



สำนักหอสมุด

อภิธานนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง การเตรียมและประเมินโครงร่างของเซลล์
ตับเพาะเลี้ยงแบบสามมิติเพื่อการทำนายการเกิดพิษต่อตับที่
เกิดจากการใช้ยา (R2558B037)



| |
|----------------------------------|
| สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ |
| วันลงทะเบียน..... 7 มี.ค. 2565 |
| เลขทะเบียน..... 1049598 |
| เลขเรียกหนังสือ..... 2 PM |

301
.25
๑๔๓๑๖
255๙

ผศ.ดร.ดำรงศักดิ์ เป็กทอง
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ จ. พิชณุโลก

บทคัดย่อ

การเกิดพิษต่อตับเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดเพิกถอนทะเบียนยาที่วางจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งส่งผลเสียต่อร่างกายของผู้ใช้ และทำให้เกิดความเสียหายในทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยา ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาแบบจำลองเนื้อเยื่อตับสำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อตับทางห้องปฏิบัติการ (*in vitro* cytotoxic testing) ที่สามารถทำนายความเป็นพิษได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว (high-throughput screening; HTS) เพื่อใช้ในการคัดกรองความปลอดภัยของสาร และประเมินความสัมพันธ์กับพิษวิทยาในร่างกายมนุษย์ สำหรับเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจก่อนเลือกใช้แบบจำลองสัตว์ทดลองที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบผลความเป็นพิษที่ได้จากเซลล์ตับเพาะเลี้ยงเพื่อทำนายผลในสัตว์ทดลองซึ่งจะช่วยลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง ประหยัดเวลา และลดต้นทุนในการศึกษาอีกด้วย หากแบบจำลองเนื้อเยื่อตับสามารถทำสำเร็จสามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองสารสมุนไพร หรือสารใหม่ที่จะนำมาใช้เป็นรักษาโรคในกระบวนการพัฒนายาใหม่ต่อไป

ในงานวิจัยใช้โปรตีนไฟโบรอินจากรังไหมของหนอนไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษโดยสกัดโปรตีนไฟโบรอินได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 95.5 ± 3.5 ตรวจสอบเอกลักษณ์ของไฟโบรอินด้วยเทคนิค FTIR พบ spectrum ของหมู่ amide ที่ตำแหน่งดังนี้ amide I ที่ 1637 cm^{-1} , amide II ที่ 1513 cm^{-1} และ amide III ที่ 1233 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้อง FTIR spectrum ของไฟโบรอินที่รายงานก่อนหน้านี้ จากนั้นเตรียมโครงสร้างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซานมีลักษณะเป็นคล้ายฟองน้ำสีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร สูงประมาณ 7 มิลลิเมตร คงรูปได้ไม่เปราะแตกง่าย FTIR spectrum ของโครงสร้างไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นพบ FTIR spectrum ที่ตำแหน่งดังนี้ amide I ที่ 1621 cm^{-1} , amide II ที่ 1514 cm^{-1} และ amide III ที่ 1232 cm^{-1} เมื่อเปรียบเทียบกับไฟโบรอินที่สกัดได้พบว่าการลดลงของ FTIR spectrum ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นมีโครงสร้างแบบ β -sheet ซึ่งมีความเสถียรกว่า โดยเกิดจากผลของกรดแลกติกซึ่งใช้ในการละลาย lyophilized fibroin ระหว่างขั้นตอนการเตรียมโครงสร้าง โครงสร้างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซาน ร้อยละความพรุนอยู่ระหว่างปริมาณร้อยละ 80-90 โครงสร้างสามารถรับแรงกดสูงสุดที่โครงสร้างยังสามารถคงรูปได้ระหว่าง 1.25-3.94 N อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาผลการทดสอบการมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับใน primary human hepatocytes ที่เพาะเลี้ยงในโครงสร้างด้วยเทคนิค MTT assay พบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาโดยกำหนดให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ตับ primary human hepatocytes เป็น 100% ในวันที่เริ่มการทดลอง (Day1) และพบร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 89.45, 63.48, 39.42, 31.26, และ 20.14 ในวันที่ 3, 5, 7, 14 และ วันที่ 21 ตามลำดับ บ่งชี้ว่าเซลล์ primary human hepatocytes มีค่า cell viability ที่ค่อนข้างต่ำตั้งแต่แรกอยู่แล้วจึงทำให้ไม่สามารถทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ เช่น การสร้าง albumin, การทำงานของ cytochrome P450 enzyme รวมถึงการทดสอบผลต่อยาที่มีคุณสมบัติเป็น drug-induced liver toxicity ได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองซ้ำใน primary human hepatocytes ที่มี lot number แตกต่างออกไปอีกจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันจึงสรุปได้ว่าต้องสั่งซื้อ primary human hepatocytes ใหม่ที่มี cell viability ที่ดีมาเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนของการทดสอบคุณสมบัติทาง biology ของ primary human hepatocytes ที่เพาะเลี้ยงใน 3D scaffold ที่เตรียมได้จากการวิจัยนี้ต่อไป

สารบัญเรื่อง

| เรื่อง | หน้า |
|--|------|
| 1. บทนำ | |
| หลักการเหตุผลและระบุสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย | 4 |
| วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 5 |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย | 5 |
| 2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง | 6 |
| 3. ระเบียบวิธีวิจัย | |
| การเตรียมโครงร่างไฟโบรอิน | 8 |
| การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของโครงร่างไฟโบรอิน | 8 |
| 4. ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย | |
| การเตรียมโครงร่างไฟโบรอินและการสกัดไฟโบรอินจากรังไหม | 11 |
| การตรวจสอบเอกลักษณ์ของไฟโบรอินที่สกัดได้จากรังไหม | 11 |
| การเตรียมโครงร่างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซาน | 13 |
| การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของโครงร่างไฟโบรอินและไคโตซานด้วยเทคนิค FTIR | 13 |
| ความพรุนของโครงร่าง (Porosity) | 16 |
| การคงรูปของโครงร่างในสารละลาย (Retainability) | 16 |
| คุณสมบัติเชิงกลของโครงร่าง (Mechanical properties) | 17 |
| การทดสอบการมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับ (primary human hepatocytes) ที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay | 17 |
| 5. สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ | 19 |
| 6. เอกสารอ้างอิง | 20 |

1. หลักการเหตุผลและสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย

แม้จะมีขั้นตอนในการศึกษาที่เข้มงวดในกระบวนการพัฒนายาใหม่ (drug development) ทั้งการศึกษาในระยะก่อนคลินิก (preclinical test) ซึ่งนิยมศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อคัดกรองผลของยาต่อระบบต่างๆของร่างกาย และการทดสอบระยะคลินิก (clinical test) เพื่อดูผลของยาในร่างกายมนุษย์ แต่จากการสำรวจในช่วงปี 1974 – 2011 พบว่ามียากว่า 30 รายการที่ถูกถอนทะเบียนเนื่องจากพบรายงานการเกิดผลข้างเคียงที่รุนแรง โดยสาเหตุที่พบบ่อย คือ การเกิด Drug-induced liver injury (DILI) ดังนั้นหากสามารถทดสอบหรือคัดกรองความเป็นพิษของยาเหล่านี้ได้ก่อนการนำเข้าสู่การทดสอบระยะคลินิก จะเป็นการเพิ่มความปลอดภัยของผู้ใช้ยา และยังเป็นการลดระยะเวลาและงบประมาณที่ต้องสูญเสียไปในกระบวนการทดสอบยาในระยะคลินิก ซึ่งใช้ค่าสมักครจำนวนมากและใช้เวลาในการศึกษายาวนาน

การคัดกรองความเป็นพิษของยาในระยะก่อนคลินิกนิยมทำในสัตว์ทดลองซึ่งมักใช้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพื่อประเมินฤทธิ์ของยาทั้งผลการรักษา ผลข้างเคียงและการเกิดพิษต่อระบบต่างๆในร่างกาย โดยเฉพาะการเกิดพิษที่เกี่ยวข้องกับตับเนื่องจากเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และการเกิดพิษ แต่การศึกษาในสัตว์ทดลองก็ยังมีข้อจำกัดในการประเมินผลของยาในมนุษย์ เนื่องจากความแตกต่างทางสายพันธุ์ (interspecies difference) อาทิ ความแตกต่างของวิถีการกำจัดสารพิษในตับ (liver detoxification pathway) และกลไกการเปลี่ยนแปลงของโรค (disease adaptation mechanism) เป็นต้น รวมถึงยังมีข้อกังวลด้านจริยธรรมจากการใช้สัตว์ทดลอง และการใช้ระยะเวลาในการศึกษานาน ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาใช้การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ (*in vitro* cytotoxic testing) ที่สามารถทำนายได้อย่างแม่นยำและสามารถตรวจสอบผลได้อย่างรวดเร็ว (High-throughput screening; HTS) โดยใช้การวิเคราะห์ผลในเซลล์ (cell-based assay) เพื่อใช้ในการคัดกรอง และตัดสินใจก่อนเลือกใช้โมเดลสัตว์ทดลองที่เหมาะสม จึงเป็นการช่วยลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองและลดต้นทุนในการศึกษาอีกด้วย

สำหรับ Human *in vitro* liver model ที่ใช้ในการทำนายการเกิด drug-induced toxicity ในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้ microsome ซึ่งเป็นส่วน endoplasmic reticulum ของเซลล์ตับ เนื่องจากไม่มีองค์ประกอบของเซลล์จึงเหมาะสำหรับใช้ประเมิน drug metabolizing enzyme เท่านั้น การทดสอบใน ชิ้นส่วนของตับที่ถูกหั่นให้มีขนาดเล็ก (liver slice) จึงยังคงโครงสร้างของตับแต่มีข้อจำกัดคือ short term viability, และการศึกษาโดยใช้เซลล์ตับ ซึ่งอาจใช้เซลล์สายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์ตับ (hepatocyte cell line) และเซลล์ที่แยกออกมาจากเซลล์ตับ (primary hepatocyte) แต่เซลล์สายพันธุ์จะมีความทำงานของเอนไซม์ CYP ต่ำและขาด liver specific activity จึงนิยมศึกษาด้วย primary hepatocyte โดยมีการเพาะเลี้ยงใน tissue culture plate ให้เซลล์เจริญเป็นชั้นแบบ monolayer แม้จะสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายแต่การทำงานของเซลล์ในด้าน drug metabolism จะลดลงไปตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและมีแนวโน้มที่จะเกิด de-differentiation วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการใช้ประเมินการเกิดพิษแบบเฉียบพลัน (acute drug-induced toxicity) เท่านั้น ดังนั้นจึงมีการใช้ความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) มาพัฒนา *in vitro* liver model ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับร่วมกับโครงร่างที่มีรูพรุน (porous scaffold) ซึ่ง

จะทำให้เซลล์มีการเจริญแบบ 3 มิติ ที่คล้ายคลึงกับสภาวะในร่างกาย เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงแบบ monolayer การเพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติจะช่วยให้ primary hepatocyte มี metabolic activity ที่นานขึ้น

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำความรู้ด้านงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาสร้างแบบจำลองเนื้อเยื่อตับ (*in vitro liver model*) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ primary hepatocyte ร่วมกับโครงร่างแบบไฮโดรเจลที่เตรียมจากไคโตซานและแป้งข้าวโพด (chitosan/starch hydrogel) ซึ่งโครงร่างแบบไฮโดรเจลนี้มีลักษณะกึ่งแข็ง (semi-solid) จึงส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเติบโตในลักษณะ 3 มิติ และสามารถดูดซับสารละลายได้ดี จึงช่วยให้มีการส่งผ่านโมเลกุลของสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาศักยภาพของโครงร่างสามมิติที่เตรียมจากไฟโพรอินและไคโตซานในการเพาะเลี้ยงเซลล์ primary hepatocyte เพื่อสร้างแบบจำลองเซลล์ตับ (*in vitro liver model*)
2. ทดสอบศักยภาพและพัฒนาคุณสมบัติของ *in vitro liver model* ให้สามารถใช้ในการทำนายทางพิษวิทยาได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เตรียมโครงร่างโครงร่างสามมิติที่เตรียมจากไฟโพรอินและไคโตซาน
2. ประเมินศักยภาพของโครงร่างสามมิติที่เตรียมจากไฟโพรอินและไคโตซานที่เตรียมขึ้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ primary hepatocyte โดยการสังเกตรูปร่าง (morphology) ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในโครงร่าง, อัตราการยึดเกาะ (cell adhesion rate), อัตราการเพิ่มจำนวน (proliferation rate) และการทำงานของเซลล์ตับจากการศึกษาความสามารถในการหลั่งอัลบูมิน (albumin secretion), และการทำงานของเอนไซม์ (liver enzyme activity)
3. ทดสอบคุณสมบัติของแบบจำลองเนื้อเยื่อตับ (*in vitro liver model*) ที่เตรียมขึ้นโดยการทดสอบกับสารตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบทางพิษวิทยากับสารที่มีข้อมูลรายงานก่อนหน้านี้

2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นสหสาขาวิชาที่ผสมผสานความรู้ทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขเข้ากับความรู้ด้านวิศวกรรมศาสตร์ เพื่อสร้างเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ สำหรับเพื่อใช้ในการซ่อมแซมหรือทดแทนเนื้อเยื่อที่สูญเสียไป นอกจากนี้ประโยชน์ด้านการรักษาแล้วในปัจจุบันยังได้ประยุกต์ความรู้ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ทดสอบความเป็นพิษต่ออวัยวะต่างๆ รวมถึงวิศวกรรมเนื้อเยื่อตับ เพื่อเป็นทางเลือกในการคัดกรองและทำนายการเกิดพิษของสารแทนการศึกษาในสัตว์ทดลอง ช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลา รวมถึงหลีกเลี่ยงข้อกังวลด้านจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลอง

การสร้างเนื้อเยื่อจะต้องอาศัยองค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ เซลล์, โครงร่าง และสารกระตุ้น เช่น growth factors เป็นต้น เนื้อเยื่อตับประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด โดยมีเซลล์ตับทำหน้าที่ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารและกำจัดพิษคือเซลล์ตับ (hepatocyte) ซึ่งการสร้างแบบเนื้อเยื่อสามารถใช้เซลล์ที่แยกจากตับโดยตรง (primary hepatocytes) หรือเซลล์สายพันธุ์ human hepatocellular carcinoma cell line เช่น HepG2 และ HepaRG เป็นต้น แม้ว่า primary hepatocytes จะมีข้อจำกัดในการทำ donor เพื่อแยกเก็บเซลล์และการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลงในช่วงการเพาะเลี้ยง แต่จากการศึกษาของ Geret และคณะเพื่อเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการทำนายพิษวิทยาของสารในแบบจำลองเนื้อเยื่อตับที่สร้างจาก hepatocyte cell line เทียบกับ primary hepatocyte พบว่า primary hepatocytes มี sensitivity มากที่สุดรองลงมาคือ HepaRG และ HepG2 ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อสร้างแบบจำลองเนื้อเยื่อตับที่มีประสิทธิภาพในการประเมินการเกิดพิษของสารจึงควรเลือกใช้ primary hepatocyte

นอกจากการคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมแล้ว โครงร่างก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญ เนื่องจากเซลล์จำเป็นต้องมีที่ยึดเกาะ เพื่อช่วยสนับสนุนการเพิ่มจำนวน (cell proliferation) และพัฒนา (cell differentiation) ไปเป็นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ทั้งด้านกายภาพและชีวภาพ เมื่ออยู่ในร่างกายเซลล์จะยึดเกาะกับ extracellular matrix (ECM) ผ่านทางตัวรับซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโน (amino acid) ที่จำเพาะประกอบด้วย Arg-Gly-Asp หรือเรียกว่า RGD sequence เมื่อเซลล์จับกับตัวรับดังกล่าว จะกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) ให้มีการเพิ่มจำนวน (proliferation) ตามลำดับ ดังนั้นการสร้างเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ โครงร่างจึงทำหน้าที่เสมือนเป็น ECM ให้เซลล์ยึดเกาะ เพื่อเพิ่มจำนวนและพัฒนา ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ได้ โครงร่างที่ดีจะต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้ มีพื้นผิวที่เหมาะสมกับการยึดเกาะของเซลล์, ไม่เป็นพิษ (non-toxicity), เข้ากันได้กับระบบภูมิคุ้มกัน (biocompatible), มีความแข็งแรงเพียงพอและสามารถสลายตัวด้วยกระบวนการธรรมชาติ (biodegradation) ในอัตราที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ สำหรับวัสดุที่ใช้เตรียมโครงร่างสามารถใช้ได้ทั้งสารสังเคราะห์ เช่น polyglycolide, polylactide, polylactide coglycolide เป็นต้น และจากสารจากธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน (collagen), เจลาติน (gelatin), ไฟโบรอิน (fibroin) และไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น ทั้งนี้วัสดุจากธรรมชาติจะมีข้อดี คือมี cell recognition site ซึ่งช่วยในการยึดเกาะและยังสามารถสลายตัวได้ด้วยกระบวนการธรรมชาติในร่างกาย โดยไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxic)

สำหรับการศึกษานี้ จะใช้โครงร่างที่มีลักษณะเป็นสามมิติ ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าโครงร่างในลักษณะแบบสามมิตินี้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ตับได้ โดยผู้วิจัยจะเตรียมโครงร่างที่มีลักษณะเป็นสามมิติจากโปรตีนจากรังไหมชื่อไฟโบรอินและโคไคซาน ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โครงสร้างภายในมีลักษณะเป็นรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน (interconnected pore structure) ซึ่งเป็นผลดีในการส่งผ่านสารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และยังช่วยส่งเสริมให้เกิด cell-cell interaction อีกด้วย



3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1. การเตรียมโครงร่างไฟโบรอิน

3.1.1 การสกัดไฟโบรอินจากรังไหม

นำรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษไปตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก จากนั้นต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 30 นาที ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ส่วนของเส้นใยไฟโบรอิน ซึ่งจะนำมาละลายในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 90°C จนเส้นไหมละลายจึงนำไปกำจัดสารละลายเกลือออกด้วยวิธี dialysis เป็นเวลา 72 ชม. จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 g เพื่อแยกอนุภาคที่เจือปน แล้วแยกเฉพาะส่วนของสารละลายไฟโบรอินไปทำให้แห้งด้วยเทคนิค Lyophilization แล้วทำการเก็บไฟโบรอินที่ได้ใน desicator

นำรังไหมของหนอนไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ (*Bombyx mori*) มาตัดให้มีขนาดเล็ก ทำการกำจัดกาวไหมโดยต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) ที่อุณหภูมิ 70°C 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำเส้นไหมซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนไฟโบรอินมาต้มในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride; CaCl₂) ที่อุณหภูมิ 90°C จนเส้นไหมละลาย กำจัดแคลเซียมคลอไรด์ออกจากสารละลายไฟโบรอินโดยวิธี dialysis ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 72 ชม. ทำการเปลี่ยนน้ำทุก 12 ชม. จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization)

3.1.2 การเตรียมโครงร่างไฟโบรอินและไคโตซาน

เตรียมสารละลายไฟโบรอินในสารละลายกรดแลคติกให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 2-6% w/w จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งด้วยเทคนิค Lyophilization เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้เป็นโครงร่างไฟโบรอิน ซึ่งจะนำไปประเมินลักษณะทางกายภาพและความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

โครงร่างไฟโบรอินและไคโตซานเตรียมขึ้นโดยใช้เทคนิคการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) โดยเตรียมสารละลายไฟโบรอิน และไคโตซานความเข้มข้น 2 %w/v ในสารละลายกรดแลคติก pH 4.0 จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ โดยมีอัตราส่วนของไฟโบรอินและไคโตซาน (Fibroin: Chitosan ; FC) ดังนี้ 1:3, 1:1, และ 3:1 แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ lyophilization จะได้เป็นโครงร่างที่มีลักษณะเป็นรูพรุน

3.2 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของโครงร่างไฟโบรอิน

พิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของไฟโบรอินที่สกัดได้และทดสอบความเข้ากันได้ของไฟโบรอินและไคโตซานด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

ประเมินสภาพพื้นผิว รูพรุนและวัดขนาดของรูพรุนโดยใช้ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

ศึกษาหาค่าความพรุนโดยใช้เทคนิค liquid replacement method โดยทำการตวงสารละลาย hexane ปริมาตร 10 ml (V1) ลงใน cylinder จากนั้นนำ scaffolds ที่มีอัตราส่วนระหว่าง chitosan ต่อ fibroin ในอัตราส่วน 3:1 2:2 1:3 และโครงร่าง chitosan แช่ใน hexane ที่ได้ตวงไว้แล้ว เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการวัดปริมาตร ปีนที่ค่าปริมาตรที่อ่านได้ (V2) เมื่อครบเวลา นำ scaffolds ออก แล้วทำการวัดปริมาตร hexane ที่เหลืออยู่ (V3) แล้วนำปริมาตรที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละความพรุน (% Porosity) ดังสูตรด้านล่างนี้

$$\% \text{ Porosity} = [(v1-v3)/(v2-v3)] \times 100$$

3.2.2 คุณสมบัติเชิงกล (Mechanical properties)

ประเมินความแข็งแรงและยืดหยุ่นของโครงร่างด้วยเครื่อง Tensometer โดยการคำนวณหาค่าเฉลี่ยความแข็งแรงในการต้านทานแรงกด (compressive strength) และค่าความยืดหยุ่น (elongation at break)

ขึ้นรูปโครงร่าง ให้มีความสูงเตรียม scaffolds ให้มีความสูงประมาณ 1 cm ทำการวัดคุณสมบัติของโครงร่างในการการรับแรงกด (compressive strength) ด้วยเครื่อง universal Testing machine ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 โดยมีการกำหนดจุดที่สามารถรับแรงกดที่ครึ่งหนึ่งของความสูง scaffolds โดยมีอัตราเร็วในการกดเท่ากับ 1.00 มม./นาที แล้วบันทึกผล

3.2.3 ความคงรูปในสารละลายและการดูดซับน้ำ (Retain ability and water absorption)

ประเมินความสามารถในการคงรูปและความสามารถในการดูดซับน้ำ โดยนำโครงร่างไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ 37°C ตูลักษณะรูปร่างและทำการชั่งน้ำหนักเปียกแล้วคำนวณร้อยละการดูดซับน้ำ โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งก่อนแช่ในสารละลาย

นำโครงร่างไคโตซานและไฟโบรอินที่เตรียมขึ้น ไปแช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อดูการคงรูปของโครงร่าง หากโครงร่างที่เตรียมขึ้นไม่สามารถคงรูปได้จะนำโครงร่างไปแช่ในสารละลายที่มีความเป็นด่าง เพื่อ neutralize สารละลายกรดที่อาจตกค้างจากการเตรียมสารละลายไคโตซานและสารละลายไฟโบรอินในขั้นตอนการเตรียมโครงร่าง โดยทำการแช่โครงร่างในสารดังต่อไปนี้ ได้แก่ สารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ,

สารละลาย 0.21 M NH_4OH ใน methanol และสารละลาย 1 N NaOH แล้วจึงทำการ
ประเมินการคงรูปในสารละลายอีกครั้ง

3.2.4 การสลายตัว (Degradation) ประเมินการสลายตัวโดยนำตัวอย่างโครงสร้างที่เตรียมขึ้นไปแช่
ในสารละลายเอนไซม์ protease ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน แล้ว
คำนวณหาร้อยละของน้ำหนักที่หายไป โดยเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งก่อนและหลังการ
ทดสอบในแต่ละช่วงเวลา



4. ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมโครงสร้างไฟโบรอินและการสกัดไฟโบรอินจากรังไหม

โปรตีนไฟโบรอินจะถูกสกัดจากรังไหมของหนอนไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ (*Bombyx mori*) หลังจากการลอกกาวไหมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะได้เส้นไหมที่กำจัดเซอริซินออกแล้วเรียกว่า degummed silk จากนั้นนำมาละลายด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ได้เป็นสารละลายไฟโบรอิน แล้วจึงจากนั้นทำการ dialysis เพื่อขจัดแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำไปทำให้เป็นของแข็งด้วยกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ได้โปรตีนไฟโบรอินที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ดังรูปที่ 1 โดย degummed silk 1 กรัม จะสกัดได้ไฟโบรอินได้ประมาณ 90 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 95.5 ± 3.5 (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงภาพไฟโบรอินที่สกัดได้จากรังไหม

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละน้ำหนักของไฟโบรอินได้หลังจากกระบวนการลอกกาวไหม

| ตัวอย่าง | น้ำหนักของ degummed silk (กรัม) | น้ำหนักไฟโบรอินหลังการ lyophilization (กรัม) | % Yield |
|----------|---------------------------------|--|----------------|
| ชุดที่ 1 | 2.0 | 1.83 | 91.5 |
| ชุดที่ 2 | 1.0 | 0.98 | 98 |
| ชุดที่ 3 | 1.0 | 0.97 | 97 |
| | | เฉลี่ย | 95.5 ± 3.5 |

4.2 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของไฟโบรอินที่สกัดได้จากรังไหม

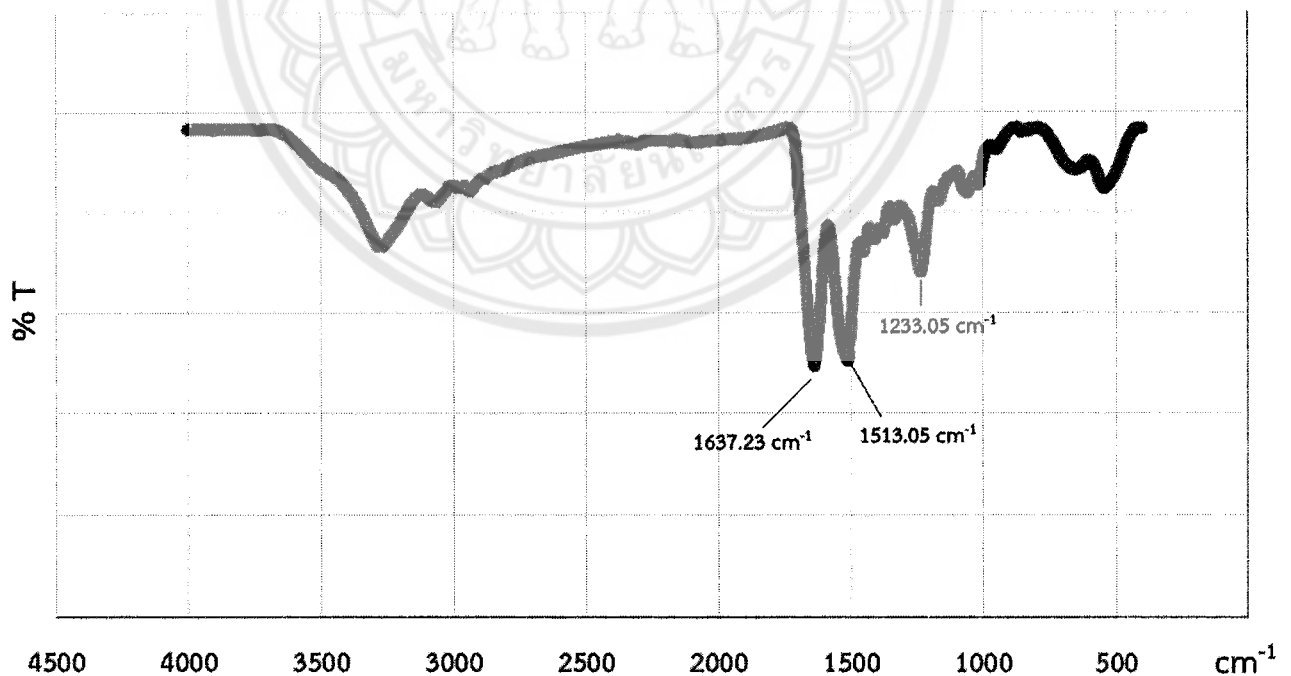
ตรวจสอบเอกลักษณ์ของไฟโบรอินด้วยเทคนิค FT-IR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลของสารด้วยหลักการทางอินฟราเรด ในการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ของโครงสร้างทางเคมี โดยโปรตีนไฟโบรอินจะแสดง FTIR spectrum ของหมู่เอไมด์ (amide) ที่ตำแหน่งดังนี้

amide I ที่ $1630-1650\text{ cm}^{-1}$, amide II ที่ $1540-1520\text{ cm}^{-1}$ และ amide III ที่ $1270-1230\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ
 ดังตารางที่ 2

จากผลการศึกษาพบว่าไฟโบรอินที่สกัดได้มี FTIR spectrum ที่ตำแหน่งดังนี้ amide I ที่ 1637 cm^{-1} ,
 amide II ที่ 1513 cm^{-1} และ amide III ที่ 1233 cm^{-1} (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้อง FTIR spectrum ของไฟโบรอิน
 และยังแสดงให้เห็นว่าโดยธรรมชาติแล้วไฟโบรอินจะมีโครงสร้างที่เป็น random coil

ตารางที่ 2 FTIR spectrum และความแตกต่างของ FTIR spectrum ในโครงสร้างไฟโบรอิน

| Chemical characteristic | Frequencies (cm^{-1}) | Secondary structure | |
|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Random coil | β -sheet |
| Amide I [C=O stretching] | 1650 – 1630 | 1650 cm^{-1} | 1630 cm^{-1} |
| Amide II [NH bending secondary] | 1540 – 1520 | 1540 cm^{-1} | 1520 cm^{-1} |
| Amide III [C-N stretching] | 1270 – 1230 | 1230 cm^{-1} | 1270 cm^{-1} |



รูปที่ 2 FTIR spectrum ของไฟโบรอินที่สกัดได้ (Regenerated silk fibroin)

4.3 การเตรียมโครงสร้างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซาน

โครงสร้างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซานที่เตรียมขึ้นมีลักษณะเป็นคล้ายฟองน้ำสีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร สูงประมาณ 7 มิลลิเมตร คงรูปได้ ไม่เปราะแตกง่าย ดังแสดงในรูปที่ 3 และมีลักษณะทางกายภาพได้แก่ ความเปราะและสี ดังตารางที่ 3



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของโครงสร้างไฟโบรอินและไคโตซานในอัตราส่วนต่างๆ

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพเบื้องต้น

| ตัวอย่าง | สีของตัวอย่าง (Color) | ความยากในการนำตัวอย่างออกจากแม่พิมพ์ |
|----------|-----------------------|--------------------------------------|
| Chitosan | เหลืองอ่อน | 0 |
| CF 3:1 | เหลืองอ่อน | 0 |
| CF 1:1 | เหลืองอ่อน | + |
| CF 1:3 | เหลืองอ่อน | + |
| Fibroin | เหลืองอ่อน | +++ |

ลำดับความยาก : +++ มาก, ++ ปานกลาง, + น้อย, 0 ไม่มี

4.4 การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของโครงสร้างไฟโบรอินและไคโตซานด้วยเทคนิค FTIR

FT-IR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลของสารด้วยหลักการทางอินฟราเรด ในการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ของสารและใช้วิเคราะห์อันตรกิริยาทางเคมี (Chemical interaction) ระหว่างสารด้วย

FTIR spectrum ของโครงสร้างไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นพบ FTIR spectrum ที่ตำแหน่งดังนี้ amide I ที่ 1621 cm^{-1} , amide II ที่ 1514 cm^{-1} และ amide III ที่ 1232 cm^{-1} เมื่อเปรียบเทียบกับไฟโบรอินที่สกัดได้พบว่าการลดลงของ FTIR spectrum ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นมีโครงสร้างแบบ β -

sheet ซึ่งมีความเสถียรมากกว่า โดยเกิดจากผลของกรดแลกติกซึ่งใช้ในการละลาย lyophilized fibroin ระหว่างขั้นตอนการเตรียมโครงร่าง

ไคโตซานเป็นสารกลุ่ม amino glucose จึงพบหมู่ฟังก์ชันได้แก่ amide และ saccharide structure ที่ตำแหน่งประมาณ $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ และ $1200-800\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ โดยโครงร่างไคโตซานที่เตรียมขึ้นพบ FTIR spectrum ที่ตำแหน่งดังนี้ 1720 cm^{-1} และ 1567 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงตำแหน่งพันธะ C=O และ N-H ของหมู่ amide ตามลำดับ และพบ saccharide structure ที่ตำแหน่ง 1120 และ 852 cm^{-1} ตามลำดับ

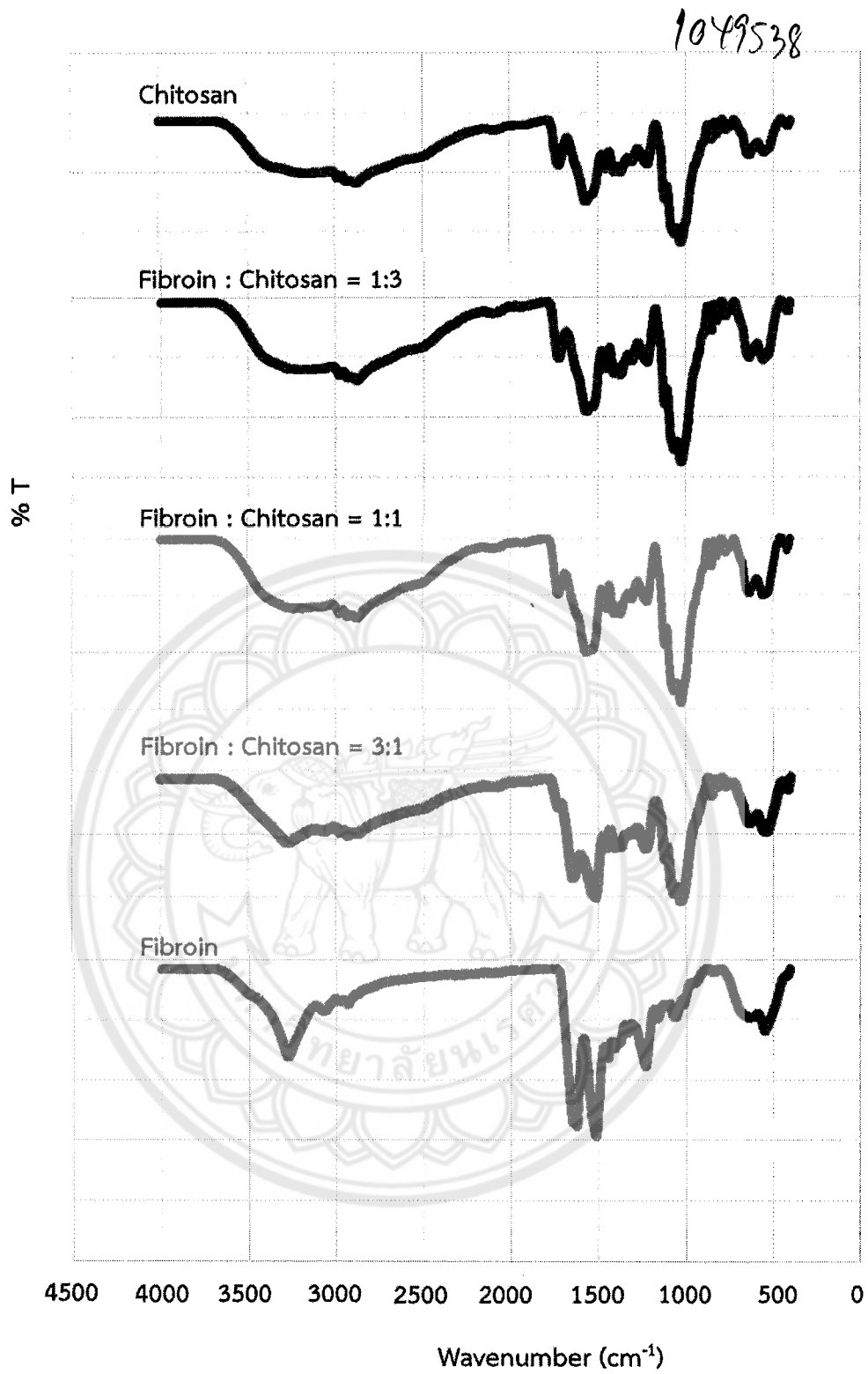
สำหรับโครงร่างที่มีส่วนผสมของไฟโบรอินและไคโตซานในอัตราส่วนต่างๆพบว่ามี absorption band ของทั้งไฟโบรอินและไคโตซาน โดยพบเปลี่ยนแปลงของ absorption band ของ amide ในไฟโบรอิน และ absorption band ของหมู่ amide ในไคโตซานหายไป โดย FTIR spectrum ของโครงร่างผสมจะมี absorption band ของหมู่ amide I ที่ 1643 cm^{-1} , amide II ที่ 1515 cm^{-1} และ amide III ที่ 1231 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึง β -sheet ของไฟโบรอิน (รูปที่ 4)





สำนักหอสมุด
- 7 มี.ค. 2565

จ ภม
301
.25
01995
2559



รูปที่ 4 FTIR spectrum ของโครงสร้างไคโตซาน, โครงสร้างไฟโบรอิน และโครงสร้างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซานในอัตราส่วนต่างๆ

4.5 ความพรุนของโครงร่าง (Porosity)

ความพรุน หรือ porosity ของโครงร่างจะบ่งบอกถึงพื้นที่ภายในโครงร่างที่เซลล์จะสามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ โดยความพรุนยิ่งมาก ยิ่งมีพื้นที่ผิว (surface area) สำหรับให้เซลล์ยึดเกาะได้มาก และสะท้อนถึงช่องทางในการลำเลียงสารน้ำและสารอาหารต่างๆ ผ่านเข้าสู่โครงร่างไปสู่เซลล์ที่เจริญเติบโตอยู่ภายในได้ จากผลการศึกษาพบว่าโครงร่างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซาน โครงร่างที่มีส่วนผสมของไฟโบรอินและไคโตซานในอัตราส่วนต่างๆ มีร้อยละความพรุนอยู่ระหว่างปริมาณร้อยละ 80-90 ทั้งนี้ค่าความพรุนแปรผันตามปริมาณสัดส่วนของไฟโบรอินในโครงร่าง โดยสัดส่วนไฟโบรอินยิ่งมาก ยิ่งมีความพรุนมาก

ตารางที่ 4 บันทึกค่าความพรุนที่ประเมินโดยใช้เทคนิค hexane replacement ในโครงร่างที่เตรียมขึ้น

| ตัวอย่าง | ครั้งที่ 1(%) | ครั้งที่ 2(%) | ครั้งที่ 3(%) | เฉลี่ย(%) |
|----------|---------------|---------------|---------------|-----------|
| Chitosan | 78 | 79 | 79 | 78.67 |
| 3:1 | 81 | 82 | 84 | 82.33 |
| 2:2 | 86 | 87 | 87 | 86.67 |
| 1:3 | 91 | 92 | 93 | 92 |

4.6 การคงรูปของโครงร่างในสารละลาย (Retainability)

เมื่อนำโครงร่างที่เตรียมขึ้นไปแช่ในสารละลาย พบว่าโครงร่างจะดูดซับสารละลายอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถคงรูปได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากมีสารละลายกรดบางส่วนที่ใช้ในขั้นตอนเตรียมสารละลายไคโตซานและไฟโบรอิน จึงต้องทำการ neutralization โครงร่างที่เตรียมขึ้นโดยเปรียบเทียบระหว่างสารละลาย methanol, ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ, สารละลาย 0.21 M NH_4OH ใน methanol และสารละลาย 1 N NaOH แล้วเปรียบเทียบการคงรูปของโครงร่างในสารละลาย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ก่อนนำไปใช้จะต้องนำโครงร่างไปทำการ neutralize เพื่อกำจัดกรดส่วนเกิน ในสารละลาย 1 N NaOH แล้วกลั้วด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 5 การคงรูปของโครงร่างในสารละลายต่างๆ

| ตัวอย่าง | Ethanol series | | | Methanol | 0.21 M NH_4OH in methanol | 1 N NaOH |
|----------|----------------|-----|------|----------|---|----------|
| | 50% | 70% | 100% | | | |
| Chitosan | X | X | X | X | X | ✓ |
| CF3:1 | X | X | X | X | X | ✓ |
| CF2:2 | X | X | X | X | X | ✓ |
| CF 1:3 | X | X | X | X | ✓ | ✓ |

หมายเหตุ : ✓ : คงรูปได้ X : คงรูปไม่ได้

4.7 คุณสมบัติเชิงกลของโครงร่าง (Mechanical properties)

จากผลการศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของโครงร่าง โดยการวัดแรงกดสูงสุดที่โครงร่างยังสามารถคงรูปได้ พบว่าคุณสมบัติในการรับแรงกดจะแปรผันตามสัดส่วนของไคโตซานและไฟโบรอิน โดยโครงร่างที่มีสัดส่วนของไคโตซานสูงมีรับแรงกดได้สูงกว่าโครงร่างที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ดังแสดงผลในตาราง

ตารางที่ 6 คุณสมบัติเชิงกลของโครงร่าง

| ตัวอย่าง | ความสามารถในการรับแรงกด(N) |
|----------|----------------------------|
| Chitosan | 3.94 ± 0.71 |
| 3:1 | 4.17 ± 0.23 |
| 2:2 | 3.34 ± 0.49 |
| 1:3 | 1.25 ± 0.54 |

4.8 การทดสอบการมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับ (primary human hepatocytes) ที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay

- นำชิ้น sterile scaffolds วางลงใน 48-well cell culture plate โดยวางชิ้น scaffold 1 ชิ้น/well จากนั้นเติม DMEM medium free serum ที่ผสม 1% antibiotics ลงไปปริมาตร 100 μl /well เพื่อทำการ pre-wetted และทำการบ่มในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลาข้ามคืน (overnight)
- นำเซลล์ตับ (primary human hepatocytes) ที่เพาะเลี้ยงใน tissue culture มา trypsinized ด้วย 0.25% trypsin-EDTA จากนั้นนับจำนวนเซลล์ ให้ได้เท่ากับ 1×10^6 cells/well ใน DMEM medium ที่มีส่วนผสมของ 10%FBS และ 1% penicillin+streptomycin
- เติม cell suspension ลงในชิ้น scaffold ที่เตรียมไว้ใน 48-well plate แล้วนำไปบ่มในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ยึดเกาะในชิ้น scaffolds หลังจากนั้นโดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในปริมาตร 400 μl /well, บ่ม ในตู้ CO₂ incubator และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน
- นำเซลล์ตับ (primary human hepatocytes) ที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ไปทดสอบการมีชีวิตและการเจริญเพิ่มจำนวนโดยวิธี MTT assay โดยเมื่อครบกำหนดเวลาจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และล้างชิ้น scaffolds ที่มีเซลล์ด้วย sterile PBS 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย 0.5 mg/ml MTT solution ลงไป 400 μl /well บ่มที่ 37 °C ในที่พ้นแสงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงดูดสารละลายทิ้งแล้วเติม DMSO ลงไป 500 μl เพื่อละลายผลึก formazan ที่นำสาละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader
- ผลการทดสอบมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับ (primary human hepatocytes) ที่เพาะเลี้ยงใน scaffolds ด้วยเทคนิค MTT assay พบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาโดยกำหนดให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต

ของเซลล์ต้น primary human hepatocytes เป็น 100% ในวันที่เริ่มการทดลอง (Day1) และพบร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 89.45%, 63.48%, 39.42%, 31.26%, 20.14% (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ) ในวันที่ 3, 5, 7, 14 และ วันที่ 21 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางด้านล่างนี้

| | normal cell | | | mean | SD | Scaffold cell | | | mean | SD |
|-------|-------------|-------|-------|-------|------|---------------|-------|-------|-------|------|
| | N1 | N2 | N3 | | | N1 | N2 | N3 | | |
| Day1 | 3.493 | 3.427 | 3.473 | 3.464 | 0.03 | 2.148 | 2.081 | 2.056 | 2.095 | 0.05 |
| Day3 | 1.865 | 1.954 | 1.833 | 1.884 | 0.06 | 1.855 | 1.899 | 1.869 | 1.874 | 0.02 |
| Day5 | 1.406 | 1.608 | 1.406 | 1.473 | 0.12 | 1.636 | 1.096 | 1.260 | 1.330 | 0.28 |
| Day7 | | | | | | 0.983 | 0.702 | 0.793 | 0.826 | 0.14 |
| Day14 | | | | | | 0.583 | 0.637 | 0.744 | 0.655 | 0.08 |
| Day21 | | | | | | 0.353 | 0.456 | 0.457 | 0.422 | 0.06 |

อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบกับร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ primary human hepatocytes ในลักษณะ monolayer culture พบการตายในลักษณะเดียวกันคือ ร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์คงเหลือ 54.24% และ 42.52% ในวันที่ 3, 5 ตามลำดับ บ่งชี้ว่าเซลล์ primary human hepatocytes มีค่า cell viability ที่ค่อนข้างต่ำตั้งแต่แรกอยู่แล้วจึงทำให้ไม่สามารถทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ เช่น การสร้าง albumin, การทำงานของ cytochrome P450 enzyme รวมถึงการทดสอบผลต่อยาที่มีคุณสมบัติเป็น drug-induced liver toxicity ได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองซ้ำใน primary human hepatocytes ที่มี lot number แตกต่างออกไปอีกจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันจึงสรุปได้ว่าต้องสั่งซื้อ primary human hepatocytes ใหม่ที่มี cell viability ที่ดีมาเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนของการทดสอบคุณสมบัติทาง biology ของ primary human hepatocytes ที่เพาะเลี้ยงใน 3D scaffold ที่เตรียมได้จากการวิจัยนี้ต่อไป

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยใช้โปรตีนไฟโบรอินจากรังไหมของหนอนไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษโดยสกัดโปรตีนไฟโบรอินได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 95.5 ± 3.5 ตรวจสอบเอกลักษณ์ของไฟโบรอินด้วยเทคนิค FTIR พบ spectrum ของหมู่ amide ที่ตำแหน่งดังนี้ amide I ที่ 1637 cm^{-1} , amide II ที่ 1513 cm^{-1} และ amide III ที่ 1233 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้อง FTIR spectrum ของไฟโบรอินที่รายงานก่อนหน้านี้ จากนั้นเตรียมโครงร่างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซานมีลักษณะเป็นคล้ายฟองน้ำสีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร สูงประมาณ 7 มิลลิเมตร คงรูปได้ ไม่เปราะแตกง่าย FTIR spectrum ของโครงร่างไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นพบ FTIR spectrum ที่ตำแหน่งดังนี้ amide I ที่ 1621 cm^{-1} , amide II ที่ 1514 cm^{-1} และ amide III ที่ 1232 cm^{-1} เมื่อเปรียบเทียบกับไฟโบรอินที่สกัดได้พบว่าการลดลงของ FTIR spectrum ซึ่งแสดงว่าโครงร่างไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นมีโครงสร้างแบบ β -sheet ซึ่งมีความเสถียรกว่า โดยเกิดจากผลของกรดแล็กติกซึ่งใช้ในการละลาย lyophilized fibroin ระหว่างขั้นตอนการเตรียมโครงร่าง โครงร่างผสมระหว่างไฟโบรอินและไคโตซาน ร้อยละความพรุนอยู่ระหว่างปริมาณร้อยละ 80-90 โครงร่างสามารถรับแรงกดสูงสุดที่โครงร่างยังสามารถคงรูปได้ระหว่าง 1.25-3.94 N อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาผลการทดสอบการมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับใน primary human hepatocytes ที่เพาะเลี้ยงในโครงร่างด้วยเทคนิค MTT assay พบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาโดยกำหนดให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ตับ primary human hepatocytes เป็น 100% ในวันที่เริ่มการทดลอง (Day1) และพบร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 89.45, 63.48, 39.42, 31.26, และ 20.14 ในวันที่ 3, 5, 7, 14 และ วันที่ 21 ตามลำดับ บ่งชี้ว่าเซลล์ primary human hepatocytes มีค่า cell viability ที่ค่อนข้างต่ำตั้งแต่แรกอยู่แล้วจึงทำให้ไม่สามารถทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ เช่น การสร้าง albumin, การทำงานของ cytochrome P450 enzyme รวมถึงการทดสอบผลต่อยาที่มีคุณสมบัติเป็น drug-induced liver toxicity ได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองซ้ำใน primary human hepatocytes ที่มี lot number แตกต่างออกไปอีกจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันจึงสรุปได้ว่าต้องสั่งซื้อ primary human hepatocytes ใหม่ที่มี cell viability ที่ดีมาเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนของการทดสอบคุณสมบัติทาง biology ของ primary human hepatocytes ที่เพาะเลี้ยงใน 3D scaffold ที่เตรียมได้จากการวิจัยนี้ต่อไป

6. เอกสารอ้างอิง

Astashkina A, Mann B, Grainger DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics* 134 (2012) 82–106.

Colli MD, Massimi M, Barbetta A, Rosario BD, S Nardecchia S, Devirgiliis LC and Dentini M. A biomimetic porous hydrogel of gelatin and glycosaminoglycans cross-linked with transglutaminase and its application in the culture of hepatocytes. *Biomed Mater* 7 (2012)

Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 28 (2012) 69–87.

Ijima H, Hou Y, Takei T. Development of hepatocyte-embedded hydrogel-filled macroporous scaffold cultures using transglutaminase. *Biochem Eng J* 52 (2010) 276–281.

Kim M, Lee JY, Jones CN, Revzin A, Tae G. Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes. *Biomaterials* 31 (2010) 3596–3603.

Malinen MM, Kanninen KL, Corlu A, Isoniemi MH, Lou Y, Yliperttula LM et al. Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels. *Biomaterials*. 35 (2014) 5110–5121.

Ngoenkama J, Faikruab A, Yasothornsrikul S, Viyocha J. Potential of an injectable chitosan/starch/ β -glycerol phosphate hydrogel sustaining normal chondrocyte function. *Int J Pharm* 391 (2010) 115–124.

Skardal A, Smith L, Bharadwaj S, Atala A, Soker S and Zhang Y. Tissue specific synthetic ECM hydrogels for 3-D in vitro maintenance of hepatocyte function. *Biomaterials* 33 (2012) 4565–4575.

Vasanthan KS, Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Role of biomaterials, therapeutic molecules and cells for hepatic tissue engineering. *Biotechnol. Adv* 30 (2012) 742–752.

