

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลวนผ่าน เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells, MSC) บนโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเทียมสามมิติในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีการออกแบบ จัดสร้าง ทดสอบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ประกอบด้วยช่องใส่โครงเลี้ยงเซลล์แบบเดี่ยว ปัมของเหลวสำหรับไหลวนอาหารเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการทดสอบการเพาะ (seeding) การขยายจำนวน (proliferation) และการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เป็นเซลล์กระดูกของ MSC บนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติโดยมีรูปแบบของการทำงานแบบไหลวนผ่าน (perfusion) ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อลดข้อจำกัดในการส่งผ่านมวลภายในโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ทดสอบผลิตจากไฟโบรอินไหมไทยดัดแปลงด้วยเจลาตินและไฮดรอกซีอะพาไทต์ (CGSF4) หรือเจลาตินผสมไฮดรอกซีอะพาไทต์ 30/70 โดยน้ำหนัก (Gel/HA) โดยมีการเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบสถิตที่ใช้กันทั่วไป ผลการเปรียบเทียบวิธีการเพาะ (seed) เซลล์ บนโครงเลี้ยงเซลล์ CGSF4 กับ ทำวิธี Agitation seeding และวิธี Centrifugal seeding พบว่าทุกวิธีให้ผลการกระจายตัวของเซลล์ที่ดี และมีเซลล์ติดในโครงเลี้ยงเซลล์มากกว่าร้อยละ 25 แม้ว่าการเพาะเซลล์ด้วยวิธี Agitation seeding จะมีร้อยละของการเกาะของเซลล์สูงที่สุด แต่ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่สร้างขึ้นสามารถใช้เพาะเซลล์ได้ดีในกรณีที่มีจำนวนเซลล์แขวนลอยอยู่เจือจางถึง 5.0×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ให้มีความหนาแน่น 1.3×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรบนโครงเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เวลาเพาะ 6 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยง MSC ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่สถานะสถิต เป็นเวลา 5 วัน เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (Population Doubling Time, PDT) เป็น 214.6 ชั่วโมง เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ที่มีค่า PDT เป็น 250.8 ชั่วโมง ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่าโดยค่า PDT ลดลงเป็น 192.9 ชั่วโมง MSC ที่เลี้ยงบนโครงเลี้ยงเซลล์ Gel/HA ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มีกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase และมีการสร้างแคลเซียมสูงกว่าการเลี้ยงแบบสถิต 1.7 และ 2.3 เท่าตามลำดับในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ แสดงถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกโดยไม่ต้องใช้ differentiating medium ผลการวิเคราะห์พื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย Energy-dispersive X-ray spectroscopy พบว่าอัตราส่วนแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสที่ MSC สร้างขึ้นหลังการเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (osteogenic medium) เป็นเวลา 28 วัน มีค่า 1.61 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าของกระดูกในธรรมชาติ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นศักยภาพและความสำคัญของการใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในการเพาะ ขยายจำนวน และการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ต้องการเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัยด้านเซลล์ และทางการแพทย์ที่มีการใช้เซลล์ต้นกำเนิด

Abstract

The current research focused on developing a perfusion bioreactor system for dynamic culture of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) on 3D scaffolds *in vitro*. The design of the system was composed of single scaffold chamber and the Perfusion liquid pumps for continuous circulation of medium in a control environment. This design was aimed to reduce mass transfer limits with in 3D scaffolds. The system was tested on cell seeding efficacy, cell proliferation, and osteogenic differentiation. Two types of scaffolds, Thai silk fibroin conjugated with gelatin and hydroxyapatite (GCSF4) and gelatin/hydroxyapatite (30/70 wt./wt.) (Gel/HA) were tested in different experiments. Performance cell proliferation and differentiation in bioreactors was evaluated in comparison to conventional static culture. Cell seeding using bioreactor or agitation or centrifugal seeding method showed similar good cell distribution profiles. Cells spread out homogeneously throughout the scaffolds. Numbers of cell attached on GCSF4 scaffolds were well above 25% of the original amount of cell used. Although agitation seeding had the highest number of cell attached, seeding using bioreactor showed possibility of using dilute cell suspension. Density of 1.3×10^4 cells/mm³ could be achieved using cell solution of 5×10^4 cells/ml in 6 hrs. Population doubling time (PDT) for the *in vitro* static cell culture of MSC on Gel/HA scaffolds was 250.8 hrs, while in a bioreactor, the PDT reduced to 192.3 hrs. In term of osteogenic differentiation, alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium content of MSC in normal medium for cells on Gel/HA scaffolds in the bioreactor were enhances by 1.7 and 2.3 times, respectively over those cultured at static condition. The showed the ability of using bioreactor to induce cell differentiation without using of chemicals. Energy-dispersive X-ray spectroscopy of the cell surface shown Ca:P ratio was at 1.61, similar to those of the normal bone mineralized ratios. Results of these experiments reveal potential and the needs for the use of bioreactors in seeding, proliferation, and differentiation of stem cells which would benefit cell culture system for research and therapeutic purposes.

คำสำคัญ: เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ, เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก, วิศวกรรมเนื้อเยื่อ, การเพาะเซลล์

(Bioreactor, bone marrow derived MSC, tissue engineering, cell seeding)