0.5%PVA) - 40x

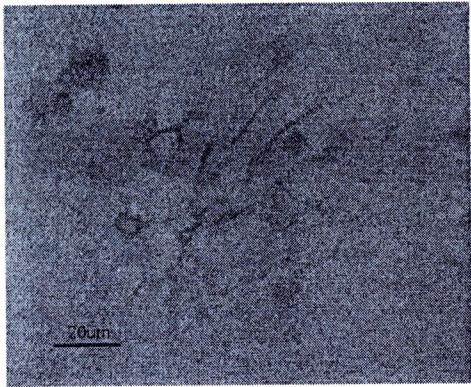
เนื่องจากสไลด์ที่ย้อมโดย Hematoxylin and Eosin ให้ภาพไม่ชัดเจน เพราะฉะนั้นสไลด์ต่อไปจะ
ถ่ายเฉพาะที่ย้อมโดย Vimentin

ลักษณะทางภาพตัด (Histology) ที่ย้อมโดย Vimentin ของ Skin equivalent ที่ขึ้นรูปจาก silk scaffold

silk- Vimentin หมายเลข 1.1 (0.5%PVA) มีเซลล์ Fibroblasts

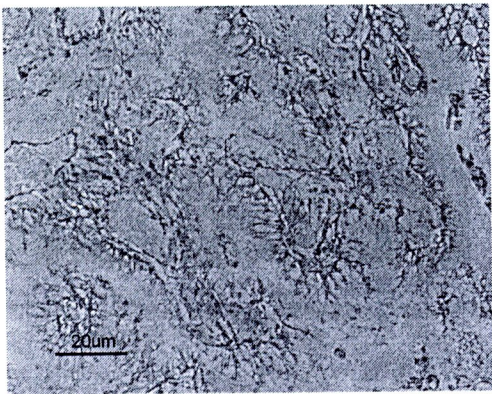


กำลังขยาย 10x

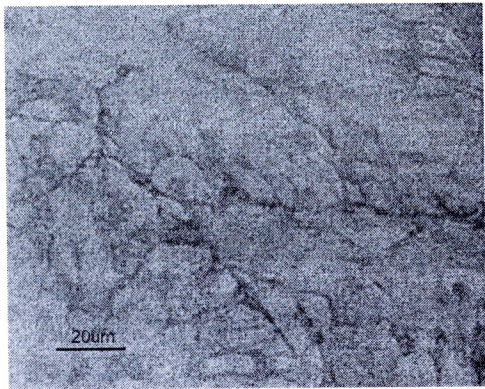


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 1.2 (1.0%PVA) มีเซลล์ Fibroblasts

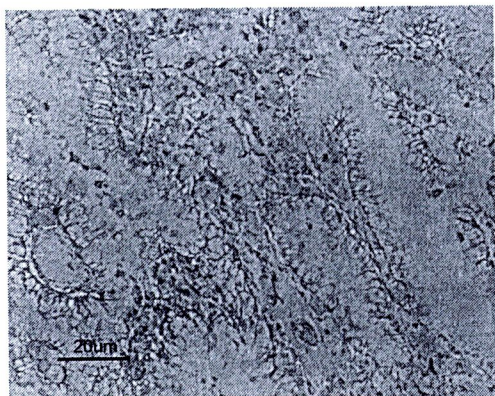


กำลังขยาย 10x

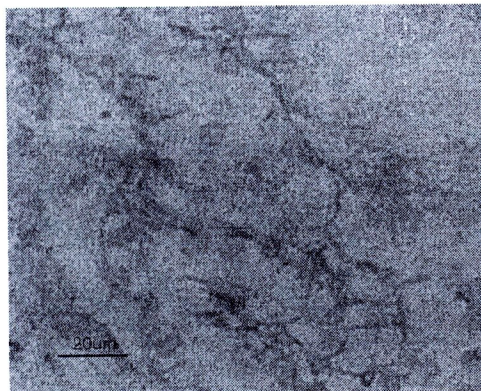


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 1.3 (2.5%PVA) มีเซลล์
Fibroblasts

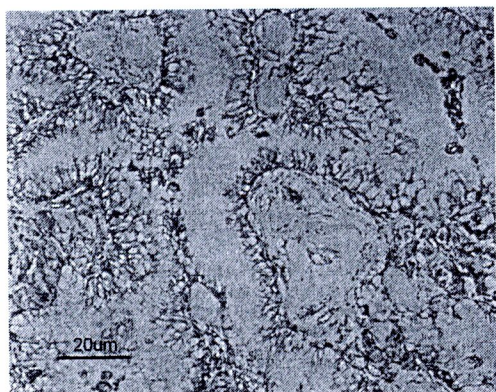


กำลังขยาย 10x

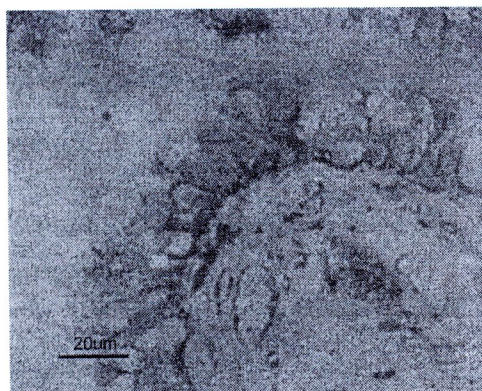


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 1.4 (5.0%PVA) มีเซลล์
Fibroblasts

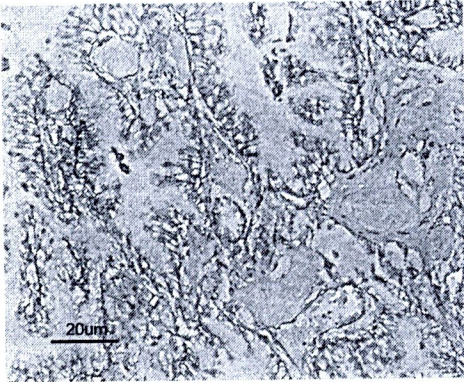


กำลังขยาย 10x

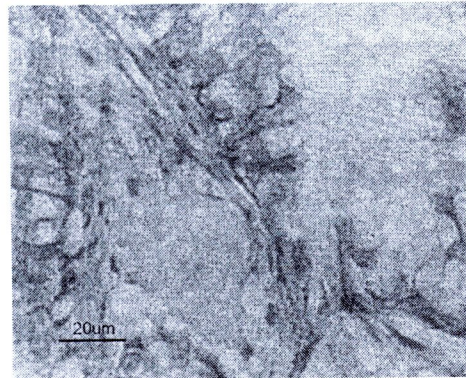


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 1.5 (10%PVA) มีเซลล์
Fibroblasts

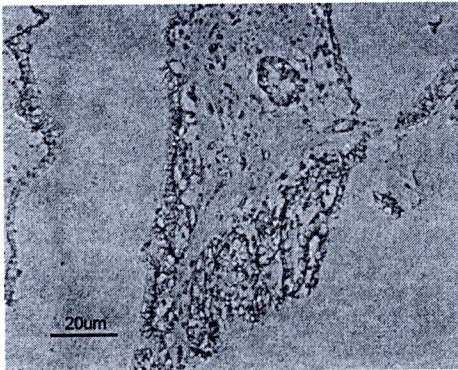


กำลังขยาย 10x

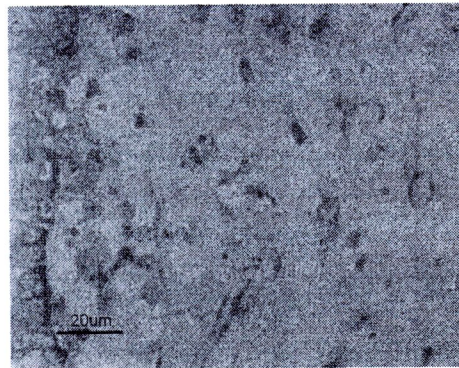


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 1.6 (0%PVA) มีเซลล์ Fibroblasts



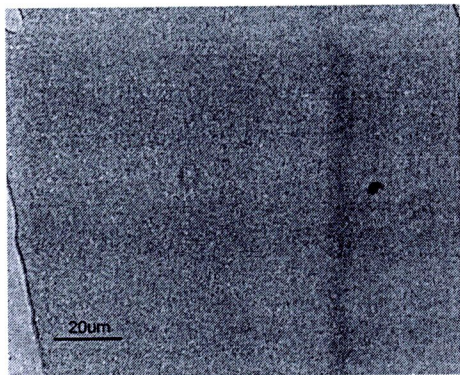
กำลังขยาย 10x



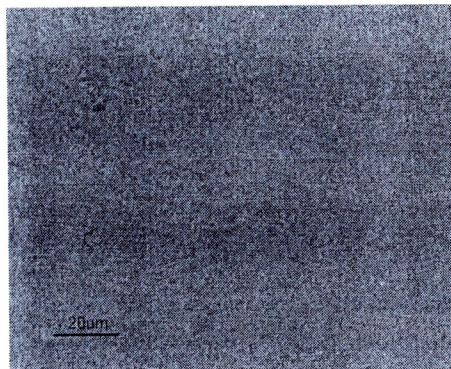
กำลังขยาย 40x



silk- Vimentin หมายเลข 2.1 (0.5%PVA) ไม่มีเซลล์
Fibroblasts

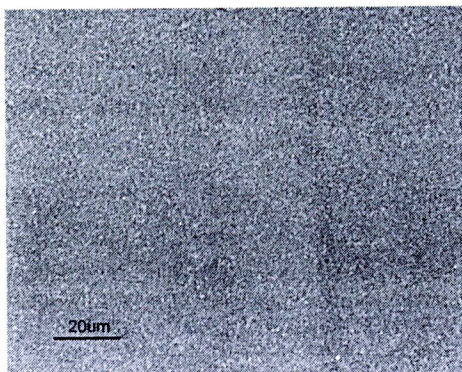


กำลังขยาย 10x

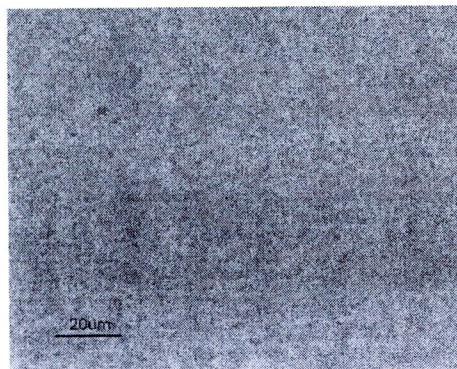


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 2.2 (1.0%PVA) ไม่มีเซลล์
Fibroblasts

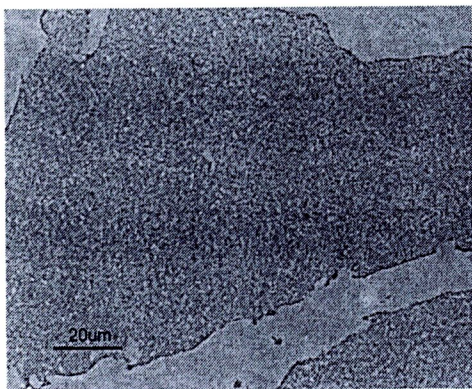


กำลังขยาย 10x

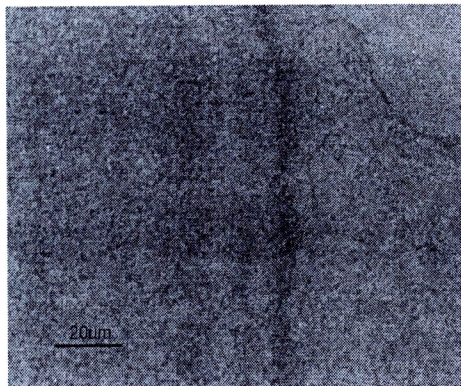


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 2.3 (2.5%PVA) ไม่มีเซลล์
Fibroblasts

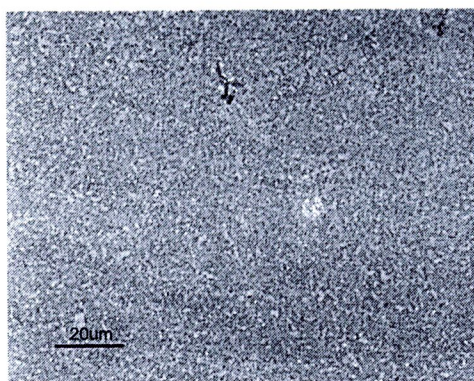


กำลังขยาย 10x

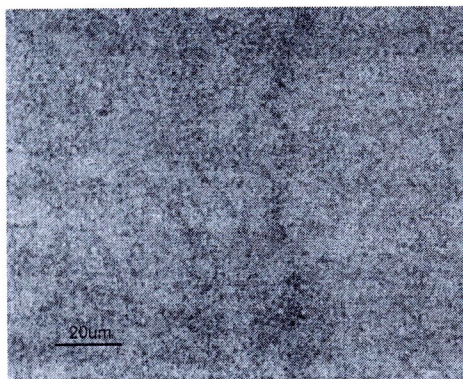


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 2.4 (5.0%PVA) ไม่มีเซลล์
Fibroblasts

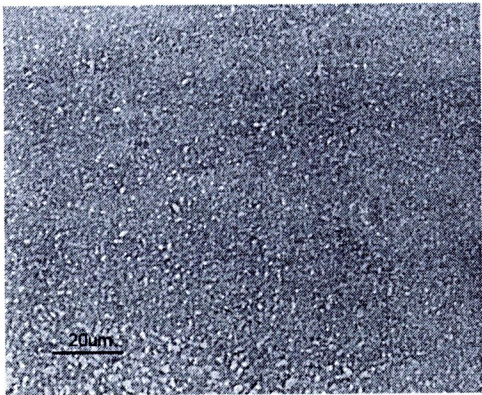


กำลังขยาย 10x

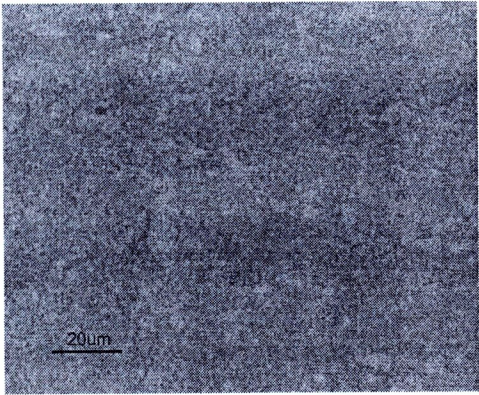


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 2.5 (10%PVA) ไม่มีเซลล์
Fibroblasts

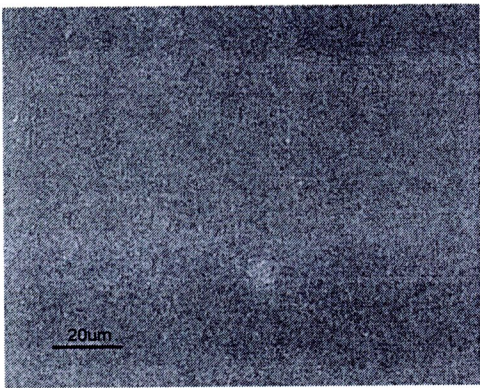


กำลังขยาย 10x

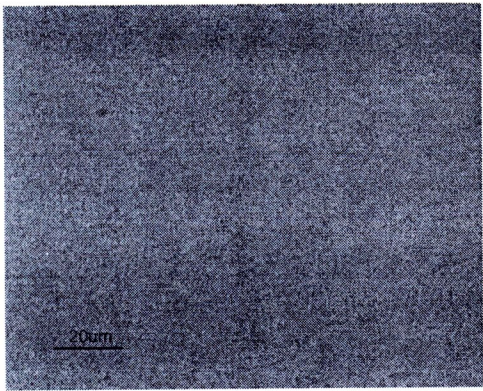


กำลังขยาย 40x

silk- Vimentin หมายเลข 2.6 (0%PVA) ไม่มีเซลล์ Fibroblasts



กำลังขยาย 10x



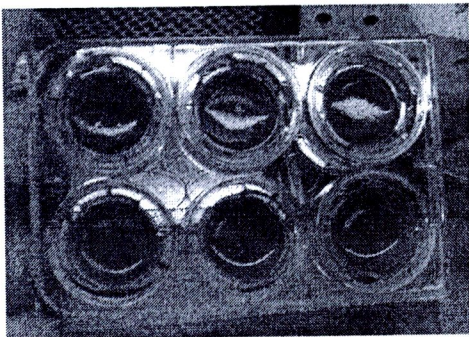
กำลังขยาย 40x

ตัวอย่าง silk scaffold ครั้งที่ 2

ทำเหมือนกับครั้งที่ 1 แต่พอเลี้ยงเซลล์ Fibroblasts ประมาณ 1 อาทิตย์ก็ให้ Seed เซลล์ Keratinocyte บน silk scaffold ใน Aluminium ring และเปลี่ยน Media จาก DMEM เป็น SFM เลี้ยงต่อไปอีก 1 อาทิตย์

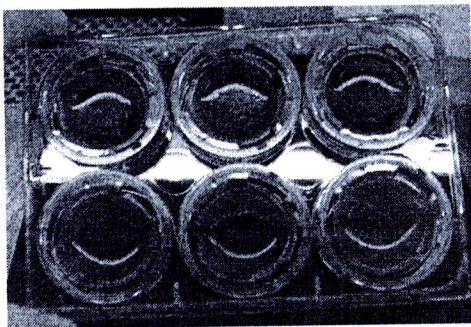
จากนั้นเปลี่ยน media เป็น SFM Hi calcium และ บน silk scaffold จะไม่มี media อยู่ เลี้ยงต่ออีก 1 อาทิตย์ ส่องทำ Hematoxylin and Eosin ของ Skin equivalent

รูปจากจากการทดลอง



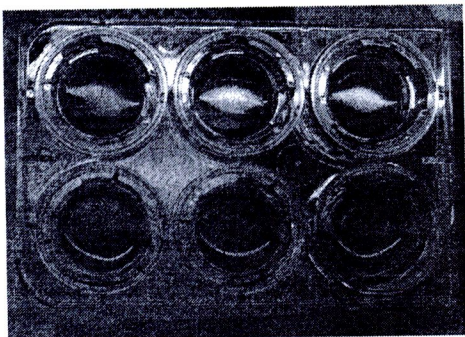
Day 7

Plate 1 มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 2 ml



Day 7

Plate 1 ไม่มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 2 ml

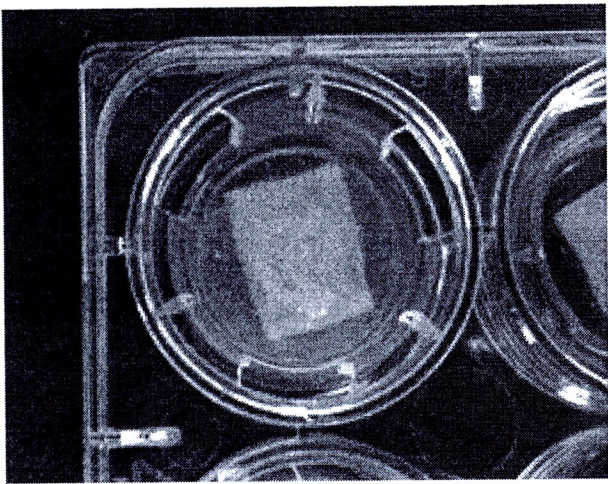


Day 7

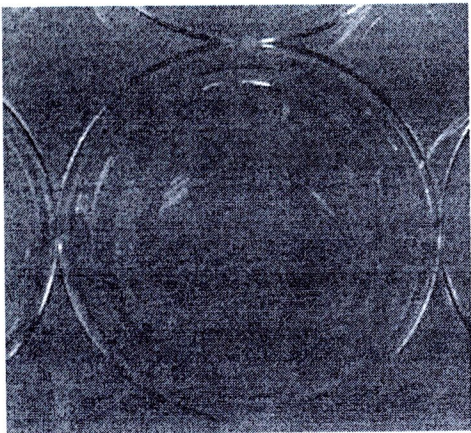
Plate 3 มีเซลล์ Fibroblasts ปริมาณ 1 ml

รูปจากการทดลอง Cast silk fibroin โดยวิธี Gamma-ray irradiation

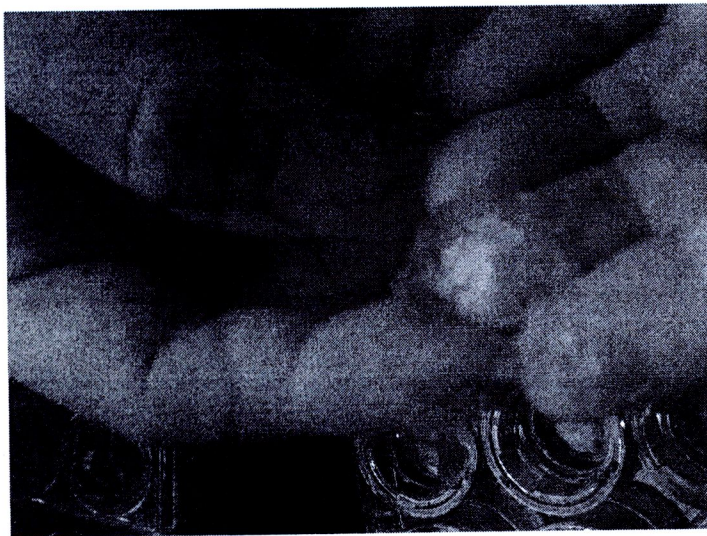
เนื่องจากลักษณะ semi-solid ที่เกิดจากการทดลอง cast silk เพื่อใช้เป็น dermal scaffold ในครั้งแรกโดยวิธีอบ สามารถทำให้ fibroblast cells ยึดเกาะได้ และ Toxicity test โดย MTT assay มีผล show ว่า silk ไม่เป็นพิษกับ cells แต่ก็มีลักษณะด้วยคือ เปราะ แตก และไม่สามารถทำให้มีพื้นผิวหน้าที่เรียบได้ ซึ่งไม่สามารถดำรงไว้ซึ่งคุณสมบัติหลักของ dermal part ดังรูปที่ show แต่อย่างไรก็ดี การทดลองดังกล่าวทำให้มีความหวังว่า silk มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สามารถนำมาใช้เป็น Biomaterial ได้



ต่อมา ทางคณะผู้วิจัยได้พยายามทำการทดลองโดยการเปลี่ยนวิธี cast silk fibroin เป็นวิธี Ultrasound induced protein linkage เพื่อให้ได้ silk scaffold ที่มีลักษณะเป็น gel และ cast เป็น semi-solid ได้ เพื่อให้ silk scaffold สามารถ integrate กับ cells ได้ และมีพื้นผิวหน้าที่เรียบเนียน ก่อนที่จะได้ทำการทดลองในชั้น epidermis ใน step ต่อไป พบว่าลักษณะ silk ที่ได้เป็น semi-solid gel อย่างที่คาดหวังไว้ตามรูป

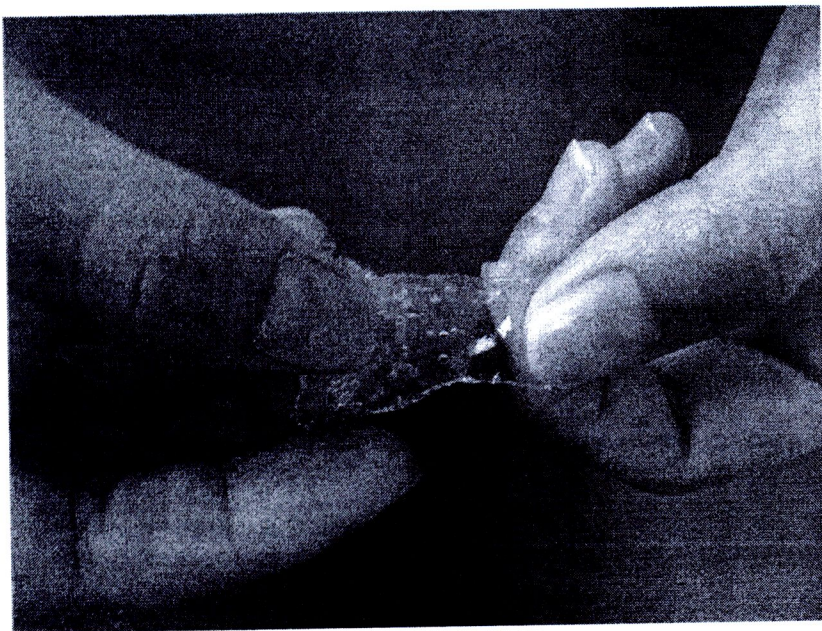
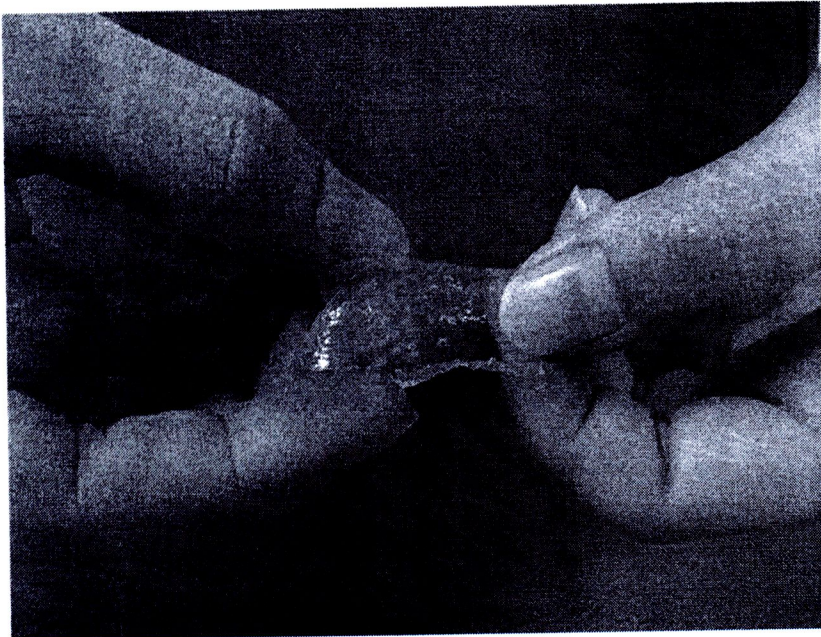


แต่ว่า gel ที่ได้ มีลักษณะยุ่ยเมื่อได้รับแรงจับ จึงทำให้ผู้วิจัยทดลองผสม PVA (PolyVinylAcetate) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีลักษณะเหนียว ยืดหยุ่น เพื่อเพิ่มคุณสมบัติ elasticity และลดความยุ่ยของ silk gel ลง โดยทดลองผสม PVA ความเข้มข้นต่างกัน มีและไม่มี fibroblast cells ตามตาราง เหตุผลคือ ยิ่งความเข้มข้นของ PVA มาก ความเหนียวยืดหยุ่นก็จะมีมาก ส่วน fibroblast cells สามารถทำให้ dermal scaffold หดรั้งตัวลดขนาดลงมาได้ ตามรูป



ผลการทดลองพบว่า Ultrasound silk fibroin+PVA dermal scaffold มาสามารถทำให้ fibroblast cells ยึดเกาะได้ และไม่มีคามยืดหยุ่นและเหนียวพอที่จะนำไปใช้เป็น dermal scaffold ได้

ทางคณะผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนวิธีการ Cross-linked protein linkage ของ silk fibroin เป็นการทดลองใช้ Gamma-ray irradiation ผลการทดสอบเบื้องต้น, ทำการทดลอง Gamma-ray irradiation ที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ ขอความร่วมมือผ่านการอนุเคราะห์ติดต่อประมาณงานโดยผศ.ดร.บวรลักษณ์ อุนคานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, พบว่า silk fibroin ซึ่ง Cast protein linkage โดยวิธี Gamma-ray irradiation มีความเหนียวและยืดหยุ่นได้ดีมากตามภาพ



สรุปงานวิจัยจนจบโครงการ

1. ทดสอบทำ Dermal scaffold โดยใช้ collagen type I ล้มเหลวเพราะ collagen type I ที่หาซื้อได้ในประเทศไทยผ่าน บริษัท Roche (ซึ่งเป็นตัวเดียวเท่านั้นที่หาซื้อได้ในประเทศ) ไม่สามารถ cast เป็น semi-solid gel ได้แบบ collagen type I จากบริษัท Nitta gelatin ประเทศญี่ปุ่นที่ผู้วิจัยหลักเคยใช้ทำการทดลองเมื่อครั้งยังทดลองอยู่ในประเทศญี่ปุ่น และเมื่อติดต่อขอซื้อก็ไม่สามารถซื้อจากบริษัท Nitta gelatin ได้ เพราะไม่มีตัวแทนในประเทศไทยและไม่สามารถนำเข้าได้เองผ่านกรมศุลกากร เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ทำ

บ

เหตุผลน่าจะเป็นลักษณะมาตรฐานของ laboratory ที่แตกต่างกัน ของ บริษัท Nitta gelatin และบริษัท Roche

2. ทางผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนมาใช้ Dermal scaffold โดยสารสกัดจาก silk fibroin โดยเพราะจากการ review literature พบว่าสามารถนำมาใช้ได้ ทางผู้วิจัยจึงได้ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นโดยทดสอบการยึดเกาะของเซลล์บนเส้นใยไหมโดยถ่ายภาพการยึดเกาะของเซลล์โดยกล้อง scanning electron microscope ทดสอบ cytotoxicity test โดย MTT assay และทดสอบ การสลายตัวของ silk fibroin โดยวิธี FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ทั้งหมดให้ผลเป็นบวกต่อการนำ silk fibroin มาใช้เป็น biological product สำหรับกรณีของเราคือเหมาะแก่การทำ dermal scaffold

ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองต่อเพื่อหาวิธีที่ดีที่สุดในการสกัดใช้ Silk fibroin โดย

2.1) การอบแห้ง – พบว่าสามารถ cast silk fibroin เป็นก้อนได้ตามต้องการ แต่ scaffold ที่ได้เปราะแตกง่าย และมีผิวหน้าไม่เรียบพอที่จะใช้ทำเป็น dermal scaffold

2.2) การ cast โดยการใช้ ultrasonic – พบว่าสามารถ cast silk fibroin เป็น semi solid ที่มีเนื้อเนียน และผิวหน้าเรียบได้ตามต้องการ แต่ silk scaffold ที่ได้เปื่อยและยุ่ยเกินกว่าที่จะนำมาพัฒนาต่อเป็น dermal scaffold ที่ต้องมีลักษณะเหนียวและยืดหยุ่นได้ดีกว่านี้

2.3) การ cast โดยการใช้ ultrasonic ผสมสาร PVA – พบว่าสามารถ cast silk fibroin เป็น semi solid ที่มีเนื้อเนียน และผิวหน้าเรียบได้ตามต้องการและ scaffold ที่ได้มีเนื้อใส, เหนียวและยืดหยุ่นมากขึ้น แต่ก็ยังเปื่อยอยู่

2.4) การ Cast protein linkage โดยวิธี Gamma-ray irradiation – จากการทดสอบเบื้องต้น silk scaffold มีลักษณะ ตามต้องการทุกประการ scaffold ที่ได้มีเนื้อใส, เหนียวและยืดหยุ่น สามารถพัฒนาไปเป็น dermal scaffold สำหรับผลิต wound dressing care หรือ skin tissue engineering (STE) ได้ และเนื่อง

จากการ crosslink โดยการฉายรังสี Gamma ใน silk เป็นกรรมวิธีใหม่ ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการยื่นขอจดสิทธิบัตรกับกรมทรัพย์สินทางปัญญา วันที่ 27 กันยายน 2553 เลขที่คำขอสิทธิบัตร 1001001477

Output จากโครงการวิจัย

1. การตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

De novo method of developing silk fibroin hydrogel aim for using as a dermal scaffold by Gamma irradiation. **Sanmano-Hanpanich B**, Oonkhanond B, Srimuninnimit V, Visuthikosol V, Sophon P. Int J App Biomed Eng. 2010 Jul-Dec issue. [Epub ahead of print]. (เอกสารแนบ)

2. ยื่นจดสิทธิบัตร

หัวข้อ “กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมโดยวิธีฉายรังสี”

ยื่นเมื่อ 27 กันยายน 2553 เลขที่คำขอ 1001001477 (เอกสารแนบ)

ภาคผนวก

De novo method of developing silk fibroin hydrogel aim for using as a dermal scaffold by Gamma irradiation.

Borisut Sanmano Hanpanich, MD., PhD.^{1*}, Bovornlak Oonkhanond, PhD.²,

Vichai Srimuninnimit, MD, FRCP³, Vivat Visuthikosol, MD., FRCP⁴, Prasert Sophon, PhD.

¹ Assistant Professor of Division of Molecular genetics & Molecular biology in medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

² Assistant Professor of Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineer, Mahidol University, Nakornprathom, Thailand

³ Associate Professor of Division of Plastic Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

⁴ Professor of Division of Plastic Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

* correspondent author

Asst. Prof. Borisut Sanmano HANPANICH, MD., PhD

Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, Thailand 12121

Tel: (662)9269757-9, Fax: (662)9269755

Email: sborisut@yahoo.com

Keywords : tissue engineering, skin substitute, silk fibroin, biocompatibility

Abstract

Tissue engineering of skin is a rapidly developing field in biomedical engineering research. One of the challenges in skin tissue engineering (STE) is molding engineered skin tissue to create a dermal scaffold that could be used in wound care or skin grafting. We developed a novel method for cross-linking a silk fibroin solution by gamma irradiation to form a hydrogel that might serve as a dermal scaffold. The silk fibroin hydrogel was not cytotoxic to human fibroblasts or human keratinocytes, which are analyzed by cytotoxicity and direct contact tests. The mechanical properties of the silk fibroin hydrogel formed by gamma irradiation method were improved mechanical properties to those of a silk fibroin hydrogen created using a freeze-drying method. The silk fibroin hydrogel created using this novel method has potential use as a dermal scaffold in STE.

Introduction

Biomedical engineering is multidisciplinary field that combines medicine, engineering, and biology in the application of natural or synthetic materials to enhance cellular, tissue or organ functions. The field is dynamic and growing, and reports frequently describe new clinical applications arising from tissue-engineering technology, such as gingival autografts in treatment of gingival recession [1-5] and semitendinosus-gracilis grafts in anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction [6-7]. One of the earliest and most successful applications of tissue-engineering technology has been the development of skin substitutes for treatment of severe burn patients (8-11); however, many challenges remain.

Native skin tissue is composed of an epidermal layer that lies atop the dermis, with keratinocytes comprising most of the cells in the epidermal layer. Commercially available

skin substitutes reconstruct the two-layer skin model, using allogenic human keratinocytes and fibroblasts embedded in a dermal scaffold, which in many cases is made of animal-source collagen fiber [12]. Table 1 summarizes the components, clinical uses, advantages, and disadvantages of the various commercial skin substitutes that are currently available. In most commercial skin substitutes, allogenic human cells or animal-source materials are used, leading to a risk of delayed-phase graft rejection. To circumvent this problem, keratinocytes and fibroblasts can be cultivated from the patient's own skin; autologous cells in skin substitutes have been shown to be more effective in wound healing than allogenic cells.

The ideal material for a dermal scaffold would be biocompatible in both physical and biological properties; for example, the ideal material should not provoke an immunological reaction. Both natural proteins, such as animal collagen fiber, and synthetic polymers, such as Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), have been tested as components of engineered dermal scaffolds. Silk fibroin is a structural protein in cocoons produced by silkworms (*Bombyx mori*) that has been tested as a biomaterial in various tissue-engineering applications, including construction of a silk fibroin scaffold to use as a graft in myringoplasty surgery (13). Although silk fibroin has biocompatible properties, molding silk fibroin to form an acceptable dermal scaffold is challenging because it is a natural product that can be degraded.

Here we report a novel method to create a dermal scaffold by cross-linking silk fibroin with Gamma irradiation to produce a hydrogel.

Materials and Methods

1. Culture of human dermal fibroblasts and keratinocytes

Primary human dermal fibroblasts and primary human keratinocytes were isolated from fresh adult human skin specimens in elective caesarean sections at the Thammsat

Chalermprakit University Hospital. Fibroblasts and keratinocytes were extracted and cultured as previously described [14-15]. Briefly, skin specimens measuring approximately 5 x 1 cm² were washed with phosphate buffered saline (PBS) containing 1% (v/v) penicillin and streptomycin, minced into small pieces, and incubated at 4 °C overnight in wash solution containing 15 U/ml dispase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The following morning, forceps were used to separate the dermal and epidermal layers. The dermal tissue was treated with 80 U/ml collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 37 °C for 1 h to harvest the fibroblasts. Epidermal tissue was subjected to further trypsinization with 0.025% trypsin with 0.38 gm/L with EDTA (Gibco Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 1 h to harvest the keratinocytes.

The harvested dermal fibroblasts were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin in a humidified incubator containing 5% CO₂ in air at 37 °C. The harvested epidermal keratinocytes were maintained in Serum Free Medium (SFM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin in a humidified incubator containing 5% CO₂ in air at 37°C. Second to third passages of fibroblasts and keratinocytes were used in our experiments.

2. Cytotoxicity of incubated silk media solution

Primary fibroblast or keratinocyte cells were plated in 96-well culture plates at an initial density of 1×10^6 cells/ml in DMEM containing 10% FCS (fibroblast culture medium) or in SFM (keratinocyte culture medium), respectively, and incubated in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. Testing solution was prepared by incubation of

sterile 60 gm silk fibroin sponge in 5 ml culture medium for 72 hours. Fibroblasts and keratinocytes were each cultured in testing solution for 48 hours before cell viability assays. As controls, fibroblasts and keratinocytes were incubated in the appropriate culture medium without addition of the testing solution.

For the cell viability assay, culture medium was removed from each well and replaced with 100 μ l of the appropriate culture medium containing 10 μ l MTT (tetrazolium salt 3-[4,5-dimethyl- thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Culture plates were covered with aluminum foil, and cells were incubated in the dark for 2 hours. The MTT solution was then removed and 100 μ l isopropyl alcohol was added to each well. The absorbance at 570 nm was measured using a spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA). Experiments were performed in triplicate.

3. Direct contact test

The morphology of fibroblast attachment on silk fibroin fiber was observed by scanning electron microscopy (SEM) using a XL30 & EDAX (Philips). To test the efficacy of the fibers as a dermal matrix, fibroblasts were incubated with the silk fibers for 48 hours or for 14 days. After incubation the fibers were deposited onto a coverslip and dried for 2 hours at room temperature. The fibers were gilded and then observed in the thermal field of the electron microscope.

For SEM studies, the attached cells on the silk fiber were rinsed twice in PBS, fixed in a 250-mL solution of 2.5% glutaraldehyde in PBS for 30–60 minutes, and rinsed twice in PBS. Dehydration was performed by slow water replacement by 15-minute incubations in a series of ethanol solutions (30%, 50%, 70%, and 95%). The final dehydration step was performed by incubation in absolute ethanol for 30 minutes. Samples were dried under

vacuum at room temperature. The silk fiber were mounted on stubs and coated in vacuum with gold. Cells were examined with a SEM. [16-17]

4. Scaffold material and molding method

Cocoons from the native Thai silkworm *Bombyx mori* var. Nangnoi Sisaket-1 (kindly provided by The Queen Sirikit Department of Sericulture, Thailand) were degummed to remove the glue-like coating of sericin on the fibroin fibers, using the method described by Meesilpa et al. [18]

Silk fibroin solution was prepared as previously described by Kojthung et al. (2008) [19]. Briefly, the extracted silk fibroins (degummed cocoons) were dissolved in $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: H_2O in a molar ratio of 1: 2: 8 at 80°C . This solution was dialyzed against distilled water using cellulose tubular membranes with a MWCO range of 12,000–14,000 (CelluSep T4; Uptima Interchim, Montluçon, France) for 2 days to remove salts. The final concentration of silk fibroin aqueous solution was 2.5% (w/v).

Silk gelation was accomplished by crosslinking between silk fibroin and PVA contents by irradiation with 40 and 60 kGy using a Gammacell 220 Excel irradiator (MDS Nordian, Toronto, Canada) kindly provided by the Thailand Institute of Nuclear Technology. The ratio of silk fibroin to PVA was 1:0.1 (i.e., 10% PVA). Sodium chloride (75-150 μm) as porogens were added into the silk fibroin-PVA solution by varying in the ratios of 1:0.03 (3% NaCl), 1:0.05 (5% NaCl), 1:0.07 (7% NaCl), and no porogens. Mechanical properties were tested by pulling the fibers with bare hands.

Results

Cytotoxicity tests

The MTT assay showed that 48-hour incubation in silk media solutions had no toxic effects on human fibroblasts or human keratinocytes. Assay results are presented in Figure 1 (Figure 1: Cytotoxicity test by MTT assay of silk fibroin fiber on fibroblasts survival).

Direct contact test

The direct contact test showed formation of fibroblast colonies on silk fibroin at 48 hours. After a 14-day incubation in the presence of silk fibroin fibers, the fibroblasts had migrated and covered the entire silk fiber area. (Figure2: Direct contact test of fibroblasts on silk fiber observing by SEM at 48 hours and 14 days after incubation).

Cross-linking by gamma ray irradiation

To improve the chemical and physical properties of the silk dermal scaffold, we added PVA and cross-linked the fibers by gamma irradiation. Tensile strength of the resulting silk hydrogel was assessed by stretching the fibers with bare hands. The hydrogel showed significant improvement in mechanical properties, compared to silk dermal scaffolds created without gamma irradiation and cross-linking. [Figure4: Mechanical stretching of gamma ray cross-link silk hydrogel].

Discussion

The traditional method of drying silk fibroin without cross-linking produces a sponge that is brittle and fragile. In earlier studies we attempted to create a sponge by freeze-drying silk fibroin fiber, but freeze-drying resulted in a scaffold that did not interact with fibroblasts as effectively as native dermal tissue nor produce a smooth surface for attachment of



keratinocytes (Figure 3: Histology of silk fiber culture with fibroblasts and seeding on top with keratinocyte).

We tried to improve mechanical properties by adding PVA and creating as a hydrogel form instead of sponge form. Hydrogels are hydrophilic polymeric networks that are capable of absorbing and retaining large amounts of water; consequently, they are used as surgical sealants in wound dressings and as STE dermal scaffolds [20]. As wound dressings hydrogels have a improved rate of epithelization and dermal regeneration compared to other components [19, 21].

Several methods can be used for cross-linking proteins in the creation of hydrogels [22]. We describe a novel method for cross-linking a silk fibroin solution that improves both the mechanical and chemical properties of the resulting product [23-24]. Addition of PVA to the silk fibroin solution and subsequent gamma irradiation of the solution caused the silk fibroin solution to be cast as a hydrogel with improved mechanical properties. In future studies we hope to use both in vitro and in vivo models to characterize histological, immunological, and ultrastructural features of our silk fibroin hydrogel as a dermal scaffold for dermal wound care or skin grafting.

Acknowledgments

We thank Suvoraporn Saelim for excellent technical assistance, Dr. Yuthadej Thaweekul for surgical skin specimens. Our work has been supported by grant number MRG4980045 from the Thailand Research Fund (TRF) and Thammasat University (TU) for Assist.Prof.Dr. Borisut Sanmano Hanpanich as a recipient.

References

- [1] A two-stage approach using an autogenous masticatory mucosal graft and an autogenous connective tissue graft to treat gingival recession: a case report. Park JB. J Int Acad Periodontol. 2010 Apr;12(2):45-8.
- [2] Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession: a proof-of-concept study. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, Deshmukh VL, Wani MR, Miller PD Jr. J Periodontol. 2010 Apr;81(4):616-25.
- [3] A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Wada I, Nakamura T, Omori K. Biomaterials. 2010 Jun;31(18):4855-63. Epub 2010 Mar 26.
- [4] Acellular dermal matrix in soft tissue reconstruction prior to bone grafting. A case report. Ruiz-Magaz V, Hernández-Alfaro F, Díaz-Carandell A, Biosca-Gómez-de-Tejada MJ. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010 Jan 1;15(1):e61-4
- [5] Comparison of autologous full-thickness gingiva and skin substitutes for wound healing. Vriens AP, Waaijman T, van den Hoogenband HM, de Boer EM, Scheper RJ, Gibbs S. Cell Transplant. 2008;17(10-11):1199-209
- [6] Magnetic Resonance Imaging Evaluation of the Integration and Maturation of Semitendinosus-Gracilis Graft in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Autologous Platelet Concentrate. Figueroa D, Melean P, Calvo R, Vaisman A, Zilleruelo N, Figueroa F, Villalón I. Arthroscopy. 2010 Aug 26. [Epub ahead of print]
- [7] Cost analysis of outpatient anterior cruciate ligament reconstruction: autograft versus allograft. Nagda SH, Altobelli GG, Bowdry KA, Brewster CE, Lombardo SJ. Clin Orthop

Relat Res. 2010 May;468(5):1418-22. Epub 2009 Dec 18.

[8] Cutaneous burns treated with hydrogel (Burnshield) and a semipermeable adhesive film.

Osti E. Arch Surg. 2006 Jan;141(1):39-42.

[9] Update on tissue-engineered biological dressings. Ehrenreich M, Ruszczak Z. Tissue Eng. 2006 Sep;12(9):2407-24. Review.

[10] Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. Macri L, Clark RA. Skin Pharmacol Physiol. 2009;22(2):83-93. Epub 2009 Feb 4. Review.

[11] Insights into acinetobacter war-wound infections, biofilms, and control. Dallo SF, Weitao T. Adv Skin Wound Care. 2010 Apr;23(4):169-74. Review.

[12] Update on tissue-engineered biological dressings. Ehrenreich M, Ruszczak Z. Tissue Eng. 2006 Sep;12(9):2407-24. Review

[13] Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. Levin B, Rajkhowa R, Redmond SL, Atlas MD. Expert Rev Med Devices. 2009 Nov;6(6):653-64. Review.

[14] Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. Sanmano B, Mizoguchi M, Suga Y, Ikeda S, Ogawa H. J Dermatol Sci. 2005 Jan;37(1):29-39. Epub 2004 Nov 30.

[15] Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. Mizoguchi M, Suga Y, Sanmano B, Ikeda S, Ogawa H. J Dermatol Sci. 2004 Sep;35(3):199-206.

[16] Chemical synthesis, characterization, and biocompatibility study of hydroxyapatite/chitosan phosphate nanocomposite for bone tissue engineering applications. Pramanik N,

Mishra D, Banerjee I, Maiti TK, Bhargava P, Pramanik P. Int J Biomater. 2009;2009:512417.

Epub 2009 Jan 25.

[17] In vitro osteoclastogenesis on textile chitosan scaffold. Heinemann C, Heinemann S,

Bernhardt A, Lode A, Worch H, Hanke T. Eur Cell Mater. 2010 Feb 26;19:96-106

[18] Meesilpa P, Nuipirom W, Nakprasert D, Sungsonthiporn S, Ravinu B, Sudatis B.

Methodology to Produce Silk Fibroin Powder. The Sericulture Research Institute, Annual Research Reports, 2002; 165-172.

[19] Kojthung A, Meesilpa P, Sudatis B, Treeratanapiboon L, Udomsangpetch R,

Oonkhanond B. Effects of gamma radiation on biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin.

International Biodeterioration & Biodegradation, 2008; 62; 487-490.

[20] Occlusive dressings and the healing of standardized abrasions. Beam JW. J Athl Train.

2008 Oct-Dec;43(6):600-7.

[21] Soft tissue augmentation using silk gels: an in vitro and in vivo study. Etienne O,

Schneider A, Kluge JA, Bellemin-Lapponnaz C, Polidori C, Leisk GG, Kaplan DL, Garlick

JA, Egles C. J Periodontol. 2009 Nov;80(11):1852-8.

[22] Cutaneous burns treated with hydrogel (Burnshield) and a semipermeable adhesive film.

Osti E. Arch Surg. 2006 Jan;141(1):39-42

[23] Hydrogels cross-linked by native chemical ligation. Hu BH, Su J, Messersmith PB.

Biomacromolecules. 2009 Aug 10;10(8):2194-200.

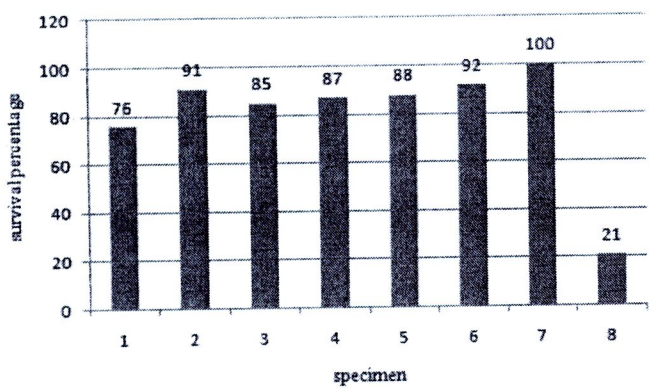
[24] Templating hydrogels. Texter J. Colloid Polym Sci. 2009 Mar;287(3):313-321. Epub

2009 Jan 20

Table, picture

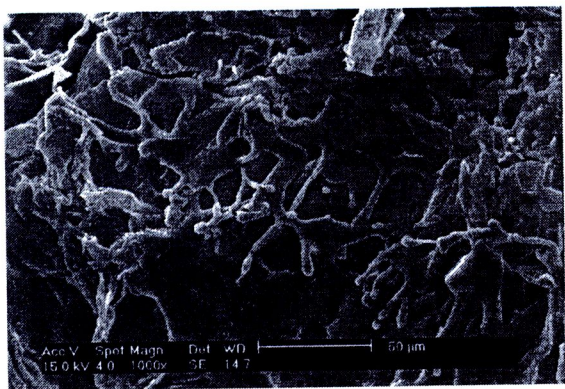
(Attached file: Table 1)

Figure 1: Cytotoxicity test by MTT assay of silk fibroin fiber on fibroblasts survival



Specimen number 1-8 are silk fibroin fiber varying degumming time. 1: degum for 0 minute, 2: degum for 20 minutes, 3: degum for 40 minutes, 4: degum for 60 minutes, 5: degum for 80 minutes, 6: degum for 100 minutes, 7: positive control, 8: negative control

Figure2: Direct contact test of fibroblasts on silk fiber observing by SEM at 48 hours and 14 days after incubation



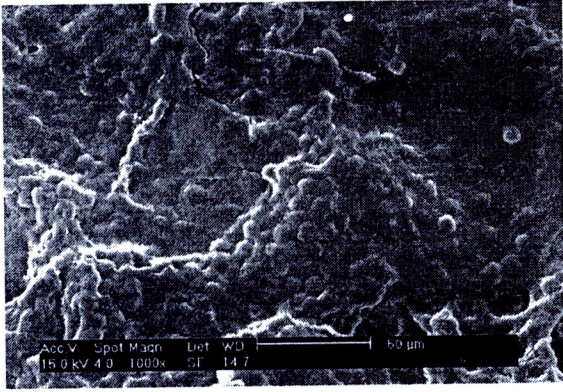


Figure3: Histology of silk fiber culture with fibroblasts and seeding on top with keratinocyte

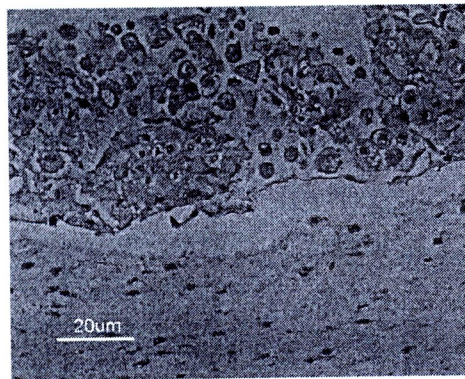


Figure4: Mechanical stretching of Gamma ray cross-link silk hydrogel

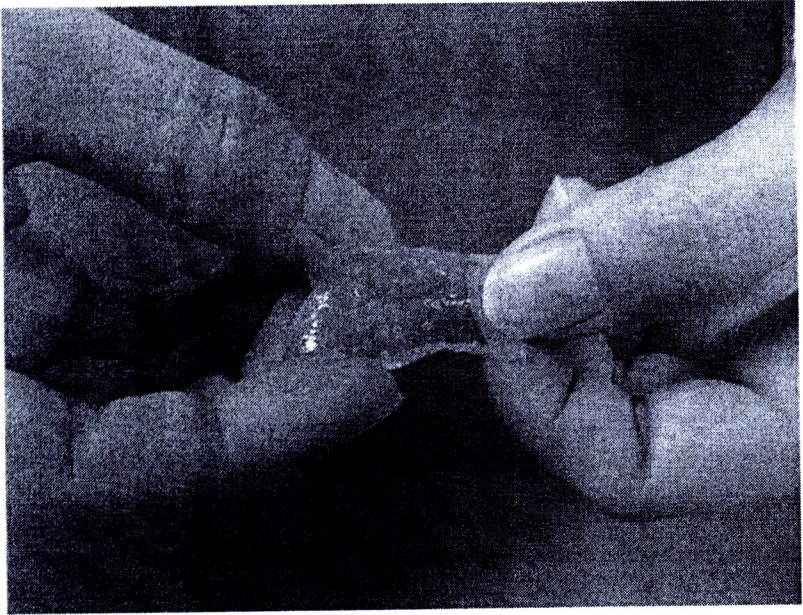


Table 1: Commercial Skin Substitutes

Product name (Company)	Epidermal Component	Dermal Component	Advantages	Disadvantages
Epicel (Genzyme)	Cultured epidermal autograft	None	No rejection; large area	3 week delay and fragile
Alloderm Corp)	None	Processed cadaver Allograft	Reduced antigenicity good for burns	Rejection and possible for biological contamination
Dermagraft (Advanced Biohealing Inc.)	None	Allogeneic neonatal fibroblasts on 3D scaffold	Rapid proliferation of fibroblasts	Rejection and possible for biological contamination
Integra (Johnson & Johnson)	Synthetic polymer	Bovine type I collagen and glycosaminoglycans	Allogenic fibroblast ingrowth and autologous epidermis	Rejection and possible for biological contamination
Transcytet (Advanced Biohealing Inc.)	Thin silicone layer	Neonatal allogeneic fibroblasts on nylon mesh	Dermal fibroblasts secrete collagen, glycosaminoglycans & growth factors	Rejection and possible for biological contamination nylon mesh is non-biodegradable
Apligraf (Organogenesis)	Human allogeneic neonatal keratinocytes	Human allogeneic neonatal fibroblasts in bovine collagen autograft	Graft take comparable to	Rejection and possible for biological contamination and repeated applications

เจ้าเนา



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☒ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
 ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร
 พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่2)
 พ.ศ.2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่3) พ.ศ.2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 27 ต.ค. 2553

วันยื่นคำขอ

เลขที่คำขอ

1001001477

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์

ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1.ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดไขใหม่โดยวิธีฉายรังสี

2.คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่

ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

99 หมู่ 18 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง

จังหวัดปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์ 02-5644440 ต่อ 1665

3.3 โทรสาร 02-5642887

3.4 อีเมล benjamas_tubi@hotmail.com

4.สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ☒ ผู้รับโอน☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5.ตัวแทน (ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)

5.1 ตัวแทนเลขที่

5.2 โทรศัพท์

5.3 โทรสาร

5.4 อีเมล

6.ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

ผศ.พญ.ดร.บริสุทธิ แสนมโน หาญพานิช ภาควิชาสถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผศ.ดร.บวรลักษณ์ อุนคานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

99 หมู่ 18 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

7.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่

วันยื่น

เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่วางระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด
 เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8.การยื่นคำขออนุญาตราชอาณาจักร

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9.การแสดงผลการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงผลการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10.การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
------------------------	--------------------	---------------------------

11.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันที่ยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
นี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่น ๆ

12.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุ
สิทธิบัตรนี้หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ.
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา

13.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย

ก.แบบพิมพ์คำขอ	3	หน้า
ข.รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์	4	หน้า
ค.ข้อถ้อยสิทธิ	2	หน้า
ง.รูปเขียน 2 รูป	1	หน้า
จ.ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์		
☐ รูปเขียน รูป		หน้า
☐ ภาพถ่าย รูป		หน้า
ฉ.บทสรุปการประดิษฐ์	1	หน้า

14.เอกสารประกอบด้วย

- ☐ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงผลการประดิษฐ์/การออกแบบ
ผลิตภัณฑ์
☐ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่น
คำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☐ เอกสารอื่น ๆ

15.ข้าพเจ้าขอรับรองว่า

- ☒ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....

16.ลายมือชื่อ (☒ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร; ☐ ตัวแทน)

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพล นิธิไกรทอง)

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สวัสดิ์ ดันตระกูลรัตน์)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่
เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ข้อ 3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร

- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ที่อยู่ ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400



หนังสือสัญญาโอนสิทธิขอรับสิทธิบัตร

ทำที่ หน่วยบ่มเพาะวิสาหกิจ
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

วันที่ 20 กันยายน พ.ศ. 2553

สัญญาระหว่าง ผู้โอน คือ ผศ.พญ.ดร.บริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช ที่อยู่ ภาควิชา
สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ร่วมกับ
ผศ.ดร.บวรลักษณ์ อุณานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
และผู้รับโอน คือ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โดย ศาสตราจารย์ ดร.สุรพล นิติไกรพจน์ ตำแหน่ง
อธิการบดี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดย ศาสตราจารย์ ดร.สวัสดิ์ ตันตระรัตน์
ตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

โดยสัญญานี้ ผู้โอนซึ่งเป็นผู้ประดิษฐ์ “กรรมวิธีการเตรียมโครงสร้างสำหรับเนื้อเยื่อจาก
สารสกัดไขไก่โดยวิธีฉายรังสี” ขอโอนสิทธิในการประดิษฐ์ดังกล่าว ซึ่งรวมถึงสิทธิขอรับ
สิทธิบัตรและสิทธิอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ให้แก่ผู้รับโอนแต่เพียงผู้เดียว และให้ผู้โอนมีสิทธิและหน้าที่
ตามระเบียบมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เกี่ยวกับงานด้านทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัย
ซึ่งมหาวิทยาลัยจะออกระเบียบดังกล่าวนี้ต่อไป

เพื่อเป็นพยานหลักฐานในการนี้ ผู้โอนและผู้รับโอนได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญต่อหน้า
พยาน

ลงชื่อ.....ผู้โอน ลงชื่อ.....ผู้โอน
(ผศ.พญ.ดร.บริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช) (ผศ.ดร.บวรลักษณ์ อุณานนท์)

ลงชื่อ.....ผู้รับโอน ลงชื่อ.....ผู้รับโอน
(ศาสตราจารย์ ดร.สุรพล นิติไกรพจน์) (ศาสตราจารย์ ดร.สวัสดิ์ ตันตระรัตน์)

ลงชื่อ.....พยาน ลงชื่อ.....พยาน
(รองศาสตราจารย์ สมชาย วิริยะบุษกร) (นางสาวอรอุมา สัมไทย)

รายละเอียดของการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมโดยวิธีฉายรังสี

1. ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมโดยวิธีฉายรังสี ตามการประดิษฐ์นี้ เป็นการนำสารสกัดจากใยไหมที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ มาสกัดเอาส่วนของเซอริซิน (sericin) ออก จากนั้นผสมกับสารก่อรูปเจลและสารเพิ่มความพรุน ทำให้โครงร่างดังกล่าวอยู่ในรูปของเจล (Hydrogel) โดยวิธีฉายรังสี จะได้โครงร่างที่มีลักษณะเป็นเจลใส

การประดิษฐ์นี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมเป็นโครงร่างเนื้อเยื่อในส่วนของผิวหนังชั้นหนังแท้ (Artificial dermal scaffold) สำหรับใช้เป็นโครงร่างให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ยึดเกาะ ซึ่งปกติเซลล์นี้จะลอยตัวกระจายอยู่ในของเหลว (dermal matrix) ทำให้เกิดการสร้างเซลล์ผิวใหม่ โครงร่างนี้เป็นโครงร่างที่สร้างจากสารธรรมชาติ จึงไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ และเป็นโครงสร้างที่มีความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับผิวหนังธรรมชาติ สามารถพัฒนาต่อยอดไปเป็นผิวหนังเทียม (Tissue engineering skin) หรือแผ่นปิดทำแผล (Wound dressing) ได้

2. สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้อยู่ในสาขาเคมีและการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมโดยวิธีฉายรังสี

3. ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการทดลองวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์ผิวหนังด้วยวิธีการต่างๆ หลายวิธี ได้แก่ การเลี้ยงเซลล์ผิวหนังในถาดทดลอง (monocultured layer skin cells : keratinocytes, fibroblasts), การใช้ผิวหนังจริงมาสังเคราะห์เอาเซลล์ออก (DED [de-epidermis dermis]), การใช้เส้นใยสกัดจากสัตว์ (animal source collagen constructed dermal scaffold) , การเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์บนเส้นใยโครงร่าง (allogenic human engineered skin) เพื่อเพิ่มความคงทนของผิวสังเคราะห์, การผลิตผิวสังเคราะห์เพื่อการทดสอบยา (HSE for drug testing model) และการผลิตผิวสังเคราะห์เพื่อการปลูกถ่ายหรือรักษาแผล (HSE for grafting, wound dressing) เพื่อใช้เป็นกรณีศึกษาในการวิเคราะห์ วินิจฉัย และบำบัดโรคที่เกิดขึ้นกับผิวหนัง

การสร้างผิวหนังสังเคราะห์ (Reconstructed skin tissue) ประกอบด้วยโครงสร้างชั้นหนัง
 กำพำ (Epidermis) และชั้นหนังแท้ (Dermis) โดยโครงสร้างของชั้นหนังกำพำจะประกอบด้วย
 เซลล์ keratinocyte ทับซ้อนกันอยู่ เป็นเซลล์ผิวหนังด้านนอก ทำหน้าที่ปกป้องไม่ให้สิ่งสกปรกเข้าสู่
 ร่างกาย ส่วนโครงสร้างของชั้นหนังแท้ประกอบด้วยเซลล์ fibroblast ผังตัวอยู่ระหว่างโครงสร้าง
 ผิว (dermal scaffold) ธรรมชาติ เช่น คอลลาเจนและอีลาสติน แต่สำหรับผิวหนังเทียมโครงสร้างผิว
 (dermal scaffold) จะเป็นวัสดุที่มาจากธรรมชาติ (nature product) หรือสังเคราะห์ (synthetic) ขึ้น
 หรือเป็นสารผสม (combined) ก็ได้ เช่น silk fibroin ทำหน้าที่ให้ความยืดหยุ่นแก่ผิว แต่ยังไม่พบ
 รายงานการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมโดยการฉายรังสี ซึ่งโครงร่างดังกล่าว
 เป็นโครงร่างที่ถูกสังเคราะห์ (Artificial dermal scaffold) ขึ้นมา เพื่อให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์
 (fibroblast) มายึดเกาะ แทนคอลลาเจนหรือเส้นใยอีลาสติน (elastin fiber) ที่พบอยู่ในชั้นหนังแท้
 ของผิวหนังธรรมชาติ

4. การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

สำหรับกรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมด้วยวิธีฉายรังสี ตาม
 การประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

1. การคัดเลือกใยไหม (Selection)

การคัดเลือกใยไหมสำหรับการประดิษฐ์นี้ จะเลือกใช้ใยไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรี
 สะเกษ-1 (Native Thai silkworm cocoons, Bombyx mori var. Nangnoi Sisaket-1) ซึ่งเป็น
 สายพันธุ์ที่ได้รับการสนับสนุนจากกรมหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
 พระบรมราชินีนาถ โดยคัดเลือกใยไหมจากรังไหมที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ มีลักษณะ
 หัวป้านท้ายแหลม มีสีเหลืองเข้ม น้ำหนักรังไหมสดต่อรังโดยเฉลี่ยประมาณ 1 กรัม
 และน้ำหนักเปลือกรังไหมสดโดยเฉลี่ยประมาณ 13 เซนติกรัม จากนั้นนำใยไหมที่ได้ไปตัดเป็นชิ้น
 เล็กๆ ให้มีขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร เพื่อเพิ่มพื้นที่ให้ใยไหมได้สัมผัสกับสารละลายและเพิ่ม
 ประสิทธิภาพในการลอกกาวยไหมเซอร์ซินออก

2. การลอกกาวยไหม (Degumming)

นำใยไหมที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มาทำการลอกกาวยไหมเพื่อกำจัดสารเซอร์ซิน (sericin)
 ออก โดยนำใยไหมมาต้มกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่ความเข้มข้น 0.5%
 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนโดยมวล 1 : 50 ที่อุณหภูมิประมาณ 80-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
 45 นาที จากนั้นนำมารองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง เพื่อชะล้างสารเซอร์ซินและโซเดียม
 คาร์บอเนตออกจากใยไหม จะได้ใยไหมที่มีลักษณะเป็นเส้นใย ซึ่งเรียกว่า ใยไหมไฟโบรอิน

(Fibroin fiber) จากนั้นนำใยไหมไฟโบรอินไปทำให้แห้ง โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะได้เส้นใยไหมไฟโบรอินที่มีลักษณะแห้ง พร้อมทั้งจะนำไปใช้สำหรับเตรียมเยื่อโครงร่างต่อไป

3. การเตรียมสารละลายไหมไฟโบรอิน (Preparation of fibroin solution)

นำใยไหมไฟโบรอิน มาใส่ลงไปในตัวทำละลายที่เป็นสารละลายผสมของแคลเซียมคลอไรด์ไฮโดรต เอทานอล (ความเข้มข้น 90-95 %) และน้ำ ในอัตราส่วนโดยมวล 1 : 2 : 8 ตามลำดับ แล้ววางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาใส่ในถุงเซลลูโลส เพื่อแยกเอาเกลือออกจากสารละลาย โดยอาศัยหลักการแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่าน (dialysis) โดยตั้งทิ้งไว้ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 2 วัน จะได้สารละลายไหมไฟโบรอิน (Fibroin solution) เข้มข้น ที่มีลักษณะใส มีความเข้มข้น 2.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

4. การทำโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อ

นำสารละลายไหมไฟโบรอิน (Fibroin solution) เข้มข้น มาเตรียมให้อยู่ในรูปเจล โดยนำมาผสมกับสารก่อรูปเจลและสารเพิ่มความพรุนของเจล ตามสัดส่วนที่ระบุไว้ โดยการเติมสารเพิ่มความพรุนลงไปในเจล จะทำให้เจลมีขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วง 50-250 ไมครอน ซึ่งการขึ้นรูปเจลนั้นจะมีการเชื่อมต่อกัน (cross-link) ให้อยู่ในรูปของเจลด้วยการฉายรังสี ระยะเวลาการฉายรังสีขึ้นอยู่กับความเข้มของรังสี ซึ่งความเข้มข้นของรังสีที่เหมาะสม คือ 40-60 กิโลเกรย์ จะทำให้โครงร่างของเจลมีลักษณะใส

โครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหม ตามการประดิษฐ์นี้ มีลักษณะเป็นโครงร่างที่มีลักษณะใส อยู่ในรูปของเจล ใช้เป็นโครงร่างสำหรับให้เซลล์ไฟโบบลาสต์ (Fibroblast) ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่บริเวณผิวหนัง สามารถยึดเกาะได้ โดยโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมนี้จะประกอบไปด้วย

- สารสกัดจากใยไหม ที่มีความเข้มข้น 1-30 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

- สารก่อรูปเจล ที่มีความเข้มข้น 1-50 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยสารก่อรูปเจล ได้แก่

โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA), โพลีไวนิลปิวิไทรล (PVB), เพกติน (pectin), เจลลาติน (gelatin), คาร์โบพอล (carbopol), โพลิซามเมอร์ (poloxamer), เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose) โดยจะเลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่งหรือใช้เป็นสารผสมก็ได้ ซึ่งสารก่อรูปเจลที่เหมาะสม คือ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์

- สารเพิ่มความพรุนของเจล ที่มีความเข้มข้น 1-15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยสารเพิ่มความพรุนของเจล ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ โดยจะเลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่งหรือใช้เป็นสารผสมก็ได้ ซึ่งสารเพิ่มความพรุนที่เหมาะสม คือ โซเดียมคลอไรด์

โดยในระหว่างที่มีการผสมของสารแต่ละชนิด จะมีการฉายรังสีที่มีความเข้มของรังสีอยู่ในช่วง 20-200 กิโลเกรย์ โดยรังสีที่ใช้ ได้แก่ รังสีแกมมา (gamma ray), รังสีอัลตราไวโอเลต (uv), รังสีเอ็กซ์ (X-ray), รังสีแอลฟา, รังสีเบต้า, รังสีนิวตรอน โดยสามารถเลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่ง

5 การนำโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมไปใช้ โดยนำไปใช้เป็นโครงร่างผิวหนังสังเคราะห์ (reconstructed skin equivalent) เพื่อให้เซลล์ที่อยู่ใต้ผิวหนัง เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ยึดเกาะได้ และพัฒนาโครงสร้างไปเป็นผิวหนังชั้นหนังแท้ (Dermal scaffold) หรือผิวหนังเทียม (Tissue engineering skin) นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาต่อเป็นผ้าปิดแผล (Wound dressing) ได้

5. คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ (ถ้ามีรูปเขียน)

รูปที่ 1 แสดงภาพตัดขวางโครงสร้างของผิวหนังธรรมชาติ

รูปที่ 2 แสดงภาพตัดขวางโครงสร้างของผิวหนังสังเคราะห์

6. วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุดได้บรรยายไว้ในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์แล้ว

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมโดยวิธีฉายรังสี ตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ

1.1 การคัดเลือกไหม (Selection)

การคัดเลือกไหม จะเลือกใช้ไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ-1 (Native Thai silkworm cocoons, Bombyx mori var. Nangnoi Sisaket-1) จากนั้นนำไหมที่ได้ไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ให้ขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร เพื่อเพิ่มพื้นที่ให้ไหมได้สัมผัสกับสารละลาย

1.2 การลอกกาวไหม (Degumming)

นำใยไหมที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มาต้มกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่มีความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนโดยมวล 1 : 50 ที่อุณหภูมิประมาณ 80-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำมารองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง เพื่อชะล้างสารเซอรินและโซเดียมคาร์บอเนตออกจากใยไหม จะได้ใยไหมไฟโบรอิน จากนั้นนำใยไหมไฟโบรอินไปทำให้แห้ง โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะได้เส้นใยไหมไฟโบรอินที่มีลักษณะแห้ง พร้อมที่จะนำไปใช้สำหรับเตรียมเยื่อโครงร่างต่อไป

1.3 การเตรียมสารละลายไหมไฟโบรอิน (Preparation of fibroin solution)

นำใยไหมไฟโบรอิน มาใส่ลงในตัวทำละลายที่เป็นสารละลายผสมของแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮโดรต เอทานอล (ความเข้มข้น 90-95 %) และน้ำ ในอัตราส่วนโดยมวล 1 : 2 : 8 ตามลำดับ แล้ววางตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาใส่ในถุงเซลลูโลส เพื่อแยกเอาเกลือออกจากสารละลาย โดยอาศัยหลักการแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่าน (dialysis) โดยตั้งทิ้งไว้ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 2 วัน จะได้สารละลายไหมไฟโบรอิน (Fibroin solution) เข้มข้น ที่มีลักษณะใส

1.4 การทำโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อ

นำสารละลายไหมไฟโบรอิน (Fibroin solution) ที่มีความเข้มข้น 1-30 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) มาเตรียมให้อยู่ในรูปเจล โดยนำมาผสมกับสารก่อรูปเจล ที่มีความเข้มข้น 1-50 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และสารเพิ่มความพรุนของเจล ที่มีความเข้มข้น 1-15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยสารเพิ่มความพรุน จะทำให้เจลมีขนาดของรูพรุนในช่วง 50-250 ไมครอน ซึ่งการขึ้นรูปเจลนั้นจะมีการเชื่อมต่อกัน (cross-link) ให้อยู่ในรูปของเจลด้วยการฉายรังสี ระยะเวลาการฉายรังสีขึ้นอยู่กับความเข้มของรังสี ซึ่งความเข้มของรังสีที่ให้อยู่ในช่วง 20-200 กิโลเกรย์ จะได้โครงร่างของเจลที่มีลักษณะใส

2. กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดไขไหมโดยวิธีฉายรังสี ตามข้อ
ถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่ง สารก่อรูปเจล ได้แก่ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA), โพลีไวนิลปิวิไทรล (PVB),
เพกติน (pectin), เจลลาติน (gelatin), คาร์โบพอล (carbopol), โพลโซซาเมอร์ (poloxamer), เมทิล
เซลลูโลส (methylcellulose) เลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่งหรือใช้เป็นสารผสมก็ได้ ที่เหมาะสม คือ โพลีไ
5 นิลแอลกอฮอล์ (PVA)

3. กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดไขไหมโดยวิธีฉายรังสี ตามข้อ
ถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่ง สารเพิ่มความพรุนของเจล ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์,
แมกนีเซียมคลอไรด์ เลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่งหรือใช้เป็นสารผสมก็ได้ ที่เหมาะสม คือ โซเดียมคลอ
10 ไรด์

4. กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดไขไหมโดยวิธีฉายรังสี ตามข้อ
ถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่ง รังสีที่ใช้ ได้แก่ รังสีแกมมา (gamma ray), รังสีอัลตราไวโอเลต (uv), รังสีเอ็กซ์ (X-
ray), รังสีแอลฟา, รังสีเบต้า, รังสีนิวตรอน เลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่ง ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของรังสี
ที่เหมาะสม คือ 40-60 กิโลเกรย์

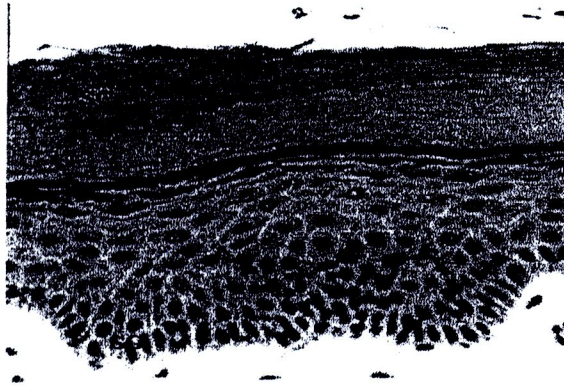
5. ผลกระทบที่ได้จากกรรมวิธี ตามข้อถ้อยสิทธิ 1

6. กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดไขไหมโดยวิธีฉายรังสี ตามข้อ
ถ้อยสิทธิ 1 ถึง 5 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง การนำโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดไขไหมไปใช้เป็น
โครงร่างผิวหนังสังเคราะห์ (reconstructed skin equivalent) เพื่อให้เซลล์ที่อยู่ใต้ผิวหนัง เช่น เซลล์
ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ยึดเกาะได้ และพัฒนาโครงสร้างไปเป็นผิวหนังชั้นหนังแท้ (Dermal
15 scaffold) หรือผิวหนังเทียม (Tissueengineering skin) หรือผ้าปิดแผล (Wound dressing)

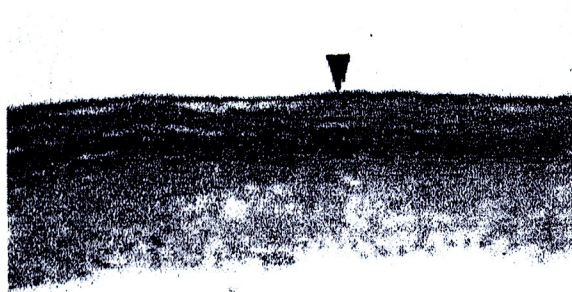
บทสรุปการประดิษฐ์

5

กรรมวิธีการเตรียมโครงร่างสำหรับเนื้อเยื่อจากสารสกัดใยไหมโดยวิธีฉายรังสี ตามการประดิษฐ์นี้ เป็นการเตรียมโครงร่างของผิวหนังสังเคราะห์ (Reconstructed skin equivalent) ในส่วนของผิวหนังชั้นหนังแท้ (Artificial dermal scaffold) สำหรับใช้เป็นโครงร่างให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) ยึดเกาะ โดยใช้สารสกัดจากใยไหมที่แยกเอาส่วนของเซอริซิน (sericin) ออก ผสมกับสารก่อรูปเจลและสารเพิ่มความพรุนลงไป เพื่อเพิ่มพื้นที่การยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) โดยลักษณะของโครงร่างจะอยู่ในรูปของเจล (Hydrogel) ด้วยวิธีการฉายรังสี โครงร่างตามการประดิษฐ์นี้สามารถพัฒนาไปเป็นผิวหนังเทียม (Tissue engineering skin) และประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดทำแผล (Wound dressing) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะใกล้เคียงกับผิวหนังธรรมชาติ



รูปที่ 1



(c)

Scale bar 50 μm

รูปที่ 2

