

อิทธิพลของพอลิแอลแลกติกแอซิดที่มีต่อโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน เพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

Influence of Poly-L-Lactic Acid to Gelatin Scaffold for Tissue Engineering Applications

ฟ้าใส วิวัฒน์วงศ์วนา¹, ณัฐวิทย์ พรหมมา², ฤทธิชัย สังขทิพย์³
และ มนัส ศรีสวัสดิ์^{3*}

Fasai Wiwatwongwana¹, Nattawit Promma², Rittichai Sangkatip³
and Manus Sriswat^{3*}

Received: 18 September 2023

Revised: 1 April 2024

Accepted: 10 May 2024

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของการผสมพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน โดยโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และผสมพอลิแอลแลกติกแอซิดที่อัตราส่วนต่าง ๆ โครงสร้างพื้นผิวโดยรวมของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดแบบต่างๆถูกวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM) การผสมพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีลักษณะพื้นผิวโดยรวมเกิดการเกาะกลุ่มรวมกันของโมเลกุลพอลิแอลแลกติกแอซิด ส่งผลให้รูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดเล็กลงเมื่อเพิ่มปริมาณพอลิแอลแลกติกแอซิดในบางอัตราส่วน จากการทดสอบอัตราการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดโดยแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินอัตราการบวมน้ำจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียวผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการผสมพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพโดยส่งผลให้ขนาดรูพรุนโดยรวม

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตขั้นสูง คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย 10330

² Department of Advanced Manufacturing Technology, Faculty of Engineering, Pathumwan Institute of Technology, Bangkok, Thailand 10330

³ ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ ประเทศไทย 50200

² Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

³ สาขาวิชาวิศวกรรมการผลิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย 10330

³ Department of Manufacturing Engineering, Faculty of Engineering, Pathumwan Institute of Technology, Bangkok, Thailand 10330

*ผู้พิมพ์ประสานงาน (Corresponding author) e-mail: manus717171@gmail.com

ของโครงเลี้ยงเซลล์มีขนาดเล็กลง เนื่องจากโมเลกุลของพอลิแอลแลกติกแอซิดที่เคลือบบนพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ และพอลิแอลแลกติกแอซิดยังช่วยทำให้โครงสร้างเจลลาตินมีอัตราการบวมน้ำที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณพอลิแอลแลกติกแอซิด ซึ่งอัตราการบวมน้ำที่สูงขึ้นนี้เหมาะกับการนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

คำสำคัญ: โครงเลี้ยงเซลล์ เจลาติน พอลิแอลแลกติกแอซิด อัตราการบวมน้ำ วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

ABSTRACT

This research was aimed to investigate the influences of poly-L-lactic acid on gelatin scaffold. The gelatin scaffold was fabricated via freeze drying technique and blended with poly-L-lactic acid in different ratios. The surface structure of gelatin/poly-L-lactic acid scaffolds in different conditions was investigated by using Scanning Electron Microscopy (SEM). The poly-L-lactic acid blended on gelatin scaffold demonstrated the molecular structure of poly-L-lactic acid aggregated on gelatin scaffold with decreasing of mean pore size of scaffold structure when increasing of poly-L-lactic acid content in some ratio. The results from swelling test revealed that increasing of poly-L-lactic acid content increased in swelling ratio of gelatin scaffold with significant different when compared with pure gelatin scaffold. These results proved that using poly-L-lactic acid blended with gelatin scaffold changed in morphology of gelatin scaffold and improved its physical properties of the gelatin scaffold with enhanced in swelling properties of gelatin scaffolds which could be applied using in tissue engineering applications.

Keywords: Scaffold; Gelatin; Poly-L-Lactic Acid; Swelling Ratio; Skin Tissue Engineering

บทนำ

การสูญเสียผิวหนังในผู้ป่วยเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น แผลกดทับ แผลเบาหวาน แผลไฟไหม้ และการเกิดอุบัติเหตุ เป็นต้น โดยเมื่อเกิดการสูญเสียผิวหนังในระดับที่ 3 ซึ่งจะทำลายชั้นหนังแท้และหนังกำพร้า โดยผิวหนังไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ทั้งหมด ซึ่งจะกลายเป็นแผลเป็นที่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เหมือนกับเนื้อเยื่อผิวหนังโดยปกติ [1, 2] ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำวัสดุทดแทนผิวหนังหรือโครงเลี้ยงเซลล์มาปลูกถ่ายบริเวณผิวหนังที่เกิดการสูญเสียขึ้น วิทยาศาสตร์การแพทย์ได้มีการประยุกต์ระหว่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อและวัสดุศาสตร์และวิศวกรรมเพื่อใช้ในการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม สำหรับการปลูกถ่ายและการสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะใหม่ ซึ่งการออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ต้องอยู่ในเงื่อนไขที่เหมาะสม เช่น โครงเลี้ยงเซลล์จะต้องมีรูพรุนสูงและขนาดรูพรุนที่เหมาะสมเหมาะกับการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์และการนำส่งสารอาหารที่เพียงพอ มีอัตราการย่อยสลายที่เหมาะสมเพื่อให้สอดคล้องกับอัตราการสร้างของเนื้อเยื่อใหม่ มีโครงสร้างที่มีความแข็งแรงเพื่อรักษาโครงสร้างไว้ได้ในช่วงการปลูกถ่ายและการ

เจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใหม่ และโครงเลี้ยงเซลล์จะต้องไม่เป็นพิษกับเซลล์และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ [3, 4]

คอลลาเจนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการซ่อมแซมและฟื้นฟูเนื้อเยื่อในรูปแบบต่างๆ อย่างไรก็ตามคอลลาเจนมีข้อเสีย เช่น มีค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียม คอลลาเจนบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 มีความชอบน้ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์และยากต่อการปลูกถ่าย [3] เพื่อที่จะแก้ไขปัญหาเหล่านี้ โครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างใหม่ควรมีความแข็งแรงเพียงพอในการปลูกถ่ายเพื่อคงรูปร่างโครงสร้างแบบ 3 มิติ ตามแรงหดตัวของเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตในโครงเลี้ยงเซลล์และแรงบีบอัดจากเนื้อเยื่อโดยรอบ ในงานวิจัยนี้จึงออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างจากเจลาตินและเสริมความแข็งแรงด้วยการผสมกับพอลิแอลแลกติกแอซิดเจลาตินมีราคาถูกกว่าและหาได้ง่ายกว่าคอลลาเจน เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติ สกัดได้จากคอลลาเจนโดยกระบวนการ acidic และ alkaline process และนำมาทำให้บริสุทธิ์ ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นและผ่านขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อโรค จากนั้นจึงทำให้แห้ง โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกนำมาใช้งานทางด้านเภสัชกรรมและทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพและมีสมบัติการเข้ากันได้กับร่างกาย เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยาและอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ [5, 6] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่นำเจลาตินมาทำเป็นเส้นใยนาโนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง โดยการผสมกับ polyvinyl alcohol และ Tannacetum Polycephalum essential oil และมีการเติม Amoxicillin ซึ่งเป็น antibiotic เพื่อใช้ในการรักษาบาดแผลที่ผิวหนัง จากผลการทดลองการเลี้ยงเซลล์พบว่ามีการเจริญเติบโตและแพร่กระจายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ดี และในการทดลองในสิ่งมีชีวิตพบว่าสามารถใช้เส้นใยนาโนคอมโพสิตนี้ในการรักษาบาดแผลในหนูได้ [7] และยังมีงานวิจัยที่ใช้เจลาตินผสมกับ polyvinyl alcohol และอนุภาคนาโน ZnO โดยขึ้นรูปเป็นเส้นใยด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่ผิวหนัง จากผลการทดลองพบว่าเส้นใยคอมโพสิตนี้มีความเข้ากันได้กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีอัตราการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ที่สูงขึ้น และมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี [8]

พอลิแอลแลกติกแอซิดได้มาจากการฟอร์มตัวของสองรูปแบบของไอโซเมอร์ poly (lactic acid): D(-) และ D, L(-) พอลิแอลแลกติกแอซิดเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ปรับปรุงความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ เช่น มีงานวิจัยศึกษาการผสมคอลลาเจนหรือเจลาตินกับโครงตาข่ายพอลิแอลแลกติกแอซิด โดยโครงเลี้ยงเซลล์ผสมนี้มีการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังที่ดี และโครงตาข่ายพอลิแอลแลกติกแอซิดยังช่วยให้โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น และด้วยสมบัติความไม่ชอบน้ำของพอลิแอลแลกติกแอซิดจึงช่วยให้การดูดซับของโปรตีนและการยึดเกาะของเซลล์ ทำให้เหมาะกับการใช้งานเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ [9, 10] มีงานวิจัยที่แสดงว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของพอลิแอลแลกติกแอซิดสามารถใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับการยึดเกาะและการแพร่กระจายของเซลล์คอนไดรโรไซต์หรือเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ได้ ซึ่งเหมาะสำหรับเป็นวัสดุที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก [11] พอลิแอลแลกติกแอซิดยังพบว่าสามารถรองรับเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากเส้นประสาทที่เพาะในเส้นใยพอลิแอลแลกติกแอซิด โดยพบว่ามีการเจริญเติบโตของนิวโรสสำหรับการสร้างเซลล์ประสาทที่เกิดขึ้นใหม่ [12] ได้มีการค้นคว้าการเพาะเซลล์กระดูกอ่อนคอนไดรโรไซต์บนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิแอลแลกติกแอซิด ผลที่ได้แสดงการสร้างคอลลาเจน ไกลโคซามิโนไกลแคน และอีลาสติน ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ [13] มีงานวิจัยที่ได้นำพอลิแอลแลกติกแอซิดผสมกับ polydopamine และนาโนคาร์บอน ขึ้นรูปเป็นเส้นใยด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง ซึ่งการใช้สารพอลิแอลแลกติกแอซิดนี้ช่วยในการปรับปรุงโครงสร้างพื้นผิวและมีความเข้ากันได้กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ [14] นอกจากนี้การขึ้นรูปแบบ 3D printing ที่

มีการผสมระหว่างพอลิแลคติกแอซิดและ poly (L-lactide-co-caprolactone) จากผลการทดลองพบว่า การเติมพอลิแลคติกแอซิดช่วยปรับปรุงสมบัติทางกล มีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์และมีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่รวดเร็วโดยที่โครงสร้างยังคงอยู่ [15] ซึ่งทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะปรับปรุงความแข็งแรงของโครงสร้างโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยพอลิแลคติกแอซิดเพื่อลดต้นทุนของการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์และทำให้โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงที่เหมาะสมกับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

วิธีดำเนินการวิจัย

ทางผู้วิจัยได้ออกแบบและระบุขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัยเพื่อผลิตวัสดุทดแทนผิวหนัง และการทดสอบลักษณะสมบัติของวัสดุเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

1. วัตถุดิบและเคมีภัณฑ์

เจลาติน (Gelatin) ชนิด A ประเภท reagent grade สกัดจากหนังหมู มี bloom number อยู่ในช่วง 240-270 pH 4.5-5.5 ที่ 25 องศาเซลเซียส ความหนืดอยู่ในช่วง 3.5-4.5 cps ความเข้มข้นน้อยกว่า 12% ยี่ห้อ BIO BASIC INC, Canada พอลิแลคติกแอซิด (Poly-L-lactic acid) มีค่าความหนืดที่ 4.0 dL/g, 0.1 % (w/v) ในคลอโรฟอร์ม (25 องศาเซลเซียส) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) 99.5% AR/ACS ยี่ห้อ Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate Buffer Saline (PBS)) ยี่ห้อ BIO BASIC INC, Canada

2. วิธีการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแลคติกแอซิด

การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแลคติกแอซิดในอัตราส่วนต่างๆสามารถทำได้โดยเตรียมสารละลายเจลาติน 0.8 wt.% (w/w) โดยผสมเจลาตินกับน้ำปราศจากไอออนหรือ DI (deionized water) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินบวมตัวในน้ำ DI และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคัดสารละลายเจลาตินใส่ในจานเพาะเชื้อที่ทำจากพอลิสไตรีนแบบ 24 หลุม หลุมละ 1 มิลลิลิตร และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสอย่างต่ำ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นงานไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ด้วยเครื่องฟรีซดรายที่อุณหภูมิ -105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนต่อไปเป็นการเตรียมสารละลายพอลิแลคติกแอซิด 0.8 mg/ml โดยการผสมพอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน โดยการปั่นกวนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงผสมสารละลายพอลิแลคติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน 0.8 wt.% (w/w) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25 และ 1.5 wt.% (w/w) ในจานเพาะเชื้อแบบแก้วและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วันจนสารละลายพอลิแลคติกแอซิดแห้ง นำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแลคติกแอซิดที่อัตราส่วนต่างๆ ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสอย่างต่ำ 6 ชั่วโมง จากนั้นทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งอีกครั้งด้วยเครื่องฟรีซดรายที่อุณหภูมิ -105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยหาลำดับโครงเลี้ยงเซลล์ตามสัดส่วนต่างๆ ของเจลาติน/พอลิแลคติกแอซิดแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Code name of gelatin/poly-L-lactic acid scaffolds at different ratios

Code name	Concentration of poly-L-lactic acid (wt.% (w/w))
G100	0
GP1	0
GP2	0.5
GP3	0.75
GP4	1
GP5	1.25
GP6	1.5

3. การทดสอบลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

เมื่อได้โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการขึ้นรูปด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จึงนำโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดมาทำการทดสอบลักษณะสมบัติดังต่อไปนี้

3.1 โครงสร้างพื้นผิวโดยรวม

พิจารณาโครงสร้างพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์โดยรวมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope (SEM)) พิจารณาลักษณะพื้นผิวโครงเลี้ยงเซลล์ช่วงกลางโครงสร้างตามแนวขวาง ซึ่งทำการตัดโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้ใบมีดผ่าตัด

3.2 ขนาดของรูพรุน

ขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ส่งผลต่อการเคลื่อนที่และการกระจายตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทั่วไปเมื่อขนาดของรูพรุนเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ความแข็งแรงทางโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง [16] การหาขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Kang และคณะ [17] โดยวัดขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์แต่ละเงื่อนไข 30 รูพรุนแบบสุ่มและนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.3 อัตราการบวมน้ำ

อัตราการบวมน้ำ (swelling ratio) ของโครงเลี้ยงเซลล์มีความสำคัญในเรื่องของการดูดซับของเหลวภายในร่างกาย การเคลื่อนที่ของสารอาหารสำหรับเซลล์และกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งการทดสอบอัตราการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Mao และคณะ [18] โดยคำนวณได้จากผลต่างของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ น้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ที่แห้งสนิทในสารละลาย PBS buffer ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นซับโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองด้านด้วย 10 วินาทีด้วย Kimwipe paper และชั่งน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ทันทีที่จะได้เป็นค่าน้ำหนักเปียกของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยสามารถคำนวณอัตราการบวมน้ำได้จากสูตรดังนี้

$$\text{swelling ratio} = \frac{W_{so} - W_o}{W_o}$$

โดย W_{so} เป็น น้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากที่ถูกดูดซับน้ำ

W_o เป็น น้ำหนักเริ่มต้นของโครงเลี้ยงเซลล์

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในทุกการทดสอบจะมีการทำซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้งและมีการเปรียบเทียบความแตกต่างเป็นคู่โดยใช้ T-test ที่ระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ โดยใช้ผลการทดลองจากโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาตินเพียงอย่างเดียวเป็นตัวเปรียบเทียบ

ผลการวิจัย

จากการทดสอบลักษณะสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ลักษณะรูปร่างโดยรวมของโครงเลี้ยงเซลล์ โครงสร้างพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ และอัตราการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์โดยได้ผลจากการทดสอบเป็นดังนี้

1. ลักษณะรูปร่างโดยรวมของโครงเลี้ยงเซลล์

โครงเลี้ยงเซลล์เจลลาติน 0.8 wt.% (w/w) ที่ขึ้นรูปจากเจลลาตินชนิด A ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แสดงดังรูปที่ 1 และโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาติน 0.8 wt.% (w/w) ที่ผสมสารละลายพอลิแอลแลกติกแอซิด ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25 และ 1.5 wt.% (w/w) จากการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและบรรจุในหลอดทดลองเพื่อกันความชื้นแสดงดังรูปที่ 2 โดยเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย ความหนาเฉลี่ยและปริมาตรเฉลี่ย ($n=5$) ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ 2 โครงเลี้ยงเซลล์เจลลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดในเงื่อนไขต่างๆ มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย ความหนาเฉลี่ยและปริมาตรเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ในทุกเงื่อนไขมีความหนาเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.58 ± 0.36 mm ถึง 5.25 ± 0.10 mm มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 12.30 ± 1.07 mm ถึง 14.33 ± 0.13 mm และปริมาตรเฉลี่ยอยู่ในช่วง 56.47 ± 8.60 mm³ ถึง 71.62 ± 0.58 mm³



Figure 1 Gelatin scaffold 0.8 wt.% (w/w)



Figure 2 Example of gelatin/poly-L-lactic acid at different ratios

Table 2 Average thickness diameter and volume of gelatin/poly-L-lactic acid scaffolds at different ratios

Scaffolds	Average thickness (mm)	Average diameter (mm)	Average volume (mm ³)
G100	5.10 $\pm$ 0.14	13.95 $\pm$ 0.33	71.17 $\pm$ 3.42
GP1	5.25 $\pm$ 0.10	12.85 $\pm$ 0.62	67.42 $\pm$ 2.21
GP2	5.00 $\pm$ 0.08	14.33 $\pm$ 0.13	71.62 $\pm$ 0.58
GP3	5.23 $\pm$ 0.19	13.15 $\pm$ 0.31	68.68 $\pm$ 1.85
GP4	4.75 $\pm$ 0.10	13.80 $\pm$ 0.32	65.57 $\pm$ 2.79
GP5	4.73 $\pm$ 0.25	13.93 $\pm$ 0.10	65.78 $\pm$ 3.17
GP6	4.58 $\pm$ 0.36	12.30 $\pm$ 1.07	56.47 $\pm$ 8.60

2. โครงสร้างพื้นผิวโดยรวม

ลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดในทุกเงื่อนไขถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOLJSM-5910LV Scanning Electron Microscope) โดยในการวิเคราะห์ได้นำโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิด ที่ความเข้มข้นพอลิแอลแลกติกแอซิดต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 wt.% (w/w) ให้สัญลักษณ์เป็น GP1, GP2, GP3, GP4, GP5, GP6 ตามลำดับซึ่งถูกนำมาตัดโครงสร้างตามขวางด้วยใบมีด เพื่อศึกษาลักษณะช่วงกลางโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์รวมทั้งโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียว (G100) ซึ่งใช้น้ำ DI เป็นตัวทำละลายเจลาติน ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ในทุกเงื่อนไขถูกวิเคราะห์โดยใช้กำลังขยายที่ 60x และค่าแรงดันเร่ง 20 kV หลังจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ลักษณะพื้นผิวโดยรวมของโครงสร้างภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์แสดงในรูปที่ 3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง

กราฟแสดงโครงสร้างแบบรูพรุนที่ต่อเนื่องและเป็นเนื้อเดียวกันของโครงเลี้ยงเซลล์ในทุกเงื่อนไข โดยความเข้มข้นของพอลิแอลแลกติกแอซิดมีอิทธิพลต่อโครงสร้างโดยรวมของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน โดยโครงเลี้ยง

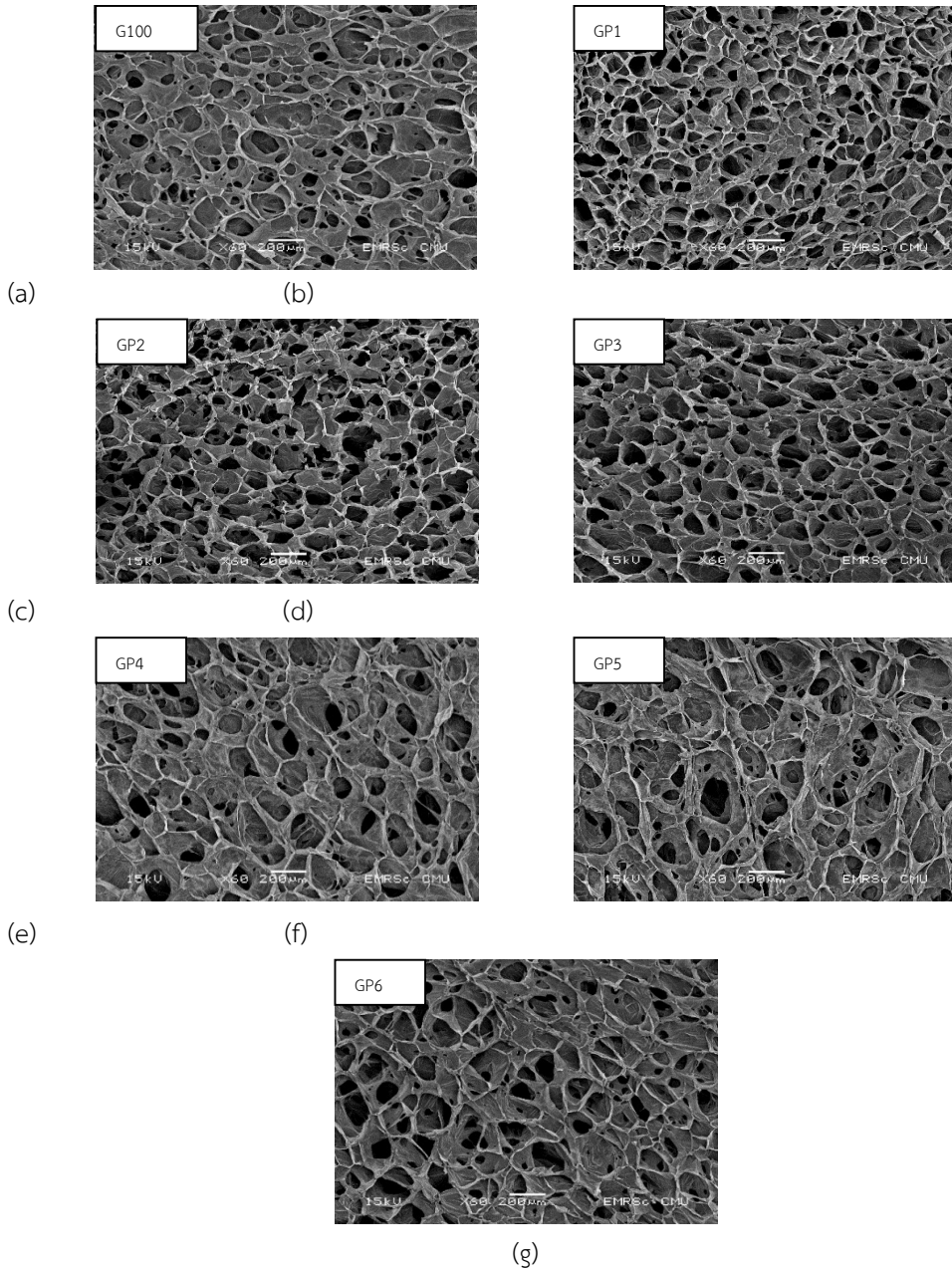


Figure 3 SEM images of gelatin/poly-L-lactic acidscaffolds at different ratios
(a) G100 (b) GP1 (c) GP2 (d) GP3 (e) GP4 (f) GP5 (g) GP6

เซลล์ GP1, GP2 และ GP3 มีลักษณะโครงสร้างที่มีความพรุนสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ G100, GP4 และ GP5 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างผนังรูพรุนที่คล้ายกับแผ่นเมมเบรน ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณของพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน ส่งผลให้มีโมเลกุลของพอลิแอลแลกติกแอซิดยึดเกาะที่ผนังโครงสร้างมากขึ้น

3. ขนาดรูพรุน

จากการวิเคราะห์ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิด ด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 30 รูแบบสุ่ม พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 109.19 μm ถึง 165.37 μm แสดงดังรูปที่ 4 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง โดยขนาดรูพรุนควรอยู่ในช่วง 100 μm ถึง 200 μm เพื่อให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถยึดเกาะ เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนควรมีขนาดใหญ่กว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ [19] โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่มีการผสมพอลิแอลแลกติกแอซิดที่ 0, 0.5 และ 0.75 wt.% (w/w) (GP1, GP2, GP3) มีขนาดรูพรุนที่ต่ำกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีขนาดรูพรุนที่ $109.19 \pm 12.09 \mu\text{m}$, $126.01 \pm 11.10 \mu\text{m}$ และ $132.29 \pm 10.63 \mu\text{m}$ ตามลำดับ ขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยที่ $155.00 \pm 12.32 \mu\text{m}$ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพอลิแอลแลกติกแอซิดที่ 1 และ 1.25 wt.% (w/w) (GP4 และ GP5) พบว่าขนาดรูพรุนมีขนาดใหญ่กว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเป็น $165.37 \pm 12.61 \mu\text{m}$ และ $164.87 \pm 12.03 \mu\text{m}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในเรื่องของขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยอยู่ในช่วง $130.21 \pm 36.17 \mu\text{m}$ ถึง $180 \pm 35.74 \mu\text{m}$ ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่ผสมพอลิแอลแลกติกแอซิดมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองแบบนี้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นวัสดุปิดแผลในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง [20] ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิด แสดงในตารางที่ 3

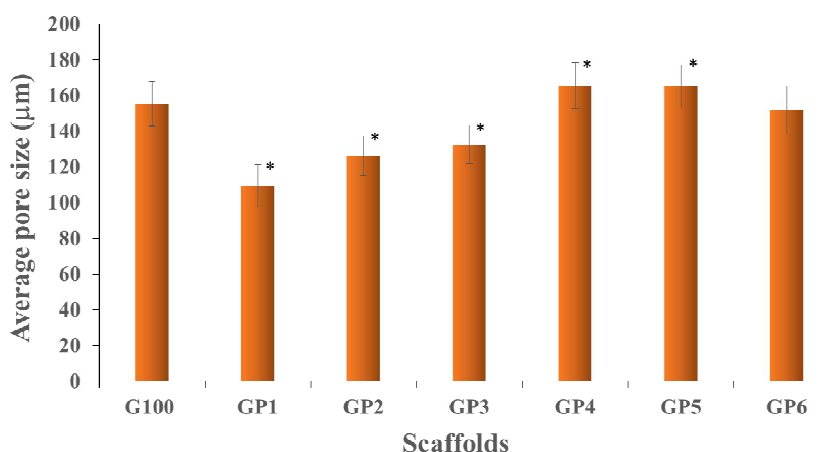


Figure 4 Average pore size of gelatin/poly-L-lactic acid scaffolds at different ratios (n=30)
(*significant different $p < 0.05$ relative to G100)

Table 3 Average pore size of gelatin/poly-L-lactic acid scaffolds at different ratios

Scaffolds	Average pore size (μm)
	Mean $\pm$ SD
G100	155.00 $\pm$ 12.32
GP1	109.19 $\pm$ 12.09
GP2	126.01 $\pm$ 11.10
GP3	132.29 $\pm$ 10.63
GP4	165.37 $\pm$ 12.61
GP5	164.87 $\pm$ 12.03
GP6	151.89 $\pm$ 13.48

4. อัตราการบวมน้ำ

จากการทดสอบอัตราการบวมน้ำโดยการแช่โครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิด ในสารละลาย PBS buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและซับน้ำด้วยกระดาษไร้ใย โดยตัวอย่างการแช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน PBS buffer ที่เวลา 0 ชั่วโมงและ 2 ชั่วโมงแสดงดังรูปที่ 5 (a) และ 5 (b) ตามลำดับ และตัวอย่างการซับน้ำโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกระดาษไร้ใยแสดงดังรูปที่ 6

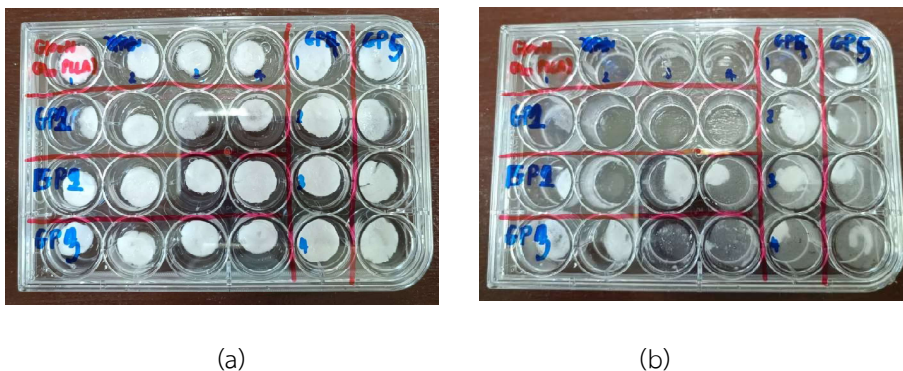
**Figure 5** Immersing of gelatin/poly-L-lactic acid in PBS buffer at different time (a) 0 h (b) 2 h



Figure 6 Absorbing of PBS buffer from scaffold with kimwipe paper

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณพอลิแอลแลกติกแอซิดที่ 0.5, 0.75, 1, 1.25 และ 1.5 wt.% (w/w) (GP2, GP3, GP4, GP5 และ GP6) ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้นที่ 3.12 ± 0.73 , 2.08 ± 0.59 , 2.34 ± 0.15 , 5.66 ± 0.25 และ 18.80 ± 0.38 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงในรูปที่ 7 โดยโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียวและเจลาตินที่ผสมกับพอลิแอลแลกติกแอซิดที่ 0 wt.% (w/w) และใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนไม่สามารถดูดซับน้ำได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ละลายใน PBS buffer ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์ GP6 มีค่าการดูดซับน้ำดีที่สุด ซึ่งเหมาะกับการนำไปใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนังเนื่องจากสามารถดูดซับของเหลวได้ปริมาณมาก เหมาะสำหรับการส่งถ่ายสารอาหารให้กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อเจริญเติบโตกลายเป็นเนื้อเยื่อใหม่ [19] อัตราการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่มีการเติมพอลิแอลแลกติกแอซิดนี้มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 18.80 ± 0.38 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินผสมกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสแบบเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิมิ้อัตราการดูดซับน้ำอยู่ในช่วง 10.55 ± 1.26 ถึง 34.96 ± 1.81 ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่มีการเติมพอลิแอลแลกติกแอซิดมีอัตราการดูดซับน้ำอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่า โดยอัตราการดูดซับน้ำสามารถเพิ่มขึ้นได้โดยใช้การเชื่อมโยงพันธะในโครงเลี้ยงเซลล์ให้พันธะที่แข็งแรงขึ้น เช่น การเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิจึงและการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี [21, 22] อัตราการดูดซับน้ำเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดแสดงในตารางที่ 4

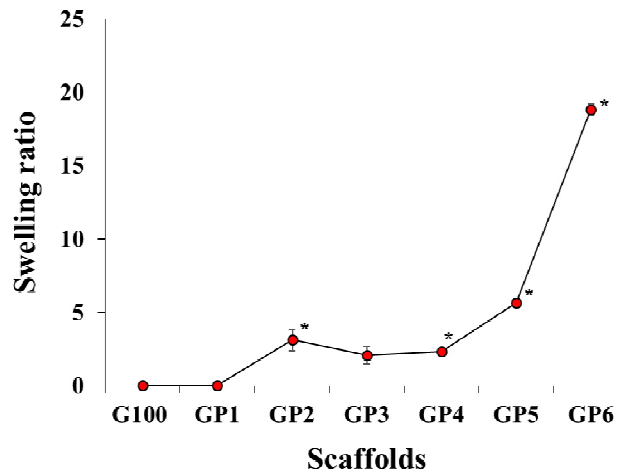


Figure 7 Average swelling ratio of gelatin/poly-L-lactic acid at different ratios (n=4)

(*significant different $p < 0.05$ compared with G100)

Table 4 Average swelling ratios of gelatin/poly-L-lactic acid at different ratios

Scaffolds	Average swelling ratio
	Mean $\pm$ SD
G100	-
GP1	-
GP2	3.12 ± 0.73
GP3	2.08 ± 0.59
GP4	2.34 ± 0.15
GP5	5.66 ± 0.25
GP6	18.80 ± 0.38

นอกจากนี้ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้เป็นปริมาณพอลิแอลแลกติกแอซิดที่ใช้ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน ถ้าปริมาณพอลิแอลแลกติกแอซิดน้อยเกินไปอาจจะไม่ส่งผลกระทบต่อโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน งานวิจัยในอนาคตอาจมีการเพิ่มปริมาณพอลิแอลแลกติกแอซิดให้มากขึ้นเพื่อจะได้เห็นผลที่แตกต่างที่ชัดเจนมากขึ้น นอกจากนั้นการใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น trifluoroethanol และ dioxane ในการละลายพอลิแอลแลกติกแอซิดก็สามารถนำผลการทดสอบเหล่านี้มาเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนได้ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกันออกไป

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาอิทธิพลของพอลิแอลแลกติกแอซิดที่มีต่อโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินด้วยการผสมพอลิแอลแลกติกแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและมีการเปรียบเทียบผลการทดลองกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองที่ได้แสดงถึงโครงสร้างพื้นผิวโดยรวม ขนาดรูพรุนและอัตราการบวมน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบต่างๆ ของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของพอลิแอลแลกติกแอซิดมีอิทธิพลต่อสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน โดยโครงเลี้ยงเซลล์ GP1, GP2 และ GP3 มีลักษณะโครงสร้างที่มีความพรุนสูงกว่า โครงเลี้ยงเซลล์ G100, GP4 และ GP5 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างผนังรูพรุนที่คล้ายกับแผ่นเมมเบรน อย่างไรก็ตามโครงสร้างหน้าตัดภายในช่วงกลางโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดในทุกเงื่อนไขและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียวมีโครงสร้างที่มีความต่อเนื่องของรูพรุนและเป็นเนื้อเดียวกัน โดยที่เมื่อความเข้มข้นของพอลิแอลแลกติกแอซิดเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีโมเลกุลของพอลิแอลแลกติกแอซิดเกาะกลุ่มกันที่ผนังโครงสร้างโครงเลี้ยงเซลล์มากขึ้น

ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดแบบต่างๆ อยู่ในช่วง $109.19 \pm 12.09 \mu\text{m}$ ถึง $165.37 \pm 12.61 \mu\text{m}$ การเติมพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินส่งผลให้ขนาดรูพรุนเล็กลงในบางอัตราส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการเกาะกลุ่มกันของโมเลกุลพอลิแอลแลกติกแอซิด ซึ่งจะพบได้ในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดที่ GP1, GP2 และ GP3 โดยที่โครงเลี้ยงเซลล์ GP1 แสดงขนาดรูพรุนต่ำสุดที่ $109.19 \pm 12.09 \mu\text{m}$ และโครงเลี้ยงเซลล์ GP4 แสดงขนาดรูพรุนที่ใหญ่ที่สุดที่ $165.37 \pm 12.61 \mu\text{m}$ โดยที่ขนาดรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียวมีขนาดรูพรุนอยู่ที่ $155.00 \pm 12.32 \mu\text{m}$

ในส่วนของการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์โดยการแช่ในสารละลาย PBS buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน/พอลิแอลแลกติกแอซิดมีอัตราการดูดซับน้ำอยู่ในช่วง 0 ถึง 18.80 ± 0.38 อย่างไรก็ตามการเติมพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินช่วยเพิ่มอัตราการดูดซับน้ำในทุกอัตราส่วน โดยเห็นได้ชัดในโครงเลี้ยงเซลล์ GP2, GP3, GP4, GP5 และ GP6 โดยอัตราการดูดซับน้ำสูงสุดพบที่โครงเลี้ยงเซลล์ GP6 ซึ่งมีอัตราการดูดซับน้ำที่ 18.80 ± 0.38 โดยอาจเกิดจากสมบัติที่ไม่ชอบน้ำของพอลิแอลแลกติกแอซิดมีส่วนทำให้เกิดการต้านทานการย่อยสลายในสารละลาย PBS ส่งผลให้มีอัตราการดูดซับน้ำที่สูงขึ้น ซึ่งเหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนังในการส่งถ่ายสารละลายและอาหารไปยังเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อใหม่ อย่างไรก็ตามโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียวและโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินที่ผสมกับพอลิแอลแลกติกแอซิดที่ 0 wt.% (w/w) ไม่สามารถดูดซับน้ำได้

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมสารพอลิแอลแลกติกแอซิดในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินมีส่วนช่วยในการปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ให้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินเพียงอย่างเดียว โดยการเติมสารพอลิแอลแลกติกแอซิดในบางอัตราส่วนในโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินจะช่วยเพิ่มสมบัติทางกายภาพในเรื่องของโครงสร้างพื้นผิวโดยรวม ความต่อเนื่องของรูพรุน โครงสร้างและรูพรุนที่เป็นเนื้อเดียวกันและการดูดซับน้ำที่ดีขึ้น จากผลสรุปนี้สามารถนำโครงเลี้ยงเซลล์พอลิแอลแลกติกแอซิดผสมกับ

เจลลาตินไปประยุกต์ในใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังได้ เช่น การใช้รักษาแผลไฟไหม้ โรคผิวหนังและการบาดเจ็บที่ผิวหนัง

จากผลการทดลองนี้สามารถนำงานวิจัยนี้ไปต่อยอดงานวิจัยในอนาคตได้ เช่น การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้อัตราส่วนอื่นของพอลิแอลแลกติกแอซิดและเจลลาติน การใช้วัสดุผสมชนิดอื่น เช่น โคลิโซาน polylactic-co-glycolic acid และ polyethylene glycol ในการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ การวิเคราะห์สมบัติการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ รวมถึงการทดสอบเลี้ยงเซลล์ไฟโบรลัสต์ภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย เพื่อวิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ไฟโบรลัสต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถนำผลการทดสอบเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้งานจริงด้านการแพทย์ได้ดียิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

อิทธิพลของความเข้มข้นพอลิแอลแลกติกแอซิดต่างๆ ที่ผสมในโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาติน ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลลาตินในเงื่อนไขต่างๆ ได้มีการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้แล้ว ในการทดสอบต่อไปที่ควรจะนำมาพิจารณา เช่น การใช้เทคนิคการเชื่อมโยงพันธะโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้อุณหภูมิหรือการใช้สารเคมี เช่น 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) และ N-hydroxy succinimide (NHS) ก็เป็นที่ยอมรับใช้เป็นสารเชื่อมโยงพันธะในงานด้านวัสดุทดแทนผิวหนัง นอกจากนี้การวิเคราะห์สมบัติทางกลและการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาทำนายพฤติกรรมทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถวิเคราะห์สมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสมบัติเหล่านี้มีความจำเป็นจะต้องทำการทดสอบก่อนมาใช้งานจริงในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

References

- [1] Mazaher, G., et al. (2018). 3D Protein-Based Bilayer Artificial Skin for the Guided Scarless Healing of Third-Degree Burn Wounds in Vivo. *Biomacromolecules*, 19(7), 2409-2422.
- [2] Shahriari-Khalaji, M., et al. (2023). Angiogenesis, Hemocompatibility and Bactericidal Effect of Bioactive Natural Polymer-Based Bilayer Adhesive Skin Substitute for Infected Burned Wound Healing. *Bioactive Materials*, 29, 177-195.
- [3] Gelse, K., et al. (2003). Collagens-Structure, Function, and Biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1531-1546.
- [4] Mondschein, R. J., et al. (2017). Polymer Structure-Property Requirements for Stereolithographic 3D Printing of Soft Tissue Engineering Scaffolds. *Biomaterials*, 140, 170-188.
- [5] Hong, S. R., et al. (2001). Study on Gelatin-Containing Artificial Skin IV: A Comparative Study on the Effect of Antibiotic and EGF on Cell Proliferation During Epidermal Healing. *Biomaterials*, 22(20), 2777-2783.
- [6] Young, S., et al. (2005). Gelatin as a Delivery Vehicle for Thecontrolled Release of Bioactive Molecules. *Journal of controlled Release*, 109(1-3), 256-274.
- [7] Soleiman-Dehkordi, E., et al. (2024). Multilayer PVA/Gelatin Nanofibrous Scaffolds Incorporated with *Tanacetum polycephalum* Essential Oil and Amoxicillin for Skin Tissue Engineering

-
- Application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 262(1), 129931.
- [8] Nasiri, G., et al. (2022). Fabrication and Evaluation of Poly(vinyl alcohol)/Gelatin Fibrous Scaffold Containing ZnO Nanoparticles for Skin Tissue Engineering Applications. *Materials Today Communications*, 33, 104476.
- [9] Hongxu, L., et al. (2012). PLLA–Collagen and PLLA–Gelatin Hybrid Scaffolds with Funnel-Like Porous Structure for Skin Tissue Engineering. *Science and Technology of Advanced Materials*, 13(6), 064210.
- [10] Aswathy, R.G., et al. (2020). Collagen-Functionalized Electrospun Smooth and Porous Polymeric Scaffolds for the Development of Human Skin-Equivalent. *RSC Advances* 10, 26594–26603.
- [11] Ishaug-Riley, S. L., et al. (1999). Human Articular Chondrocyte Adhesion and Proliferation on Synthetic Biodegradable Polymer Films. *Biomaterials*, 20(23-24), 2245–2256.
- [12] Yang, F., et al. (2004). Fabrication of Nanostructured Porous PLLA Scaffold Intended for Nerve Tissue Engineering. *Biomaterials*, 25(10), 1891–1900.
- [13] Park, S. S., et al. (2004). Characteristics of Tissue-Engineered Cartilage from Human Auricular Chondrocytes. *Biomaterials*, 25(12), 2363–2369.
- [14] Ramasamy, M. S., et al. (2022). Combination of Polydopamine and Carbon Nanomaterials Coating Enhances the Piezoelectric Responses and Cytocompatibility of Biodegradable PLLA Nanofiber Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Materials Today Communications*, 33, 104659.
- [15] Duan, R., et al. (2022). The Effect of Blending Poly (L-lactic acid) on *in vivo* Performance of 3D-Printed Poly (L-lactic-co-caprolactone)/PLLA Scaffolds. *Biomaterials Advances*, 138, 212948.
- [16] Karageorgiou, V. & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491.
- [17] Kang, H. W., et al. (1999). Fabrication of Porous Gelatin Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials*, 20(14), 1339-1344.
- [18] Mao, J. S., et al. (2003). Structure and Properties of Bilayer Chitosan-Gelatin Scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067-1074.
- [19] John, P. F., et al. (2007). *Tissue Engineering*. New York: CRC Press.
- [20] Wiwatwongwana, F. & Promma, N. (2019). Characterization of Gelatin-Carboxymethylcellulose Scaffolds. *International Journal of Materials, Mechanics and Manufacturing*, 7(1), 12-15.
- [21] Wiwatwongwana, F. & Surin, P. (2019). *In Vitro* Degradation of Gelatin/Carboxymethylcellulose Scaffolds for Skin Tissue Regeneration. *Chemical Engineering Transactions*, 74, 1555-1559.

Research Article

Journal of Advanced Development in Engineering and Science

Vol. 14 • No. 40 • May – August 2024

- [22] Chaijit, S. & Wiwatwongwana, F. (2020). Strengthening Scaffold by Using Carbodiimide Crosslinking on Gelatin/Carboxymethylcellulose from Waste Product. *Chemical Engineering Transactions*, 80, 331-336.