



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนน

The Biocompatibility of a Three-Dimensional Acemannan Scaffold

รวิสุต จรรยพงษ์ (Rawisoot Janyapong)¹ พศุธา ฐัญญะกิจไพศาล (Pasutha Thunyakitpisal)²วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ (Wanpen Tachaboonyakiat)³

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนน อะซีแมนแนนจะถูกเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีแมนแนน: กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 และใช้โซเดียมคลอไรด์ (ขนาดอนุภาค 250-450 ไมครอน) เป็นสารทำให้เกิดรูพรุน และนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา นำโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนแบบไปทดสอบกับเซลล์เอสทีทู (ST2) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ไม่เคลือบกันหลุมด้วยสารที่สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลุมที่ไม่มีโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนเป็นกลุ่มควบคุม การวัดอัตราการทำงานของเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที พบว่าจำนวนเซลล์จากกลุ่มควบคุม และจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนที่ถูกเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีแมนแนน: กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 เป็นเวลา 3 วัน มีจำนวนเซลล์ $4,283.53 \pm 194.06$, $23,402.97 \pm 11,159.98$, $55,560.09 \pm 1,548.24$ และ $71,481.11 \pm 2,059.32$ ตามลำดับ และจำนวนเซลล์จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน มีจำนวนเซลล์ $5,853.72 \pm 410.81$, $55,496.25 \pm 6,957.54$, $95,289.18 \pm 646.87$ และ $137,840.4 \pm 1013.12$ ตามลำดับ โดยจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซลในอัตราส่วนอะซีแมนแนน: กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล มีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซลในอัตราส่วนอะซีแมนแนน: กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล มีจำนวนเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับระหว่างกลุ่มทดลอง ($p < 0.05$) และจำนวนเซลล์เอสทีทูของทุกกลุ่มที่เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 7 วัน มีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: อะซีแมนแนน โครงร่าง 3 มิติ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ การเชื่อมขวางโมเลกุล

1 นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย nneeww_ww@hotmail.com

2 ศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยาศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย pthunyak@yahoo.com

3 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย wtachaboonyakiat@yahoo.com



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

Abstract

The aim of this study is to determine the biocompatibility of acemannan scaffold. Acemannan powder was cross-linked with adipic acid and carbonyldiimidazole in 1:1:1, 1:1:2 and 1:1:3 molar ratio. Sodium chloride (250-450 micron particle size) was added into the mixture as porogen. After incubated at 37 °C for 48 hours, the reaction was soaked in copious distilled water to remove porogen and then freeze-dried for 72 hours forming a scaffold. All of the scaffold was sterilization by gamma rays. For biocompatibility test, the scaffolds were incubated with stroma cell line, ST2, for 3- and 7-days. For negative control, non-coated plate was used during incubation. Cell viability was determined by MTT biochemical assay. Acemannan scaffold exhibited biocompatibility when incubated with ST2 cells. The number of cells for negative control, 1:1:1, 1:1:2, and 1:1:3 molar ratio formulation were $4,283.53 \pm 194.06$, $23,402.97 \pm 11,159.98$, $55,560.09 \pm 1,548.24$ and $71,481.10 \pm 2,059.32$ for 3 days and The number of cells for negative control, 1:1:1, 1:1:2, and 1:1:3 molar ratio formulation for 7 days were $5,853.72 \pm 410.81$, $55,496.25 \pm 6,957.54$, $95,289.18 \pm 646.87$ and $137,840.36 \pm 1,013.12$ respectively. Significant differences were found between the three experiment groups when compared with the negative control ($p < 0.05$). Significant differences were found among the three experiment groups when compared with another experiment groups and significant differences between 3 days and 7 days were found among negative control, 1:1:1, 1:1:2, and 1:1:3 molar ratio formulation ($p < 0.05$).



Keywords: Acemannan, Biocompatibility, Chemical crosslink, Scaffold



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

บทนำ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) มีวัตถุประสงค์เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่สูญเสียหรือบาดเจ็บ เป็นการประยุกต์หลักการทางด้านวิศวกรรมและชีววิทยาเข้าด้วยกัน โดยมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญคือ เซลล์ โครงร่าง (scaffold) สำหรับให้เซลล์ยึดเกาะ และสารชีวโมเลกุลที่ช่วยสนับสนุนการยึดเกาะ เพิ่มจำนวน และการพัฒนาของเซลล์ที่เหมาะสม

โครงร่าง (scaffold) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการทำหน้าที่เป็นโครงร่างชั่วคราวเพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ โดยเซลล์จำเป็นต้องมีโครงร่างเพื่อยึดเกาะ จากนั้นเซลล์จะมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน และมีการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์จนกระทั่งเนื้อเยื่อเกิดการฟื้นฟูสภาพและเกิดการเจริญทดแทนชิ้นใหม่อย่างสมบูรณ์ ซึ่งวัสดุชีวภาพสำหรับการผลิตเป็นโครงร่างในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เซรามิก พอลิเมอร์สังเคราะห์ และพอลิเมอร์ธรรมชาติ (O'Brien, 2011)

โครงร่างชีวภาพจากเซรามิก เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และไทแรนเคียมฟอสเฟต มีค่า Young's modulus และความแข็งแรงที่สูง มีความยึดหยุ่นต่ำ มีความเหมือนทางเคมีและโครงสร้างกับแร่ธาตุในกระดูก จึงทำให้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูก (Hench, 1998) แต่มีความเปราะสูง และขึ้นรูปเป็นรูปร่างต่าง ๆ ได้ยาก (Wang, 2003) และการควบคุมอัตราการสลายตัวของเซรามิกทำได้ค่อนข้างยาก (Van Landuyt et al., 1995) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การเกิดขึ้นของเนื้อเยื่อเป็นไปได้ไม่ดัดแปลง โครงร่างจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น กรดพอลิแลแลคติก กรดพอลิไกลิโคลิก นำมาผลิตเป็นโครงร่างให้มีรูปร่างต่างๆ ตามต้องการได้ง่าย และสามารถควบคุมการสลายตัวของพอลิเมอร์ได้ด้วยการปรับเปลี่ยนคุณลักษณะโครงสร้างหรือองค์ประกอบของพอลิเมอร์ (Lu et al., 2000; Oh et al., 2003; Rowlands et al., 2007) แต่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่ำทำให้เกิดการยึดเกาะ การแบ่งตัว และการเพิ่มจำนวนเซลล์บนโครงร่างพอลิเมอร์สังเคราะห์เป็นไปได้ยาก รวมถึงมีความเสี่ยงสูงที่ร่างกายจะปฏิเสธวัสดุประเภทนี้ ส่วนโครงร่างจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน แอลจินेट ไซโตซานและน้ำตาล มีการเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีกับเนื้อเยื่อ และยังช่วยให้เกิดการยึดเกาะและการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์รวมถึงมีการสลายตัวทางชีวภาพของพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ดี แต่โครงร่างที่ได้จากพอลิเมอร์ธรรมชาติมีสมบัติเชิงกลที่ค่อนข้างต่ำ และวัสดุธรรมชาติมักจะไม่สม่ำเสมอทางด้านโครงสร้างและองค์ประกอบ (O'Brien, 2011) ดังนั้นการนำพอลิเมอร์ธรรมชาติซึ่งมีการเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีกับเนื้อเยื่อและมีการสลายตัวทางชีวภาพที่ดี มาพัฒนาคุณสมบัติให้ดีขึ้นเพื่อใช้ในงานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ น่าจะส่งผลให้กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อเพื่อทดแทนหรือซ่อมแซมการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่สูญเสียหรือบาดเจ็บเกิดการฟื้นฟูสภาพและเกิดการเจริญทดแทนชิ้นใหม่อย่างสมบูรณ์ได้รวดเร็วขึ้น

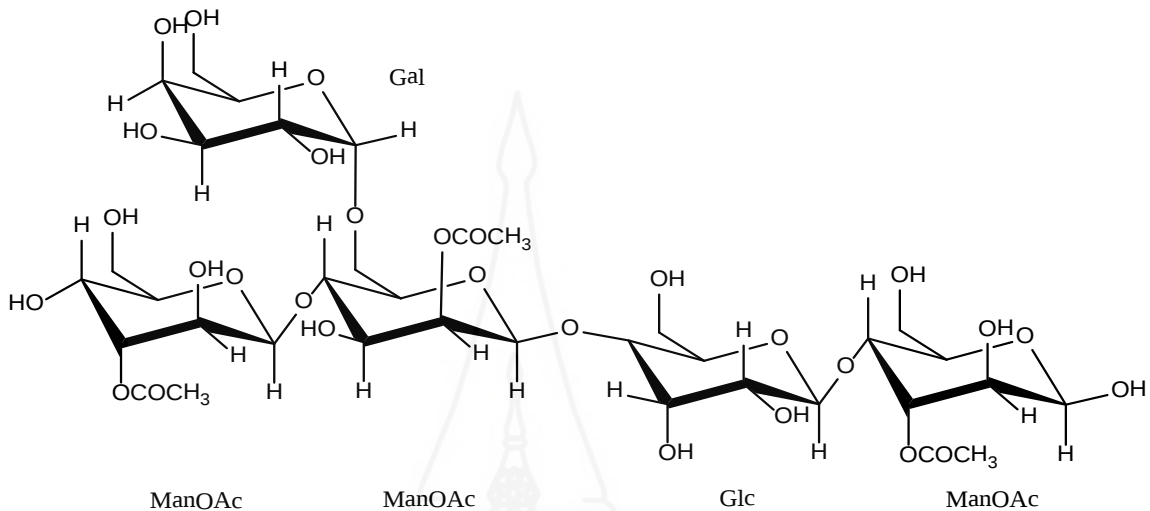
อะซีแมนแนน (Acemannan) เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดส่วนหัวของวุ้นหางจระเข้ มีโครงสร้างทางเคมีเป็นเบต้า (1, 4) - แอซีติลพอลิแมนโนส (Tai-Nin Chow et al., 2005) (รูปที่ 1) โครงสร้างโมเลกุลค่อนข้างเป็นเส้นตรง และมีส่วนประกอบได้แก่ แมนโนส ร้อยละ 77 กลูโคส ร้อยละ 15 และ กาแลคโตส ร้อยละ 5 สารอะซีแมนแนนพบว่าเป็นสารสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน ด้านการอักเสบและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการหายของแผล (Chung, 2003) สามารถกระตุ้นการเกิดการเปลี่ยนสภาพของเส้นใยประสาทนำเข้าที่ยังไม่สมบูรณ์ (immature dendritic cell) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเบื้องต้น (Lec, 2003) นอกจากนี้ยังมี



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

รายงานการวิจัยว่าสามารถนำอะซีแมนแนนมาขึ้นรูปเป็นก้อนขับได้และมีผลเข้ากันได้ดีกับกระดูก (Boonyakul et al., 2012)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของอะซีแมนแนน (Tai-Nin Chow et al., 2005)

แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาการนำอะซีแมนแนนมาพัฒนาเป็นโครงร่างเพื่อใช้ในงานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ การวิจัยในคราวนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่ดีในการนำอะซีแมนแนนมาพัฒนาขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติ ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการนำอะซีแมนแนนมาพัฒนาขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติเพื่อใช้ในงานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลการเชื่อมขวางโมเลกุลอะซีแมนแนนต่อการขึ้นรูปและความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนน
2. เพื่อศึกษาผลทางชีวภาพของโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนต่อการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในห้องปฏิบัติการ



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ขั้นตอนการเตรียมวัสดุและอุปกรณ์

1.1 การสกัดสารอะซีแมนแนน

นำใบว่านหางจระเข้สายพันธุ์ *Aloe barbadensis* Mill. ที่มีความสมบูรณ์ขนาด 6-7 ซม. ล้างให้สะอาดและปอกส่วนเปลือกออกให้หมด จนเหลือส่วนวุ้นแล้วหั่นเป็นชิ้นๆ เพื่อเข้าเครื่องบดละเอียด (homogenizer, Wheaton, USA) จากนั้นทำตามขั้นตอนที่มีรายงานไว้ (Lee et al., 2001) โดยย่อก็คือ ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางความเร็วสูง ที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของเหลวใสมาตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ เพื่อให้ตกตะกอนสมบูรณ์ นำตะกอนที่ได้ผ่านเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilizer, Flexi DryTMMP, USA) เป็นเวลา 24 ชม. ได้อะซีแมนแนนที่แห้ง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดความชื้น (Dessicator, Nikko, Japan) แล้วนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy; IR) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear magnetic resonance; NMR)

1.2 การเตรียมโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนน

นำ อะซีแมนแนน 0.5 กรัม ผสมกับไดเมทิลเอซีทาไมด์ (Dimethylacetamide, Rcilabscac, USA) 15 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดและเติมก๊าซไนโตรเจนลงไป ในขวด ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมกรดอะดิปิก (adipic acid, Fluka, Germany) 0.35 กรัม, ไดเมทิลเอซีทาไมด์ 5 มิลลิลิตร และเติมคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล (Carbonyldiimidazole, Aldrich, Germany) ที่อัตราส่วนอะซีแมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล (mole ratio) ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่องกวนสารละลาย เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเติมโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ขนาดอนุภาคต่างๆ กัน โดยให้ น้ำหนักเป็น 2 เท่าของน้ำหนักของส่วนผสมทั้งหมด คนให้เข้ากันหลังจากนั้น เทลงแม่พิมพ์ซึ่งทำจากพอลิโพรพิลีน ลักษณะเป็นทรงกระบอก สูง 20 มิลลิเมตร ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 17.5 มิลลิเมตร นำไปอบไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบและแช่ในน้ำปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำอะซีแมนแนนเจลที่ได้ไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา

1.3 การเพาะเลี้ยงสโตรมาเซลล์ไลน์ (stroma cell line : ST2)

เซลล์เอสทีทู ได้รับการอนุเคราะห์จาก Prof. Takashi Takata, School of Dentistry, Faculty of Dentistry, Hiroshima University. โดยเซลล์เอสทีทูจะถูกเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง (60 mm culture dish, Nunc, Denmark) ที่มีอาหารเลี้ยงชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco Modified Eagle's Medium) ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ คือ ซีรัม (fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ 10, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, เพนิซิลลิน-จี (penicillin-G) ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอรีซิน บี (amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดได้จาก GIBCO BRL (USA) จากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้อบ



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เริ่มเจริญจนเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ก็จะถูกนำไปหว่าน (subculture) ในจานเพาะเลี้ยงใหม่ (60 mm culture dish, Nunc, Denmark) และเซลล์จะถูกหว่านใหม่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

2. การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์

นำโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนแบบไปทดสอบกับเซลล์เอสทีทู (ST2) โดยนำโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนวางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ไม่เคลือบกันหลุมด้วยสารที่สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์ (Spl, Korea) และหว่านเซลล์เอสทีทูประมาณ 20,000 เซลล์/หลุมลงไป โดยให้มีหลุมที่หว่านเซลล์โดยไม่มีโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนเป็นกลุ่มควบคุม โดยให้อาหารเลี้ยงชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมจากตัวอ่อนโค ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน และ 7 วัน ทดลองซ้ำ 4 ครั้ง จากนั้น วัดอัตราการทำงานของเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีทีซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีอยู่นั่นเอง ดังนั้นหากพบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จะแสดงถึงผลของสารต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่หากพบว่าเซลล์มีจำนวนลดลง จะแสดงถึงความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ที่ทดสอบเทคนิคนี้จึงจัดว่าเป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ได้ด้วย

เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายเอ็มทีทีที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ไม่มีฟีนอลเรดความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที จะเกิดผลึกสีม่วงของฟลิคฟอร์มาซาน (formazan) ที่ก้นหลุม ดูดสารละลายเอ็มทีทีออก แล้วเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาณ 800 ไมโครลิตร เพื่อละลายฟลิคฟอร์มาซาน เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นฟลิคฟอร์มาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวนเพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ทำการวิเคราะห์เชิงสถิติ วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (one-way analysis of variance) หลังจากการวิเคราะห์ด้วยสถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียวข้อมูลจากการศึกษาทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์ต่อด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Dunnett's test ซึ่งกลุ่มทดลองจะถูกเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หรือค่าพี (p value < 0.05) และจะถูกวิเคราะห์ต่อด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan's multiple range Test ซึ่งข้อมูลทุกกลุ่มจะถูกเปรียบเทียบกับกันทั้งหมดที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 หรือค่าพี (p value < 0.05) ส่วนข้อมูลระหว่าง 3 วัน และ 7 วัน จะถูกวิเคราะห์ด้วยการทดสอบทีแบบจับคู่ (paired t-test) ที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 หรือค่าพี (p value < 0.05)



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

แผนผังขั้นตอนการทดลอง





การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ผลการวิจัย

การเตรียมโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนน โดยนำอะซีเมนแนนมาทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล (ซีดีไอ) ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล พบว่าอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล สามารถขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนได้

เพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ไม่เคลือบกันหลุมด้วยสารที่สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลุมที่ไม่มีโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนเป็นกลุ่มควบคุมลบ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษาจากเทคนิคเอ็มทีทีพบว่า เซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล มีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ คิดเป็น 5.5, 12.9 และ 16.6 เท่าของกลุ่มควบคุมลบ และเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล มีจำนวนเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกันระหว่างกลุ่มทดลอง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล มีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ คิดเป็น 9.4, 16.3 และ 23.5 เท่าของกลุ่มควบคุมลบและเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล มีจำนวนเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกันระหว่างกลุ่มทดลอง ส่วนการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนเป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน พบว่าเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3 และในกลุ่มควบคุมลบเป็นเวลา 7 วันมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3 และในกลุ่มควบคุมลบเป็นเวลา 3 วัน ดังแสดงในตารางที่ 1 ,ตารางที่ 2 และรูปที่ 2



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการ เพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับ โครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนน
เป็นเวลา 3 วัน (n=4)

อัตราส่วน	จำนวนเซลล์ (เซลล์)					
อัตราส่วนอะซี	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	$\bar{x}$	S.D.
แมนแนน:กรดอะ						
คิปี:ซีดีไอ						
1:1:1	22,198.43	12,292.44	38,858.63	20,262.36	23,402.97	11,159.98
1:1:2	56,869.63	55,743.93	53,342.46	56,284.34	55,560.09	1,548.24
1:1:3	70,918.26	74,520.46	70,017.71	70,467.98	71,481.10	2,059.32
กลุ่มควบคุม	4,052.47	4,277.09	4,527.46	4,277.09	4,283.52	194.06

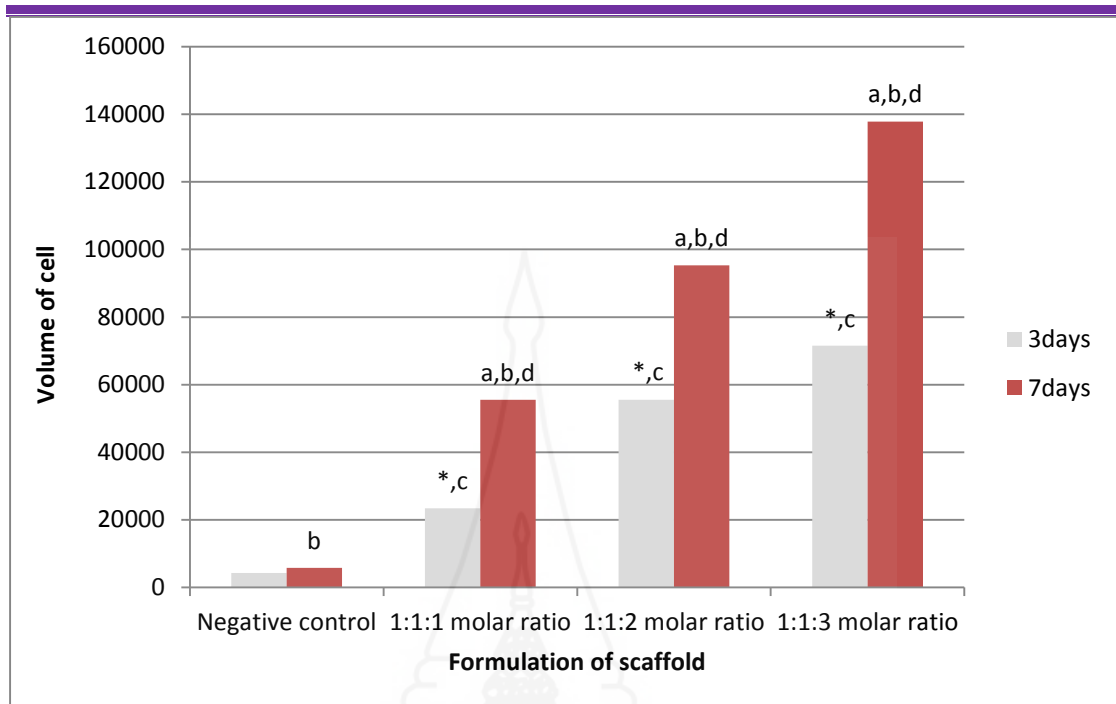
ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการ เพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับ โครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนน
เป็นเวลา 7 วัน (n=4)

อัตราส่วน	จำนวนเซลล์					
อัตราส่วนอะซี	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	$\bar{x}$	S.D.
แมนแนน:กรดอะ						
คิปี:ซีดีไอ						
1:1:1	51,781.59	49,980.09	54,708.34	65,514.96	55,496.25	6,957.54
1:1:2	94,782.42	96,133.65	94,782.42	95,458.23	95,289.18	646.87
1:1:3	137,784.10	138,459.50	138,684.60	136,433.23	137,840.40	1,013.12
กลุ่มควบคุม	6,078.70	6,303.84	5,403.92	5,628.43	5,853.72	410.81



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference



ภาพที่ 2 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับ โครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนเป็นเวลา 3 วันและ 7 วันผลแสดงจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอมาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวน แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย

(* = แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, a = แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, b = แตกต่างจากกลุ่มอัตราส่วนอะซีเมนแนน: กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดออกไซด์เดียวกันที่เพาะเลี้ยงเซลล์เอสทีทูกับ โครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนเป็นเวลา 3 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, c = มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน, d = มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน, n = 4, p value < 0.05)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงในโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดออกไซด์ ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน: กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดออกไซด์ 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล และกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 3 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.111E10	3	3.703E9	112.883*	.000
Within Groups	3.937E8	12	3.281E7		
Total	1.150E10	15			

*. The mean difference is significant at the 0.05 level



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงในโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดีปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดีปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมลกับกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 3 วันโดยวิธีของดันเนท (Dunnett's test)

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1:1:1	control	19119.43750*	4050.01110	.001	8253.7	29985.1
1:1:2	control	51276.56250*	4050.01110	.000	40410.8	62142.2
1:1:3	control	67197.57500*	4050.01110	.000	56331.8	78063.2

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ทางสถิติเชิงซ้อนของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงในโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดีปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดีปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมลและกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 3 วันโดยวิธีทดสอบเชิงซ้อนคันแคน (Duncan's multiple range Test)

Duncan^a

Subset for alpha = 0.05					
group	N	1	2	3	4
control	4	4283.5275			
1:1:1	4		23402.9650		
1:1:2	4			55560.0900	
1:1:3	4				71481.1025
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงในโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาไซด์ ในอัตราส่วนอะซิเมนแนน:กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาไซด์ 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล และกลุ่มควบคุมลบ เป็นเวลา 7 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.729E10	3	1.243E10	839.310*	.000
Within Groups	1.777E8	12	1.481E7		
Total	3.747E10	15			

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงในโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาไซด์ ในอัตราส่วนอะซิเมนแนน:กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาไซด์ 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมลกับกลุ่มควบคุมลบเป็นเวลา 7 วัน โดยวิธีของดันเนท (Dunnett's test)

Dependent Variable: cell viability

Dunnett t (2-sided)^a

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1:1:1	control	49642.52250*	2721.35162	.000	42341.4722	56943.5728
1:1:2	control	89435.45750*	2721.35162	.000	82134.4072	96736.5078
1:1:3	control	1.30487E5*	2721.35162	.000	123185.6	137787.7

*. The mean difference is significant at the 0.05 level



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ทางสถิติเชิงซ้อนของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงในโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดีปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดีปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมลและกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 7 วันโดยวิธีทดสอบเชิงซ้อนคันแคน (Duncan's multiple range Test)

Duncan^a

group	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
control	4	5853.7225			
1:1:1	4		55496.2450		
1:1:2	4			95289.1800	
1:1:3	4				136340.4575
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซีเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดีปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีเมนแนน:กรดอะดีปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1 โดยโมล เป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน โดยสถิติแบบ Pair T-Test

Paired Differences							
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval of the Difference		t	Sig. (2-tailed)
				Lower	Upper		
Pair day3-day7	-32093.2	12578.0	6289.0	-52107.6	-12078.8	-5.103*	.015

*. The mean difference is significant at the 0.05 level



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมลบ เป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน โดยสถิติแบบ Pair T-Test

	Paired Differences						t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence					
				Interval of the					
				Difference					
				Lower	Upper				
Pair day3-day7	-1570.1	561.4	280.7	-2463.5	-676.8	-5.594*	3	.011	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนน ที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิปิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาไซด์ ในอัตราส่วนอะซิเมนแนน: กรดอะดิปิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาไซด์ 1:1:2 โดยโมล เป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน โดยสถิติแบบ Pair T-Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	95% Confidence							
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Interval of the				
				Difference				
				Lower	Upper			
Pair day3-day7	-39729.0	1524.3	762.1	-42154.6	-37303.5	-52.127*	3	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เอสทีทูที่เพาะเลี้ยงกับโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนน ที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซิเมนแนน: กรดอะดิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:3 โดยโมล เป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน โดยสถิติแบบ Pair T-Test

Paired Differences								
				95% Confidence				
				Interval of the				
				Difference				
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower	Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair day3-day7	-64859.3	3292.2	1646.1	-70098.0	-59620.6	-39.401*	3	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

อภิปรายผลการวิจัย

โครงร่าง (scaffold) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการทำหน้าที่เป็นโครงร่างชั่วคราวเพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ โดยเซลล์จำเป็นต้องมีโครงเพื่อยึดเกาะ จากนั้นเซลล์จะมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน และมีการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์จนกระทั่งเนื้อเยื่อเกิดการฟื้นฟูสภาพและเกิดการเจริญทดแทนขึ้นใหม่อย่างสมบูรณ์

ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอะซิเมนแนนซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่ปลอดภัย (Patil, 2012) เมื่อนำมาเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซลในอัตราส่วนอะซิเมนแนน:กรดอะดิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมล สามารถขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติได้ และเมื่อนำไปทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนโดยเฉพาะเลี้ยงกับเซลล์เอสทีทูเป็นเวลา 3 วันและ 7 วันพบว่าโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซิเมนแนน:กรดอะดิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1 มีการละลายไปบางส่วนและมีลักษณะคล้ายเจล (gel) ซึ่งถึงจะสามารถขึ้นรูปได้แต่อาจไม่เหมาะในการนำไปใช้งาน ส่วนโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซิเมนแนน:กรดอะดิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมลพบว่าสามารถขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติได้และเมื่อนำไปทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนโดยเฉพาะเลี้ยงกับเซลล์เอสทีทูเป็นเวลา 3 วันและ 7 วันพบว่ายังคงรูปอยู่ได้และไม่มีการละลายไป

การศึกษานี้ยังพบว่าโครงร่าง 3 มิติอะซิเมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะดิกและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซลในอัตราส่วนอะซิเมนแนน:กรดอะดิก:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 โดยโมลเมื่อนำไปทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนโดยเฉพาะเลี้ยงกับเซลล์เอสทีทูเป็นเวลา 3 วันและ 7 วันพบว่าไม่มีความเป็นพิษและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เอสทีทู



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีแมนแนน:กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1, 1:1:2 และ 1:1:3 เมื่อเพาะเลี้ยงกับเซลล์เอสทีทูเป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน โครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีแมนแนน:กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:1 มีการละลายไปบางส่วนและมีลักษณะคล้ายเจล (gel) ซึ่งทำให้ผลการทดลองที่ได้มีค่าแตกต่างกันในกลุ่ม การทดลองเดียวกัน ซึ่งอาจไม่เหมาะในการนำไปใช้งาน ส่วนโครงร่าง 3 มิติอะซีแมนแนนที่ทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีแมนแนน:กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:2 และ 1:1:3 จากการศึกษานี้พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jettanacheawchankit (2009) โดยพบว่าอะซีแมนแนนกระตุ้นการสร้างเซลล์เส้นใยให้เกิดการเพิ่มจำนวน กระตุ้นเคอราตินโนไซต์โกรทแฟกเตอร์ (KGF-1 : keratinocyte growth factor-1) , วัสดุกลูตาไธนโดทีเรียวโกรทแฟกเตอร์ (VEGF : vascular endothelial growth factor) และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งมีผลต่อการหายของแผล

จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า อะซีแมนแนนเมื่อทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล ในอัตราส่วนอะซีแมนแนน:กรดอะมิโน:คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล 1:1:2 และ 1:1:3 สามารถขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติ ที่เหมาะต่อการนำไปใช้งาน มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เอสทีทู และสนับสนุนการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์เอสทีทู

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

อะซีแมนแนน เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดส่วนหัวของวุ้นหางจระเข้ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่พบได้มากในประเทศไทย จากการศึกษานี้ทำให้ได้สภาวะและอัตราส่วนที่เหมาะสมในการนำอะซีแมนแนนมาเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซลเพื่อขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติ และจากการศึกษานี้พบว่าโครงร่าง 3 มิติ อะซีแมนแนนที่เชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซล มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ที่ทำการทดสอบและสนับสนุนการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ทำการทดสอบ การศึกษานี้จึงเป็นการนำพืชสมุนไพรที่พบได้มากในประเทศไทยมาใช้ประโยชน์ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาต่อไปควรศึกษาอะซีแมนแนนเมื่อนำมาทำการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยกรดอะมิโนและคาร์บอนิลไดอิมิดาโซลและขึ้นรูปเป็นโครงร่าง 3 มิติเมื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มีผลต่อการตกตะกอนแร่ธาตุเพื่อยืนยันผลการศึกษาที่ชัดเจนยิ่งขึ้น จะได้นำอะซีแมนแนนไปใช้ในผู้ป่วยต่อไป อะซีแมนแนนเป็นสารที่สกัดได้จากธรรมชาติ ไม่มีความเป็นพิษและปลอดภัยต่อมนุษย์



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

เอกสารอ้างอิง

- Boonyagul, S., Banlunara, W., Sangvanich, P. and Thunyakitpisal, P. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. Odontology. (2012)
- Chongsuk, R. William, T. Charles, M. Younsoo, B. Sehun, K. The suppression of prion propagation using poly-L-lysine by targeting plasminogen that stimulates prion protein conversion. Biomaterials. 32(2011): 3141-3149.
- Otsuka, E. Yamaguchi, A. Hirose, S. and Hagiwara, H. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. Am J Physiol Cell Physiol. 277(1999): 132-138.
- Hugues, J. Ryser, P. and Shen, W. Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci.. 75(1978): 3867-3870
- Jettanacheawchankit, S., Sasithanasate, S., Sangvanich, P., Banlunara, W. and Thunyakitpisal, P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor – 1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. J Pharmacol Sci. 109(2009): 525 – 31.
- Lec, Jk L. Yun, YP. Kim, Y. Kim, JS. Kiim, YS, et al. Acemannan purified from Aloe vera induces Phenotypics and functional maturation of immature dendritic cell. Int. Immunopharmacol. (2001): 1275-1285.
- Chung, S. A review on the relationship between Aloe vera component and its biologic effects. Seminar in Integrative Medicine. 1(1) (2003): 53-62.
- Tai-Nin, C. J., Williamson, D., Yates, K. and Goux, W. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. Carbohydr Res. 2(2005): 1131 – 1142.
- Brahatheswaran, D., Yasuhiko, Y., Toru, M., and Sakthi Kumar, D. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. International Journal of Polymer Science. (2011): 1-19.
- U.S. Patil, A.V.J., D.D. Bandawane Immunomodulators: a pharmacological review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences. 4(2012):30-26.
- Langer, R., and Vacanti, J. Tissue Engineering. Science. 260(1993): 920-926.
- O'Brien F. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. Materials Today. 2011; 14(3).
- Risbud, M. Tissue engineering: implications in the treatment of organ and tissue defects. Biogerontology. (2001): 117-125.
- Lowry, O. Rosebrough, N. Farr, A. and Randall, R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry. 193(1951): 265-275
- Van Landuyt, P., Keustermans F. Bonding mechanism of bioceramics. J. Mater. Sci.: Mater. Med.. 6(1995): 8



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

- Lu, L., et al., In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. Biomaterials. 21(2000): 1837.
- Oh, S.H. et al., Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid) /poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. Biomaterials. 24(2003): 4011.
- Rowlands, A., et al., Polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation. Biomaterials. 28(2007): 2109
- Wang, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. Biomaterials. 24 (2003): 2133-2151.
- Hench, L. Bioceramics. J Am Ceram Soc. 81(1998): 1705-1728.
- Lodish, H. Berk, A. Zipursky, L. Matsudaira, P. Baltimore, D. and Darnell, J. Molecular Cell Biology. (4th). New York: W. H. Freeman. 2000.
- Buckley, C. Raingert, E. Bradfield, P. Nasht, G. and Simmons, D. Cell adhesion: more than just glue (Review). Molecular Membrane Biology. 15(1998): 167-176.
- Lee, J.K., Lee, M.K., Yun, Y.P., Kim, Y., Kim, J.S., Kim, Y.S., Kim, K., Han, S.S. and Lee, C.K. Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. International Immunopharmacology. 1(2001): 1275 – 1284.

