Original Article

การประยุกต์ใช้สารโปรติโอไกลแคนจากกระดูกอ่อนของปลานิลในโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินจากไหมและเจลาตินเพื่อเร่งการหายของบาดแผลในระดับห้องปฏิบัติการ

ปัญญา วีรวัฒกพงศ์[1]
พรอนงค์ อร่ามวิทย์[2]*

Application of Proteoglycan from *Oreochromis niloticus* Cartilage in Silk fibroin/gelatin Scaffold for *In vitro* Wound Treatment.

Panya Weerawatkapong[1], Pornanong Aramwit[2]

[1]Biomedical Engineering Program, Faculty of Engineering, [2]Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Pathum Wan, Bangkok, 10330, Thailand.

*E-mail: aramwit@gmail.com

Songkla Med J 2015;33(5):247-258

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อนำสารโปรติโอไกลแคนที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนัง (epidermal growth factor) ที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิลมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ร่วมกับโปรตีนไฟโบรอินจากไหม (silk fibroin) และเจลาติน (gelatin) และทดสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

วัสดุวิธีการ: วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของสารโปรติโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิล จากนั้นขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีสารโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม ประจำปี 2555 และบริษัท จุลไหมไทย จำกัด

[1]หลักสูตรสหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ [2]ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

รับต้นฉบับวันที่ 6 พฤษภาคม 2558 รับลงตีพิมพ์วันที่ 12 สิงหาคม 2558

ผลการศึกษา: สารโปรตีโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของปลานิลมีค่าการละลายในน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 0.86±0.12 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้อง และสารละลายโปรตีโอไกลแคนมีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 6.55±0.44 โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ มีรูพรุนและมีการเชื่อมต่อของรูพรุนที่สูงโดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอิน/เจลาติน/สารโปรตีโอไกลแคนที่ 25:73.75:1.25 จะมีขนาดของรูพรุนใหญ่ที่สุด จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างหมู่ฟังก์ชันของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้บ่งบอกโดยอ้อมว่าสามารถนำสารโปรตีโอไกลแคนมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอินและเจลาตินได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบสามารถดูดซึมน้ำได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ และยังช่วยส่งเสริมให้เกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบอย่างมีนัยสำคัญ

สรุป: กระดูกอ่อนของปลานิลมีส่วนประกอบของสารโปรตีโอไกลแคนซึ่งคาดว่าสามารถช่วยส่งเสริมให้เกิดการหายของบาดแผลลึกได้ดียิ่งขึ้น โดยสารโปรตีโอไกลแคนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลานิลมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิห้อง และมีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกลาง สามารถนำมาประยุกต์ใช้โดยการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอินและเจลาตินที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้ โดยอัตราส่วนของไฟโบรอิน/เจลาติน/สารสกัดโปรตีโอไกลแคนที่เหมาะสมสำหรับใช้รักษาบาดแผล คือ 25:73.75:1.25

คำสำคัญ: กระดูกอ่อนของปลานิล, เจลาติน, บาดแผล, โปรตีโอไกลแคน, ไฟโบรอิน

Abstract:

Objective: To prepare silk fibroin/gelatin scaffold containing epidermal growth factor-like proteoglycan extracted from *Oreochromis niloticus* cartilage and characterize physical, chemical and biological properties of prepared scaffolds.

Material and Method: The physical properties of proteoglycan extracted from *Oreochromis niloticus* cartilage was characterized. Composite scaffold of silk fibroin and gelatin with different blend ratios, with and without proteoglycan, were prepared using a freeze drying technique. Physical, chemical and biological properties of these scaffolds were characterized and compared.

Results: The proteoglycan extracted from *Oreochromis niloticus* cartilage had a solubility of approximately 0.86±0.12 g/100 mL at room temperature. The pH of proteoglycan solution was about 6.55±0.44. Freeze-dried silk fibroin/gelatin scaffolds with different blend ratios, with and without proteoglycan, were prepared. All prepared scaffolds showed porous structures with high pore interconnectivity. 25:73.75:1.25 blend ratio of silk fibroin/gelatin/proteoglycan scaffolds showed the largest pores. Results from FTIR assay indicated that proteoglycan was successfully prepared as silk fibroin/gelatin/proteoglycan scaffolds. Silk fibroin/gelatin scaffolds containing proteoglycan not only showed higher water swelling ability than silk fibroin/gelatin scaffolds without proteoglycan but also promoted significantly higher fibroblast cell proliferation rate than those without proteoglycan.

Conclusion: *Oreochromis niloticus* cartilage contains proteoglycan which may be useful for promoting wound healing. This compound shows good solubility in water at room temperature and possesses neutral pH.

It can be combined with silk fibroin and gelatin to form a scaffold which stimulates proliferation and growth of fibroblast cells. Blend ratio of 25:73.75:1.25, fibroin/gelatin/proteoglycan, is the most appropriate ratio for fabricating the scaffold for this application

Keywords: Proteoglycan, *Oreochromis niloticus* cartilage, wounds, silk fibroin, gelatin

บทนำ

หัวปลา ประกอบไปด้วยกระดูกอ่อนที่มีส่วนประกอบของสารโปรติโอไกลแคนในปริมาณสูง โดยสารโปรติโอ-ไกลแคนเหล่านี้จะมีคุณสมบัติคล้ายสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามปัจจุบันสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังไม่สามารถผลิตได้ในประเทศไทย จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้น ซึ่งในต่างประเทศกระบวนการผลิตสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังได้มาจากเทคนิคการทำรีคอมบิแนนท์ (human recombinant technique) ทำให้ผลผลิตดังกล่าวมีราคาสูง หากมีการนำสารโปรติโอไกลแคนมาใช้ทดแทนได้ก็จะเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรได้อย่างมาก

บาดแผล หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมอาจส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อน ทำให้แผลหายช้า ในบางกรณีอาจทำให้ผู้ป่วยสูญเสียน้ำและอิเล็คโทรไลต์ หรืออาจติดเชื้อในกระแสเลือดจนทำให้เสียชีวิตได้ในที่สุด จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารโปรติโอไกลแคนมีส่วนสำคัญต่อกระบวนการหายของบาดแผล โดยเชื่อว่าโปรติโอไกลแคนมีคุณสมบัติเร่งการหายของบาดแผล โดยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผิวหนัง การสร้างเนื้อเยื่อง่อกทดแทน และการสร้างหลอดเลือดใหม่[1-4] โปรติโอ-ไกลแคนที่ใช้ในการศึกษานี้สกัดได้จากกระดูกอ่อนส่วนหัวของปลานิล ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอวัยวะส่วนนี้จะถูกนำไปทิ้งหรือใช้เป็นอาหารสัตว์ ภายหลังจากที่นำปลามาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังนั้นหากสามารถนำหัวปลานิลมาสกัดเพื่อให้ได้โปรติโอไกลแคนและนำมาขึ้นรูปเพื่อใช้รักษาบาดแผลก็สามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตผู้ป่วย ลดค่าใช้จ่าย และเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุทางการเกษตรได้อย่างมาก

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักอยู่ในเส้นไหมซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยหนอนไหมในระยะเมทามอร์โฟซิส (metamorphosis) เนื่องด้วยไฟโบรอินมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility)[5-7] และถูกย่อยสลายได้ในทางชีวภาพ (biodegradation)[8,9] จึงถูกนิยมในการนำมาใช้ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น นำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ หรือนำไปขึ้นรูปเป็นหลอดเลือดเทียม

เจลาตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่แปลงสภาพมาจากคอลลาเจน โดยผ่านกระบวนการไฮโดรไลซ์บางส่วน (partial hydrolysis) มีสมบัติสามารถเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำๆ และสามารถละลายได้ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เจลาตินนิยมนำมาใช้ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับไฟโบรอินเนื่องจากมีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ[10] และถูกย่อยสลายได้ในทางชีวภาพ[11-15] นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้อีกด้วย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสารโปรติโอไกลแคนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของหัวปลานิลในอัตราส่วนต่างๆ มาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอิน และเจลาติน หลังจากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และทดสอบประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวโดยดูจากคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

หัวปลานิลได้รับความอนุเคราะห์มาจากบริษัท ไร่กำนันจุล จำกัด (เพชรบูรณ์ ประเทศไทย) รังไหมไทยพันธุ์จุล 1/1 (บริษัท จุลไหมไทย จำกัด ประเทศไทย) และผงเจลาตินชนิดเอ (pI 9, Nitta gelatin Inc., Japan)

วิธีการ

ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารโปรตีโอไกลแคนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของหัวปลานิล

นำผงโปรตีโอไกลแคนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของหัวปลานิลด้วยกรดแอซีติก (4% acetic acid) มาใส่ในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) อย่างสม่ำเสมอและใส่ผงที่สกัดได้จนกว่าสารละลายอิ่มตัว โดยสังเกตได้จากการไม่ละลายเพิ่ม หลังจากนั้นนำมากรองผ่านตัวกรองสารละลาย (syringe filter) ขนาด 0.22 ไมครอน แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA Assay kit และวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH-meter)

การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

นำรังไหมไทยสายพันธุ์จุล 1/1 มากำจัดเซริซินออก โดยต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (อัตราส่วนระหว่างรังไหมต่อสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเท่ากับ 1:25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จำนวน 2 รอบ โดยในแต่ละรอบล้างด้วยน้ำปราศจากประจุหลายๆ ครั้ง แล้วตากให้แห้ง จากนั้นนำเส้นใยไหมมาดึงเป็นเส้นเล็กๆ จนมีลักษณะฟู ชั่งน้ำหนัก 8 กรัม แล้วไปละลายด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ 24 กรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปทำการไดอะไลซิส (dialysis tube with molecular weight cut off 12,000-16,000, Viskase Companies, Inc., Japan) ด้วยน้ำปราศจากประจุที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ออก นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงแยกอนุภาคที่ไม่ต้องการที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส[16] สุดท้ายจะได้สารละลายไฟโบรอินที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 5-6 โดยน้ำหนัก

การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์

ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ โดยให้เนื้อสารทั้งหมดมีความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนผสมของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีและไม่มีโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ

สัญลักษณ์	ความหมาย
$SF_{25}G_{75}$	มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก)
$SF_{50}G_{50}$	มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก)
$SF_{75}G_{25}$	มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาตินร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก)
$SF_{25}G_{75}E$	มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 25 และเจลาตินร้อยละ 73.75 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 3.95 โดยน้ำหนัก) และมีอัตราส่วนผสมของสารโปรตีโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก)
$SF_{50}G_{50}E$	มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 50 และเจลาตินร้อยละ 48.75 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 3.95 โดยน้ำหนัก) และมีอัตราส่วนผสมของสารโปรตีโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก)
$SF_{75}G_{25}E$	มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาตินร้อยละ 23.75 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 3.95 โดยน้ำหนัก) และมีอัตราส่วนผสมของสารโปรตีโอไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก)

นำสารละลายไฟโบรอิน (ความเข้มข้นร้อยละ 5-6 โดยน้ำหนัก) สารละลายเจลาตินชนิดเอ (ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก) และสารละลายโปรตีโอไกลแคน (ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก) ในแต่ละอัตราส่วนผสมต่างๆ ดังที่ได้กำหนดไว้มาปั่นกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายตัวอย่างที่ได้ใส่แม่พิมพ์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ห่อฟอยด์ตัวอย่าง นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำฟอยด์ออกจากตัวอย่าง แล้วนำชิ้นงานไปล้างเพื่อกำจัดกลูตาอัลดีไฮด์ออก โดยนำไปแช่ในไกลซีนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำปราศจากประจุโดยการแช่ตัวอย่างในน้ำปราศจากประจุ 3 รอบ รอบละ 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปห่อฟอยด์ที่เจาะเป็นรูเล็กๆ บนพื้นผิวฟอยด์ นำเข้าแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM-JSM 5410LV, JEOL Ltd., Japan) ทำโดยการตัดชิ้นงานเป็นชิ้นเล็กๆ วางบนฐานเตรียมตัวอย่าง และนำตัวอย่างที่ได้ไปเคลือบทองก่อน จากนั้นทำการถ่ายภาพที่กำลังขยาย 35 เท่า นำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดของรูพรุนโดยการสุ่มวัด 100 รู ในแนวราบและแนวตัดขวางด้วยโปรแกรม Image J ค่าของขนาดรูพรุนที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การทดสอบคุณสมบัติในการพองน้ำ

นำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ที่ถูกทำให้แห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักบันทึกเป็นน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำปราศจากประจุ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้งบันทึกเป็นน้ำหนักเปียก คำนวณหาค่าร้อยละของการบวมพองในน้ำ[17]

$$\text{ร้อยละของการบวมพองในน้ำ} = \left(\frac{\text{น้ำหนักเปียกของชิ้นงาน} - \text{น้ำหนักแห้งของชิ้นงาน}}{\text{น้ำหนักแห้งของชิ้นงาน}}\right) \times 100$$

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR)

วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างหมู่ฟังก์ชันของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาติน และสารสกัดโปรตีโอไกลแคนด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีโดยใช้รังสีอินฟราเรดในช่วง 4,000-400 ซม$^{-1}$ เพื่อวิเคราะห์พีคของเอไมด์ (amide) ซึ่งมีจำนวนคลื่น (wave number) อยู่ในช่วง 1,700-1,600 ซม$^{-1}$ (amide I) 1,600-1,500 ซม$^{-1}$ (amide II) และ 1,300-1,200 ซม$^{-1}$ (amide III)[18-21] และพีคของหมู่น้ำตาล (sugar) ซึ่งมีจำนวนคลื่นอยู่ในช่วง 1,200-1,000 ซม$^{-1}$ [19,21]

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพ

การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929)

เพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ลงบนจานเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนเซลล์ 2.5x104 เซลล์ต่อหลุม ใน 48 wellplate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (DMEM) ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS, 50 U/mL penicillin streptomycin ในตู้บ่ม 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันนำชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์สูตรต่างๆ ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นงานออกแยกส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ มากรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเปลี่ยนแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์เดิม เลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น

ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay หรือ (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก ล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออก และเติมตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในการชะผลึกออกมา จะได้สารละลายสีม่วงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ที่ถูกละลายออกมามีค่าแปรผันโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon eclipseTS100, USA) ของเซลล์หลังจากที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผ่านการแช่ชิ้นงานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และลักษณะการย้อมติดสีของ MTT หลังจากการทำ MTT assay[17]

การวิเคราะห์ทางสถิติ

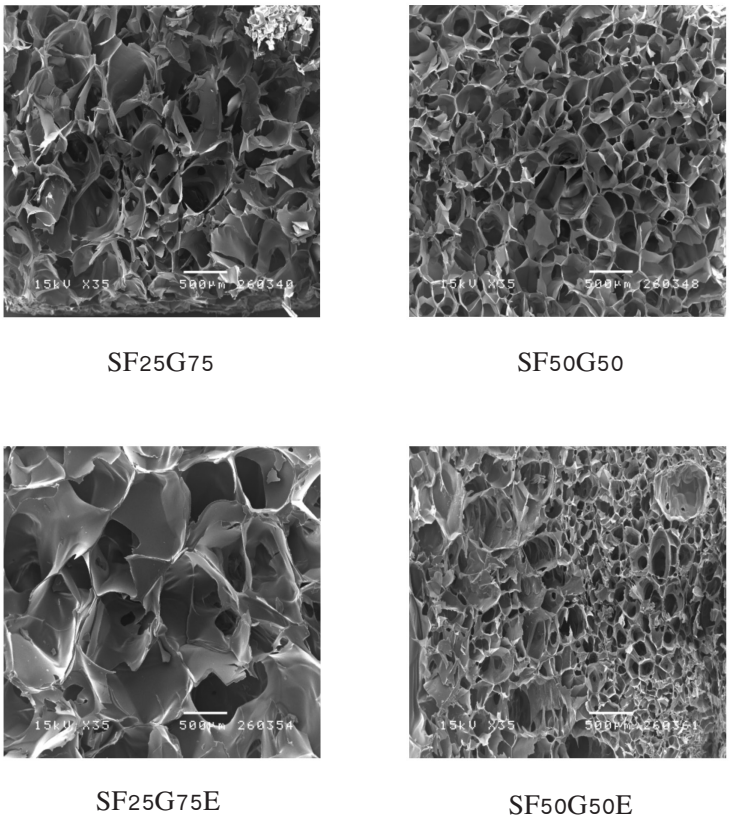
เปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากผลการทดสอบที่คำนวณได้ระหว่างกลุ่มของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน เจลาติน และสารโปรตีโอไกลแคนในอัตราส่วนที่แตกต่างกันของแต่ละสูตรด้วยสถิติ One-Way ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (p-value<0.05) โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 17.0

ผลการศึกษา

ผลจากการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของสารโปรตีโอไกลแคนที่สกัดจากกระดูกอ่อนของหัวปลานิล พบว่าสารโปรตีโอไกลแคนที่ได้มีค่าการละลายในน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 0.86±0.12 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง และสารละลายที่ได้มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ประมาณ 6.55±0.44

ผลการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอิน และเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกัน โดยมีและไม่มีสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ พบว่าสามารถขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้ครบทุกสูตรยกเว้นสูตรที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาติน ร้อยละ 23.75 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 3.95 โดยน้ำหนัก) และมีอัตราส่วนผสมของสารโปรตีโอ-ไกลแคนร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก) ซึ่งไม่สามารถถูกขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้สำเร็จ เนื่องจากตัวอย่างไม่เกิดการเจลอย่างสมบูรณ์ในระหว่างขั้นตอนการขึ้นรูป ดังนั้นจึงได้ตัดสูตรที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาติน ร้อยละ 23.75 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 3.95 โดยน้ำหนัก) และมีอัตราส่วนผสมของสารโปรตีโอไกลแคน ร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก) กับสูตรที่มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินร้อยละ 75 และเจลาตินร้อยละ 25 โดยน้ำหนักออกจากการทดลอง

ผลการวัดขนาดรูพรุนและลักษณะทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่า เมื่อนำสารละลายไฟโบรอินและเจลาติน ในอัตราส่วน 50:50 และ 25:75 มาทำการขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ของไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วน 25:75 มีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสมกว่า เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีความเรียบเนียน มีขนาดรูพรุนค่อนข้างสม่ำเสมอ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนของไฟโบรอิน/เจลาตินเท่ากับ 50:50 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 266.15±67.92 ไมครอน ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอัตราส่วนของไฟโบรอิน/เจลาตินเท่ากับ 25:75 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 366.36±89.13 ไมครอน และเมื่อนำสารโปรตีโอไกลแคนที่สกัดได้ใส่เข้าไปในโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของไฟโบรอิน/เจลาติน/โปรตีโอไกลแคน ในอัตราส่วน 25:73.75:1.25 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 665.46±149.71 ไมครอน ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีอัตราส่วนของสารดังกล่าว 50:48.75:1.25 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 231.86±92.38 ไมครอน ซึ่งขนาดของรูพรุนดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อความคงตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้อัตราส่วน 25:73.75:1.25 มาขึ้นรูปเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราดของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 2 ร้อยละของสมดุลของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาติน ในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีสารสกัดโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ

โครงเลี้ยงเซลล์	ร้อยละของสมดุลของการบวมพองในน้ำ			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
SF25G75	722.45	818.18	787.80	776.15±48.92
SF25G75E	959.02	1,225.77	892.86	1,025.882±176.24
SF50G50	884.29	1,000.00	847.06	910.45±79.76
SF50G50E	836.84	918.86	1,102.08	952.59±135.80

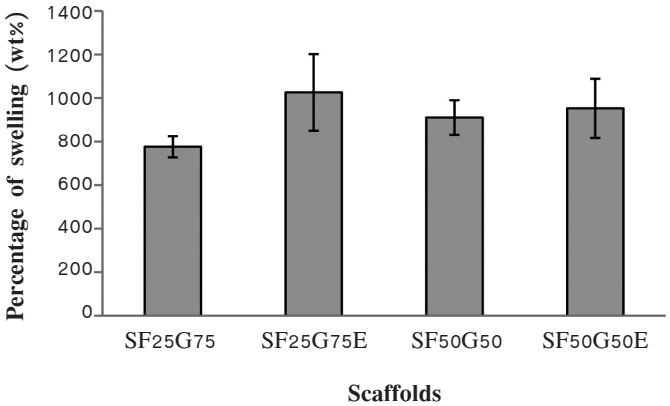
ผลการทดสอบความสมดุลของการบวมพอง (swelling test) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ดังตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินและเจลาตินที่มีสารสกัดโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบมีร้อยละของการบวมพองในน้ำสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินและเจลาตินที่ไม่มีสารสกัดโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2)

ผลการศึกษาโครงสร้างหมู่ฟังก์ชันของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด-สเปกโทรสโกปี จะสังเกตเห็นพีคของเอไมด์ (amide) ในช่วง 1,700-1,600 ซม$^{-1}$ (amide I), 1,600-1,500 ซม$^{-1}$ (amide II) และ 1,300-1,200 ซม$^{-1}$ (amide III)[18-21] ปรากฏขึ้นอย่างชัดเจนกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีไฟโบรอินและเจลาตินเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนผสมต่างๆ [รูปที่ 3 (SF25G75, SF25G75E, SF50G50, SF50G50E)] นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินและเจลาตินที่มีสารสกัดโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ [รูปที่ 3 (SF50G50E และ SF25G75E)] จะเกิดพีคของสารสกัดโปรตีโอไกลแคนปรากฏที่แถบการดูดกลืนแสงที่ 1,100 ซม$^{-1}$ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เกิดพีคของหมู่น้ำตาลหรือไกลโคซามิโนไกลแคนส์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของโครงสร้างในโปรตีโอไกลแคน (1,200-1,000 ซม$^{-1}$)[19,21]

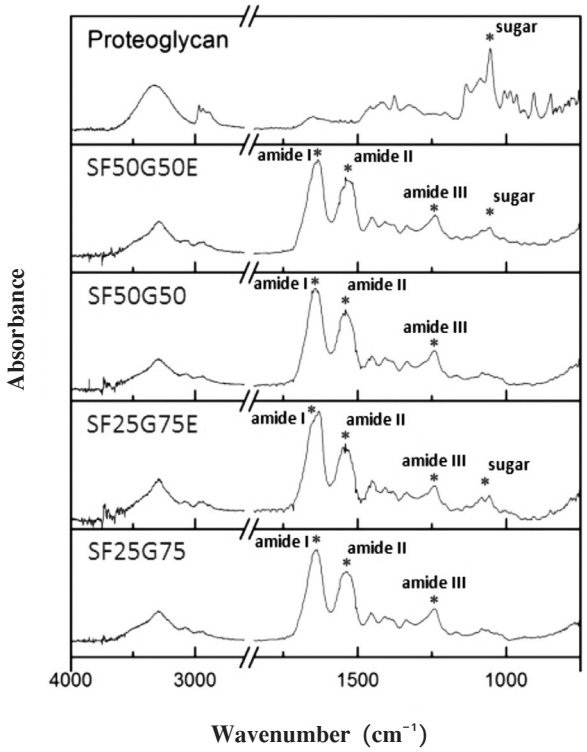
ผลการทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (L929) หลังจากใส่สารละลายที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตขึ้นเข้าไปเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ดังรูปที่ 4 พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารละลายจากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบจะมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่าในกรณีที่ไม่มีสารโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ โดยเซลล์ที่รอดชีวิตจะมีลักษณะดังรูปที่ 5 และนอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเจลาตินในอัตราส่วนที่สูงกว่า (ร้อยละ 75) จะสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้มากกว่า

วิจารณ์

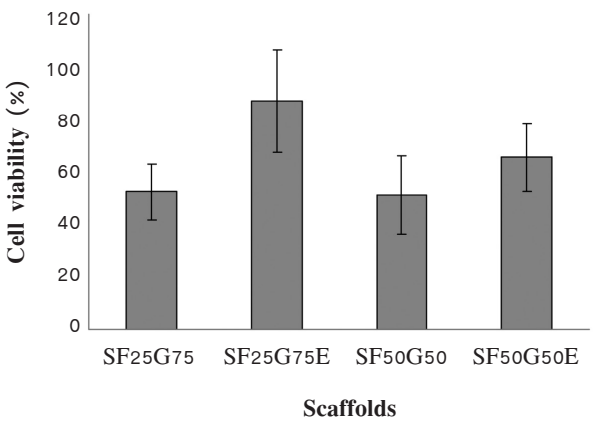
กระดูกอ่อนบริเวณส่วนหัวของปลานิลมีสารโปรตีโอไกลแคนชนิดแอกกรีแคน (aggrecan) เป็นองค์ประกอบหลัก[22] โดยโปรตีโอไกลแคนชนิดนี้จะมีส่วนของโครงสร้างหนึ่งซึ่งมีลักษณะเหมือนสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังอยู่ที่ตำแหน่ง G3 domain ของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหลักของโปรตีโอไกลแคนซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีต่อสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนัง (anti-mouse EGF)[23] จึงอาจจะกล่าวได้ว่าโปรตีโอไกลแคนอาจจะมีคุณสมบัติหนึ่งที่คล้ายกับสารกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังที่สามารถกระตุ้นให้เกิด



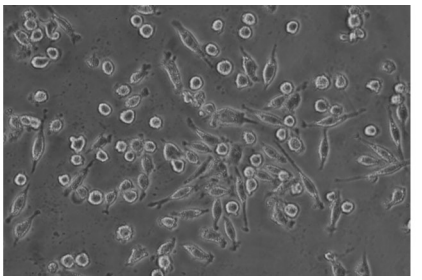
รูปที่ 2 ร้อยละของสมดุลของการบวมพองในน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีสารสกัดโปรตีโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ



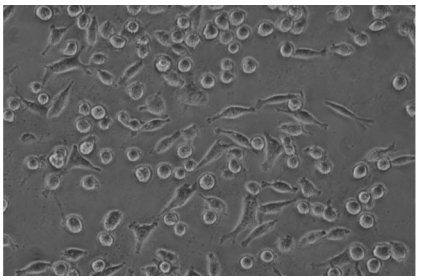
รูปที่ 3 ลักษณะของอินฟราเรดสเปกตรัมที่วิเคราะห์ได้จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีสารสกัดโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 4 ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารละลายที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วนแตกต่างกันโดยมีและไม่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ



SF25G75



SF25G75E

รูปที่ 5 ภาพเซลล์ผิวหนังที่รอดชีวิตหลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารละลายที่ได้จากโครงเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฟโบรอินและเจลาตินในอัตราส่วน 25:75 (SF25G75) และ ไฟโบรอิน เจลาติน และโปรติโอไกลแคนในอัตราส่วน 25:73.75:1.25 (SF25G75E)

การแบ่งตัวของเซลล์ (replication) การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเนื้อเยื่อบุผิว (proliferation) การเพิ่มจำนวนเคลาตินของเนื้อเยื่อบุผิว (keratinization) และที่สำคัญคือ ช่วยเร่งกระบวนการหายของแผลได้[1] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงองค์ประกอบของส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นอีกโครงสร้างหลักที่สำคัญของโปรติโอไกลแคนที่ยึดเกาะอยู่กับสายของโปรตีนของโปรติโอไกลแคนด้วยพันธะโคเวเลนต์ เรียกว่า ไกลโคซามิโนไกลแคนส์ (glycosaminoglycan, GAGs) โดยพบว่าโครงสร้างดังกล่าวนี้มีส่วนช่วยในกระบวนการหายของแผลได้ด้วยเช่นเดียวกัน โดยไกลโคซามิโนไกลแคนส์ของโปรติโอไกลแคนจะสามารถไปจับกับตัวรับชนิดหนึ่งที่เรียกว่า CD44 ซึ่งปรากฏอยู่บริเวณบนพื้นผิวของเซลล์ผิวหนังได้ เป็นผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้[24]

โครงสร้างสแคลฟโฟลด์หรือโครงเลี้ยงเซลล์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยใช้เป็นโครงสร้างชั่วคราวสำหรับให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าไปยึดเกาะ เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโต เกิดกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทนเนื้อเยื่อที่เสียหายไป การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีโครงสร้างและหน้าที่ทางชีววิทยาที่คล้ายคลึงกับสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) คือ คุณลักษณะสำคัญที่ต้องการนอกเหนือไปจากเรื่องของความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์[25-27] การนำสารโปรติโอไกลแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของสารที่เป็นองค์ประกอบภายนอกเซลล์ตามธรรมชาติ[28] มาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอินและเจลาตินนั้น นอกจากจะช่วยในเรื่องของการเร่งการหายของแผลแล้วยังทำให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณลักษณะที่คล้ายคลึงกับสารที่เป็นองค์ประกอบภายนอกเซลล์มากยิ่งขึ้นอีกด้วย

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กระดูกอ่อนของหัวปลานิลสามารถนำมาสกัดสารโปรติโอไกลแคนที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี และเมื่อนำมาผสมร่วมกับสารอื่น สามารถผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบสามมิติที่ใช้ในการรักษาบาดแผลได้ โดยชิ้นงานที่ได้มีความคงตัวดีและมีรูพรุนสม่ำเสมอ ไม่ใหญ่จนเกินไปจนทำให้ชิ้นงานเปราะบาง รวมทั้งมีขนาดเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย[29,30] จากคุณสมบัติของโปรติโอไกลแคนที่มีสภาพความเป็นประจุลบที่สูงจึงส่งผลให้สามารถดึงดูดหรือจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดี[28,31] ทำให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบสามารถเกิดการบวมน้ำหรือดูดซับน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารโปรติโอไกลแคนที่สกัดได้มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนัง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีแต่ไฟโบรอินและเจลาตินเป็นองค์ประกอบเท่านั้น สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Passi และคณะ[32] ที่แสดงให้เห็นว่าโปรติโอไกลแคนสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีสารเจลาตินเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้สูงกว่า สอดคล้องกับผลการทดลองที่มีมาก่อน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเจลาตินสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้เช่นเดียวกัน[33]

เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและเจลาตินที่มีสารโปรติโอไกลแคนเป็นองค์ประกอบสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้ จึงน่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้ในการรักษาบาดแผลทางคลินิก ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

สรุป

โปรติโอไกลแคนที่ผลิตได้จากกระดูกอ่อนของหัวปลานิลมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี และมีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกลาง สามารถนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฟโบรอินและเจลาตินที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารโปรติโอไกลแคนมีส่วนช่วยให้โครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย โดยอัตราส่วนของไฟโบรอิน:เจลาติน:สารสกัดโปรติโอไกลแคนที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์รักษาบาดแผลลึก คือ 25:73.75:1.25

เอกสารอ้างอิง

1. Yang CH, Huang YB, Wu PC, et al. The evaluation of stability of recombinant human epidermal growth factor in burn-injured pigs. Process Biochem 2005; 40: 1661 - 5.
2. Zhang Y, Cao L, Yang BL, et al. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. J Biol Chem 1998; 273: 21342 - 51.
3. Zheng PS, Wen J, Ang LC, et al. Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. FASEB J 2004; 18: 754 - 6.
4. Bertolami CN, Messadi DV. The role of proteoglycans in hard and soft-tissue repair. Crit Rev Oral Biol Med 1994; 5: 311 - 37.
5. Liu SS, Dong CF, Lu GZ, et al. Bilayered vascular grafts based on silk proteins. Acta Biomater 2013; 9: 8991 - 9003.
6. Lu Q, Hu K, Feng QL, et al. Growth of fibroblast and vascular smooth muscle cells in fibroin/collagen scaffold. Mater Sci Eng C 2009; 29: 2239 - 45.
7. Ma XL, Cao CB, Zhu HS. The biocompatibility of silk fibroin films containing sulfonated silk fibroin. J Biomed Mater Res Part B-Appl Biomater 2006; 78: 89 - 96.
8. Horan RL, Antle K, Collette AL, et al. In vitro degradation of silk fibroin. Biomaterials 2005; 26: 3385 - 93.
9. Wongpanit P, Ueda H, Tabata Y, et al. In vitro and in vivo release of basic fibroblast growth factor using a silk fibroin scaffold as delivery carrier. J Biomater Sci Polym Ed 2010; 21: 1403 - 19.
10. Lai JY. The role of bloom index of gelatin on the interaction with retinal pigment epithelial cells. Int J Mol Sci 2009; 10: 3442 - 56.
11. Huss FRM, Nyman E, Bolin JSC, et al. Use of macro-porous gelatine spheres as a biodegradable scaffold for guided tissue regeneration of healthy dermis in humans: an in vivo study. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2010; 63: 848 - 57.
12. Chandra R, Rustgi R. Biodegradable Polymers. Prog Polym Sci 1998; 23: 1273 - 335.
13. Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Damrongsakkul S. The Development of Injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine. J Mater Sci Mater Med 2014; 25: 401 - 10.

14. Kandil S, Kenawy ER, El-Maghraby A, et al. Recycling of pharmaceutical waste gelatin for controlled release applications II: a tri-fluralin based system. Polym Plast Technol Eng 2004; 43: 1695 - 709.
15. Kenawy ER, Cinelli P, Corti A, et al. Biodegradable composite films based on waste gelatin. Macromol Symp 1999; 144: 351 - 64.
16. Kim UJ, Park J, Kim HJ, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. Biomaterials 2005; 26: 2775 - 85.
17. Siritienthong T, Ratanavaraporn J, Aramwit P. Development of ethyl alcohol-precipitated silk sericin/polyvinyl alcohol scaffolds for accelerated healing of full-thickness wounds. Int J Pharm 2012; 439: 175 - 86.
18. Bondar B, Fuchs S, Motta A, et al. Functionality of endothelial cells on silk fibroin nets: comparative study of micro- and nanometric fibre size. Biomaterials 2008; 29: 561 - 72.
19. Camacho NP, West P, Torzilli PA, et al. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. Biopolymers 2001; 62: 1 - 8.
20. Motta A, Maniglio D, Migliaresi C, et al. Silk fibroin processing and thrombogenic responses. J Biomater Sci Polymer Edn 2009; 20: 1875 - 97.
21. Potter K, Kidder LH, Levin IW, et al. Imaging of collagen and proteoglycan in cartilage sections using Fourier transform infrared spectral imaging. Arthritis Rheum 2001; 44: 846 - 55.
22. Kakizaki I, Tatara Y, Majima M, et al. Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage. Arch Biochem Biophys 2011; 506: 58 - 65.
23. Stanescu V, Chaminade F, Stanescu R. The epidermal growth factor-like domain of the large proteoglycans from articular cartilage (aggrecans). Estimate of content at different ages and in osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 1993; 1: 179 - 84.
24. Ito G, Kobayashi T, Takeda Y, et al. Proteoglycan from salmon nasal cartridge promotes in vitro wound healing of fibroblast monolayers via the CD44 receptor. Biochem Biophys Res Commun 2015; 456: 792 - 8.
25. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives. J Biomater Sci Polymer Edn 2001; 12: 107 - 24.
26. Subia B, Kundu J, kundu SC. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. In: Eberli D, editor. Tissue engineering. Rijeka: Intech; 2010; p.141 - 57.
27. Sarkar D, Zhao W, Schaefer S, et al. Overview of tissue engineering concepts and applications. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al, editors. Biomaterials science an introduction to materials in medicine. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2013; p.1122 - 37.
28. Handley CJ, Samiric T, Ilic MZ. Structure, metabolism, and tissue roles of chondroitin sulfate proteoglycans. Adv Pharmacol 2006; 53: 219 - 32.
29. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. J Biomed Mater Res 2001; 55: 141 - 50.
30. Liao CJ, Chen CF, Chen JH, et al. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. J Biomed Mater Res 2002; 59: 676 - 81.
31. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. Microsc Res Tech 1994; 28: 385 - 97.
32. Passi A, Albertini R, Campagnari F, et al. Modifications of proteoglycans extracted from monolayer cultures of young and senescent human skin fibroblasts. Febs Lett 1997; 420: 175 - 8.
33. Wissemann KW, Jacobson BS. Pure gelatin microcarriers: synthesis and use in cell attachment and growth of fibroblast and endothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol 1985; 21: 391 - 401.