

## บทที่ 2

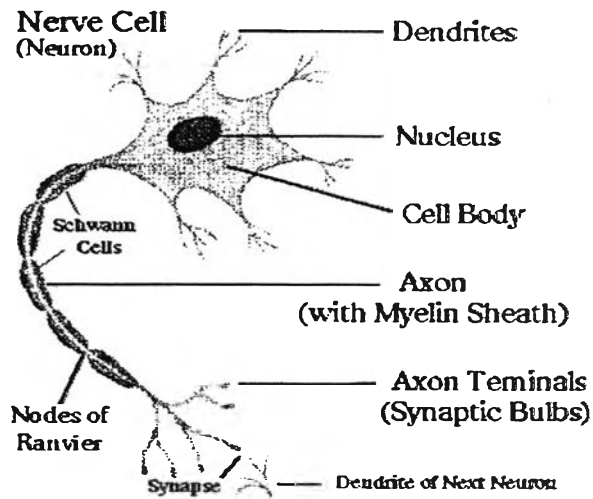


### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ระบบประสาทส่วนปลาย

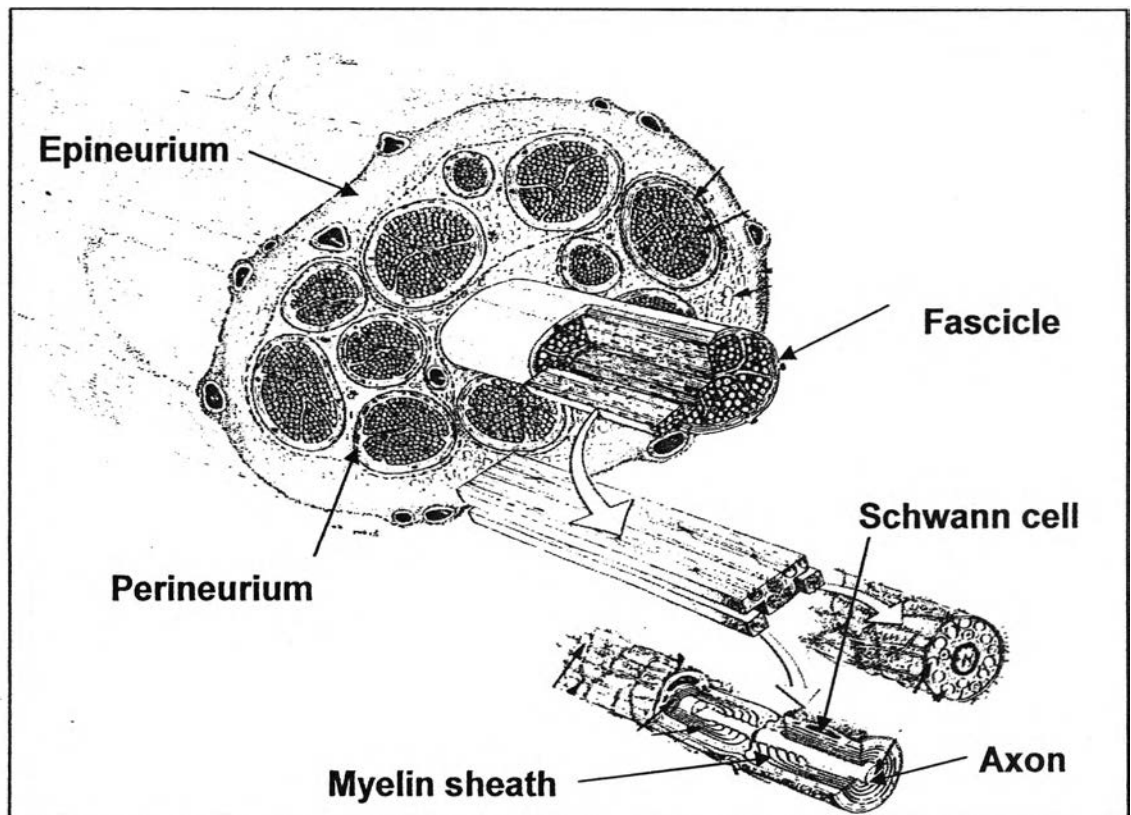
ระบบประสาทของมนุษย์แบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system) โดยระบบประสาทส่วนกลางประกอบด้วยสมองกับไขสันหลัง ส่วนระบบประสาทส่วนปลายประกอบด้วยเส้นประสาทสมองจำนวน 12 คู่, เส้นประสาทไขสันหลังจำนวน 31 คู่, เส้นประสาทอัตโนมัติ, ปมประสาทและปลายประสาท [ผาสุข มหรรฆานุเคราะห์, 2541] พยาธิสภาพของเส้นประสาทเกิดจากสาเหตุได้หลายประการได้แก่ สารเคมี อุบัติเหตุ ความร้อน ความพิการแต่กำเนิด การขาดวิตามิน การติดเชื้อ และพยาธิสภาพจากโรค เป็นต้น [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] ในส่วน Axon ของเซลล์ประสาทที่ได้รับการบาดเจ็บนั้น สามารถงอกใหม่ (Regeneration) ได้ แต่เซลล์ประสาทส่วนที่ถูกทำลายไม่สามารถสร้างทดแทนได้ เมื่อ Axon งอกใหม่จำเป็นต้องอาศัย Band of Bungner ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวเป็นแนวคล้ายท่อของ Schwann cell (เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้ม Axon ให้สารอาหารแก่ Axon และช่วยในกระบวนการงอกใหม่ของเส้นประสาท) ใน Band of Bungner เส้นประสาทจะงอกด้วยอัตราเร็ว 1-2 มิลลิเมตรต่อวัน เข้าไปสู่อวัยวะเป้าหมายต่างๆ ได้ และ Axon ของระบบประสาทส่วนปลายนอก Band of Bungner จะเสื่อมสลายไปในที่สุด นอกจากนี้ขบวนการงอกใหม่ของ Axon ไม่เกิดขึ้นในระบบประสาทส่วนกลาง [ผาสุข มหรรฆานุเคราะห์, 2541] ในที่นี้จึงกล่าวถึงขบวนการงอกใหม่ของระบบประสาทส่วนปลายเท่านั้น

ในรูปที่ 2.1 และรูปที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของเซลล์ประสาทและเส้น Axon ภาคตัดขวางตามลำดับ เพื่อให้เข้าใจถึงองค์ประกอบของเซลล์ประสาทและเส้น Axon



รูปที่ 2.1 แสดงรูปส่วนประกอบต่างๆเซลล์ประสาท

ที่มา : [http://www.nysora.com/techiques/neurologic/images/1\\_big.jpg](http://www.nysora.com/techiques/neurologic/images/1_big.jpg)



รูปที่ 2.2 แสดงรูปเส้นประสาทภาคตัดขวาง

ที่มา : Stefano Geuna. *Department of Clinical and Biological Sciences San Luigi Gonzaga Hospital University of Torino Orbassano - Italy*

## 2.2 การบาดเจ็บของเส้นประสาท

การบาดเจ็บของเส้นประสาทสามารถแบ่งอย่างคร่าว ๆ ตามวิธีของ Seddon เป็น 3 แบบ คือ

2.2.1 Neurapraxia การบาดเจ็บชนิดนี้หน้าที่การทำงานของเส้นประสาทสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้เพียงแต่ทำให้มีผลในการนำสัญญาณประสาทช้าลงหรือสูญเสียความสามารถในการนำสัญญาณประสาทในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บเพียงชั่วคราว การบาดเจ็บชนิดนี้ทำให้เกิดการสลายตัวของ Myelin sheath (ปลอกหุ้มที่พันรอบเส้น Axon เกิดจาก Schwann cell) แต่ส่วนของ Axon ยังคงมีความต่อเนื่องปกติ และในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บนั้นเมื่อมีการสร้าง Myelin ขึ้นมาทดแทน การทำงานของเส้นประสาทก็จะกลับคืนดังเดิม [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] การบาดเจ็บชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการซ่อมแซมเส้นประสาท เนื่องจากสามารถหายจากการบาดเจ็บด้วยตนเองได้

2.2.2 Axonotmesis การบาดเจ็บชนิดนี้เป็นการบาดเจ็บโดยส่วนของ Axon เกิดการฉีกขาด แต่ส่วนของ Endoneurial tube (เยื่อหุ้มบางที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่าง Axon) และ Schwann cell ที่อยู่รอบ Axon ยังปกติดี การบาดเจ็บในส่วนนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนของปลายของส่วนที่ขาด (Wallerian degeneration) การฟื้นตัวสามารถเกิดขึ้นได้เองตามปกติหรือใกล้เคียงปกติเมื่อเกิดการงอกของ Axon ผ่านภายใน Endoneurial tube และไปยังอวัยวะส่วนปลายที่มันเคยควบคุมการทำงานอยู่ [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] โดยการบาดเจ็บแบบนี้ไม่จำเป็นต้องใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อของเส้นประสาทเข้ามาช่วยในการรักษา

2.2.3 Neurotmesis การบาดเจ็บชนิดนี้จะเกิดจากการขาดของเส้นประสาทออกจากรากอย่างสมบูรณ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทุกส่วนของเซลล์ประสาท เมื่อ Axon ถูกตัดขาดจะพบการเปลี่ยนแปลงที่ตัวเซลล์โดยตัวเซลล์จะบวม พบการสลายตัวของ Nissl bodies การเคลื่อนที่ของ Nucleus ขาดขอบตัวเซลล์ [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของ Rough endoplasmic reticulum เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นเหล่านี้ว่า Chromatolysis การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการบาดเจ็บแบบ Neurotmesis นี้จะมีผลต่อการส่งผ่านสารภายใน Axon (Axonal transport) โดยพบว่าสารเคมีส่งผ่านในระบบ Axonal transport จะมีสารที่เกี่ยวข้องกับการนำสัญญาณประสาทลดลง ในทางกลับกันสารที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Axon มากขึ้นและจะสามารถพบการเปลี่ยนแปลงที่กลับคืนสู่ภาวะปกติหรือพบการตายของเซลล์ประสาทได้ในระหว่าง 4-6 สัปดาห์หลังการบาดเจ็บและยังพบการเปลี่ยนแปลงของบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บของ Axon ด้วย การบาดเจ็บแบบ Neurotmesis มีการขาดออกจากกันของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในเส้นประสาทด้วย

ทำให้ปลายทั้งสองข้างของเส้นประสาทแยกห่างออกจากกัน ซึ่งในบางกรณีไม่สามารถดึงมาชนกันแล้วเย็บได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยวิศวะกรรมเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย [ภาณุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539; ผาสุข มหรรฆานุเคราะห์, 2541]

## 2.3 การเปลี่ยนแปลงของ Axon ที่บาดเจ็บ

### 2.3.1 การเปลี่ยนแปลงของใยประสาทในส่วนต้นของบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ (Retrograde degeneration)

การเปลี่ยนแปลงของ Axon ในส่วนต้นของบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ รวมถึงส่วนตัวเซลล์ประสาท เรียกว่า Retrograde degeneration โดยเกิดย้อนขึ้นไปหนึ่งถึงสองปล้องของ Node of Ranvier (ส่วนของ Axon ที่ไม่มี Myelin sheath ที่เชื่อมระหว่าง Axon ที่มี Myelin sheath หุ้ม) ทำให้โครงสร้างที่เหลือของ Axon มีลักษณะเป็น Endoneurial tube (เยื่อหุ้มบางที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเส้น Axon) อันประกอบด้วยส่วนของ Endothelial connective tissue sheath (ส่วนพันหุ้มรอบอันเกิดจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีรูปร่างแบบแบน) ร่วมกับส่วนของ Schwann cell ซึ่งภายในจะมีลักษณะกลวง สิ่งเหล่านี้เกิดจากการทำลายส่วนของ Myelin sheath และ Axon โดยกระบวนการเริ่มจาก 36 ชั่วโมง หลังจากการขาดของเส้นประสาทจะมีการแยกตัวออกของชั้น Myelin จาก Axon ทำให้เยื่อ Myelin มีลักษณะเป็นรอยย่น โดยการแยกตัวจะเริ่มมาจากชั้นในและในที่สุดจะเกิดถึงชั้นนอกด้วย หลังจากนั้นเยื่อจะไม่ยึดเกาะติดกันและจะแยกเป็นชั้นเล็กชั้นน้อย และเศษของ Myelin Sheath เหล่านี้รวมถึง Axon จะถูกจับกินโดย Schwann cell และ Macrophage ทำให้บริเวณที่ทำลาย Myelin Sheath จะปกคลุมด้วยส่วน Cytoplasm ของ Schwann cell เท่านั้น โดยเศษของ Myelin จะอยู่ใน Cytoplasm ของ Schwann cell และจะถูกย่อยหมดภายใน 18 วัน ส่วนต้นที่ขาดของ Axon ที่ติดกับส่วนของตัวเซลล์จะมีการสร้าง Collateral sprout (แขนง Axon ที่เจริญออกมาจาก Node of Ranvier ของส่วนต้นบริเวณที่ Axon ไม่ฉีกขาด) และ Terminal sprout (ส่วนที่งอกขึ้นมาใหม่จาก เส้นประสาทที่มีเยื่อ Myelin หุ้ม จากส่วนปลายด้านต้นที่ขาด) ขึ้นมาใน 2-3 วันแรก และส่วนของ Terminal sprout ในแต่ละใยประสาทที่มีเยื่อ Myelin หุ้ม หนึ่งๆจะมีได้หลาย Sprout และในช่วง 6 วันหลังการบาดเจ็บจะเกิดมัดเส้นประสาท ขนาดเล็ก (Minifascicle) จำนวนมาก ซึ่งแต่ละอันจะถูกหุ้มด้วย Perineurium (เนื้อยึดต่อที่ห่อหุ้มกลุ่มของเส้น Axon) หลายๆชั้น โดยจำนวนชั้นของ Perineurium จะมีอยู่ 1-5 ชั้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติซึ่งมี 5-7 ชั้น และชั้นทั้งหมดจะถูกหุ้มอยู่ใน Basement membrane และมีการสมมติฐานว่าชั้น Perineurium เกิดจาก Endoneurial fibroblast ที่เรียงตัวโดยรอบกลุ่มของ Axon และ Schwann cell และกลายเป็น Perineurium ในที่สุด ในส่วนของ Sprout ที่งอกออกมาจะเจริญออกไปยังส่วนปลายที่ขาดเข้าภายในกลุ่มของ Schwann cell ที่เรียง

ตัวเป็นแนวที่เรียกว่า Band of Bungner ซึ่งอยู่ภายใน Endoneurial tube โดยจะงอกด้วยอัตราเร็ว 1-2 มม/วัน [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2538; Yannas IV., 2001]

### 2.3.2 การเปลี่ยนแปลงของใยประสาทในส่วนปลายของบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ (Wallerian degeneration)

การเปลี่ยนแปลงของ Axon ในส่วนปลายของบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ (Distal stump) เรียกว่า Anterograde หรือ Wallerian degeneration จะพบการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตเห็นได้ภายหลัง 2-3 วัน หลังการบาดเจ็บ โดยพบการบวมของ Axon และเกิดการสลายตัวด้วยการย่อยสลายโดยเอนไซม์ในร่างกาย (Proteolysis) และพบการแตกของ Myelin ออกเป็นชิ้น ซึ่งกำจัดโดยการ Phagocytosis (การกลืนกินของเซลล์) ของ Schwann cell และ Macrophage (เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่กลืนกินอนุภาคสิ่งแปลกปลอมในร่างกายมนุษย์) ทำให้เหลือแต่ Endoneurial tube (ได้แก่ ส่วนที่เป็นโครงสร้างรูปทรงกระบอกของ Basement membrane ที่ปราศจาก Axon และ Myelin) และ Schwann cell (ที่อยู่ใน Endoneurial tube) และจะเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยพบการแบ่งตัวจะเกิดสูงสุดในวันที่ 3 ภายหลังการบาดเจ็บ และเรียงตัวเป็นแนวที่เรียกว่า Band of Bungner ผ่าน Basement membrane ที่ว่างเปล่าของ Endoneurial tube การเรียงตัวเป็นแนว Band of Bungner นั้นจะเป็นทางนำ Axon sprout เพื่อให้เกิดการงอกใหม่ นอกจากนี้ Schwann cell ยังช่วยสังเคราะห์ Neurotrophic factors (สารซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของ Axon และการดำรงอยู่ของเซลล์ประสาท) และในภายหลัง Axon ที่เจริญใน Band of bungner เปลี่ยนแปลงไปเป็น Axon ที่สมบูรณ์และเกิด Myelination (การสร้างปลอก Myelin หุ้มเส้น Axon) จนกระทั่งส่วนปลายของ Sprout ใด Sprout หนึ่งจาก Axon หนึ่งติดต่อกับส่วน Peripheral target (อวัยวะส่วนที่เส้นประสาทควบคุมการทำงาน) จึงจะทำให้ Sprout อื่น ๆ จาก Axon เดียวกันฝ่อสลายไป การจับของ Sprout กับ Peripheral target จะใช้ Growth cone ( Axon sprout ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการบวมมีลักษณะเป็นตุ่ม) ซึ่งมี Microspike (ส่วนปลายขนาดเล็กที่มีลักษณะแหลมคล้ายหนาม) เป็นตัวไปเกาะยึด และภายหลังจากนั้นจะกระตุ้นให้มีการ Maturation (การเจริญเติบโตเต็มที่) ในเวลาต่อมา (ภานุพันธ์ ทรงเจริญ , 2539; Evans, G., 2000]

### 2.3.3 การปิดกั้นของเส้นประสาทที่ขาด

การปิดกั้นของเส้นประสาทที่ขาดเกิดจากส่วนต้นและปลายที่ขาดไม่อยู่ในระนาบเดียวกัน รวมถึงเกิดจากแรงที่ทำให้ของเหลวไหลออกมาจากเส้นประสาทที่ขาด (Endoneurial fluid) ที่ป้องกันไม่ให้เส้นประสาทแฟบน้อยกว่าแรงดึงที่ทำให้เส้นประสาทแฟบและมีการสร้าง Neuroma

(เนื้องอกที่ประกอบด้วยเซลล์และเส้นใยของระบบประสาท) มาปิดกั้นทั้งส่วนต้นและส่วนปลายของส่วนปลายที่ขาดทั้งสองด้านจึงทำให้เกิดการปิดกั้นของเส้นประสาท [Yannas IV., 2001]

## 2.4 การซ่อมแซมเส้นประสาทกรณีการบาดเจ็บชนิดรุนแรงเพื่อให้เกิดการงอกใหม่ของเส้นประสาท

การซ่อมแซมเส้นประสาท ได้มีการปฏิบัติมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันในปัจจุบันได้ใช้วิธีการทางการแพทย์ร่วมกับเทคโนโลยีสมัยใหม่เข้าช่วยในการซ่อมแซมเส้นประสาท ซึ่งในขณะนี้ขอจัดแบ่งการซ่อมแซมเส้นประสาทออกเป็น 3 หัวข้อหลักคือ การเย็บซ่อมเส้นประสาท (Nerve repair), การใช้เนื้อเยื่อจากสิ่งมีชีวิตสำหรับใช้ปลูกถ่าย (Nerve graft) และการใช้ท่อนำเส้นประสาทจากวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

### 2.4.1 การเย็บซ่อมเส้นประสาท (Nerve repair)

เป็นการเย็บเชื่อมต่อเส้นประสาทที่บาดเจ็บโดยใช้วัสดุที่เหมาะสมเช่น Nylon เป็นต้น โดยให้ส่วนปลายที่ขาดหรือส่วนปลายที่ตกแต่งให้หน้าตัดเรียบซึ่งเป็นส่วนของเนื้อประสาทที่ดีแล้ว (ในกรณีเส้นประสาทบาดเจ็บจะต้องทำการตัดบางส่วนทิ้งซึ่งก่อให้เกิด Nerve gap) ทั้งสองด้านเข้ามาสบกัน โดยไม่ก่อให้เกิดความตึงขึ้นตรงรอยเย็บหรือก่อให้เกิดน้อยที่สุด โดยหน่วยที่เล็กสุดของเส้นประสาทที่สามารถทำการเย็บซ่อมได้ คือ Fasciculus หรือ Fascicle [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539]

### 2.4.2 การใช้เนื้อเยื่อจากสิ่งมีชีวิตสำหรับใช้ปลูกถ่าย (Nerve graft)

เมื่อเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทแบบที่มีระยะขาด (Nerve gap) ทั้งจากการเกิดอุบัติเหตุโดยตรงหรือจากการตกแต่งหน้าตัดของเส้นประสาทส่วนที่ขาดให้เหมาะสมต่อการซ่อมแซม มีทางเลือกหนึ่งของการซ่อมแซมนั้นคือการใช้ Nerve graft เชื่อมต่อระหว่างปลายที่ขาดเพื่อให้ Axon sprout งอกผ่าน Nerve graft ไปสู่ Distal stump ของเส้นประสาทส่วนปลายได้อย่างมีระเบียบ อีกทั้งป้องกันไม่ให้ Axon sprout ออกสู่เนื้อเยื่อข้างเคียงโดยรอบที่ไม่ใช่ส่วนปลายของเส้นประสาทที่ต้องการรักษา รวมถึง Nerve graft ยังสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อ Axon sprout ที่กำลังเจริญอยู่ในส่วนของ Nerve graft ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการเชื่อมต่อคือ Autogenous nerve graft (เนื้อเยื่อประสาทสำหรับปลูกถ่ายที่ได้จากร่างกายตนเอง) โดยเส้นประสาท Donor (เส้นประสาทที่นำมาใช้หรือได้รับ) ที่ใช้มากที่สุดคือ เส้นประสาท Sural (เส้นประสาทบริเวณน่อง) [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] ส่วนการใช้ Allografts (ส่วนของเนื้อเยื่อที่ได้มาจากบุคคลอื่น) ซึ่งต้องใช้ Immunosuppression (การป้องกันหรือลดการผลิตการเกิด

ภูมิคุ้มกัน เช่น การใช้อยากดภูมิคุ้มกันจากการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่ของตนเอง เพื่อป้องกันการปฏิเสธเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายเข้าไป เป็นต้น) เป็นทางเลือกหนึ่งแต่ผลที่ได้ยังไม่เป็นที่น่าพึงพอใจ เหมือนกับที่ได้จาก Autografts ยิ่งไปกว่านั้น Allografts ยังไม่พิจารณาใช้สำหรับภาวะ Traumatic (ภาวะที่มีการบาดเจ็บ)หรือภาวะ Oncologic (ภาวะที่มีเนื้องอก) ในการใช้ Allografts พร้อมกับการใช้ Immunosuppression เนื่องจากจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันตนเองของร่างกาย [Gregory D., 2000]

นอกจากนี้ยังมีการนำส่วนของอวัยวะอื่นที่มีลักษณะเป็นท่อมาเป็นส่วนเชื่อมต่อเส้นประสาทที่มีระยะขาด (Gap) ได้แก่ Autogenous vein graft (เนื้อเยื่อหลอดเลือดดำที่ได้จากตนเองสำหรับใช้ปลูกถ่าย) และ Muscle autograft (เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่ได้จากตนเองสำหรับใช้ปลูกถ่าย) เป็นต้น [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] และได้มีการศึกษาโดยใช้ เนื้อเยื่อหลอดเลือดดำของตนเองใช้สำหรับทำท่อนำเส้นประสาท (Autogenous venous nerve conduit, AVNC) ที่ได้จาก Right femoral vein ของ Lewis rats เพศผู้ โดยทำการตัดส่วน Sciatic nerve ด้านขวายาว 10 มม. และเชื่อมต่อ AVNC กับปลาย Sciatic nerve ที่ขาด การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Vessel lumen (ช่องของหลอดเลือดที่ใส่เชื่อมต่อเข้าไป) ยังคงอยู่ ในขณะที่มี Nerve regeneration และจากการสังเกตพบว่า Axon จะเจริญในท่อนำเส้นประสาทเมื่อมี Migration ของ Schwann cells เข้าสู่ส่วนที่ขาดของเส้นประสาทอย่างสมบูรณ์ และเนื่องจากผลของ Schwann cells แสดงบทบาทในกระบวนการงอกใหม่โดยการเพิ่ม การเจริญของ Axon อย่างค่อยเป็นค่อยไปและหลั่งสาร Neurotrophic factors ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้มีสมมติฐานว่า Schwann cells อาจใช้ประกอบร่วมในการปรับปรุงเพื่อสร้างท่อนำเส้นประสาทที่เหมาะสมสำหรับการงอกใหม่ของ Axon และ อาจให้โครงสร้างที่จำเป็นของเซลล์ประสาทสำหรับการเจริญของ Axon โดยใช้ พื้นผิว Schwann cells นั้นเองเป็นส่วนฐาน (Substrata) [Tseng C. และคณะ, 2006]

ในกรณีของ Muscle autograft จะใช้ส่วนของ Basement membrane ที่หุ้มกล้ามเนื้อ ในการใช้ทางคลินิกนั้นพบว่า สามารถรับรู้ความรู้สึก Two point discrimination (การรับรู้ความรู้สึกที่สามารถแยกกระหว่างจุด 2 จุดได้) ได้ระหว่าง 6-19 มม. [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539]

แต่อย่างไรก็ดี การผ่าตัดที่ใช้ในปัจจุบันสำหรับการซ่อมแซมการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย คือการนำ Donor nerve จากส่วนที่ปกติของร่างกายมาใช้มีข้อจำกัด คือ

- เนื้อเยื่อประสาทมีอยู่อย่างจำกัด
- เสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรค กรณี Xenograft (เนื้อเยื่อได้รับจากสัตว์ต่างสายพันธุ์ สำหรับใช้เพื่อการปลูกถ่าย) หรือ Allograft (เนื้อเยื่อได้รับจากสัตว์สายพันธุ์เดียวกัน สำหรับใช้เพื่อการปลูกถ่าย)

- ความแตกต่างในโครงสร้างและขนาดของเส้นประสาท Donor กับเส้นประสาทส่วนที่ขาดที่ต้องการรักษา [Gregory D., 2000]

#### 2.4.3 การใช้ท่อนำเส้นประสาทจากวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

ได้มีความพยายามในการศึกษาวิจัยโดยการใช้ ความรู้ความเข้าใจในด้านโครงสร้าง และทางชีวเคมีของ Autografts ในการสร้างท่อนำประสาทโดยใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อเลียนแบบปฏิกิริยาของ Nerve regeneration ที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลเพื่อการกลับคืนสู่สภาพเดิมของ Nerve โดยวิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถรักษาความเสียหายของเส้นประสาทที่ขาดโดยลดข้อจำกัดที่มีจากการใช้ Donor nerve [Gregory D., 2000; Bellamkonda R., 2006]

ดังนั้นทางเลือกหนึ่งที่เป็นไปได้สำหรับใช้แทน Autogenous tissue คือการใช้ท่อนำเส้นประสาทจากวิศวกรรมเนื้อเยื่อและสิ่งที่เป็นสำหรับการเจริญของ Axon ที่ใช้ร่วมกันในการสร้างท่อนำเส้นประสาทจากวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold), เซลล์ที่ส่งเสริมการเจริญของเส้นประสาท (Support cells) (เช่น Schwann cells เป็นต้น) และโกรทแฟคเตอร์ (ได้แก่ bFGF, NGF เป็นต้น) [Gregory D., 2000; Bellamkonda R., 2006]

2.4.3.1 โครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) มีการศึกษาโดยใช้ท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตขึ้นจากวัสดุหลายชนิดเพื่อเชื่อมปลายที่ขาดของเส้นประสาท ทั้งวัสดุจากธรรมชาติ และวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น สำหรับใช้เป็นโครงสร้างที่เหมาะสมสำหรับการงอกใหม่ของ Axon วัสดุที่ได้จากธรรมชาติสามารถเข้ากับร่างกายได้เป็นอย่างดี ลดความเป็นพิษ (Toxic effect) และเพิ่มการเคลื่อนย้าย (Migration) ของ Support cells เช่น Schwann cell เป็นต้น วัสดุจากธรรมชาติที่ใช้ได้แก่ หลอดเลือดดำ และคอลลาเจน เป็นต้น แม้วัสดุจากธรรมชาติจะมีข้อดีดังกล่าว แต่พบข้อจำกัดคือ สามารถกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ขึ้นกับตัวผู้ป่วยเองและขึ้นกับแหล่งที่มาของวัสดุด้วย และการใช้วัสดุที่เป็นโปรตีนจากธรรมชาติยังมีความแตกต่างกันในแต่ละครั้ง เนื่องจากยากต่อการควบคุมกระบวนการผลิต ส่วนวัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์สามารถปรับเปลี่ยนให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมตามต้องการได้ [[Gregory D., 2000]

โดยท่อนำเส้นประสาทในอุดมคติควรมีคุณสมบัติดังนี้

- เข้ากับร่างกายได้ดี
- คงไว้ซึ่งโครงสร้างที่ต้องการอย่างน้อยนานเพียงพอสำหรับ Regeneration และ Maturation ของเส้นประสาท
- สลายตัวหลังจากการซ่อมแซมสำเร็จเพื่อป้องกันการระคายเคืองในระยะยาว
- สามารถคงรูปหรือคืนรูปเดิมได้เพื่อป้องกันการกดทับใยประสาท



- มีรูปทรงแบบนี้เพื่อรับรองได้ว่าสารอาหารหรือสิ่งที่จำเป็นต่อการงอกของเส้นประสาทสามารถผ่านได้ [Pfister L. และคณะ, 2004]

มีการศึกษาวิจัยโดยการใช้ 75:25 Poly(DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) และ Poly(L-lactic acid) (PLLA) สำหรับเป็น Scaffold ผลิตโดยใช้กระบวนการ Extrusion ซึ่งขึ้นรูปเป็น ท่อนำเส้นประสาทยาว 12 มม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1.6 มม. และ เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 3.2 มม. และนำไปเชื่อมปลายเส้นประสาท sciatic ที่ขาดของ Sprague Dawley rat และทำการประเมินหน้าที่การทำงาน (Walking track analysis) ประจำทุกเดือน โดยตรวจสอบทางรูปร่างลักษณะ(Histomorphology) ในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 พบว่าท่อนำเส้นประสาทจาก PLGA ทั้งหมดยังคงยึดหยุ่นและหนุสามารถเคลื่อนที่อย่างเหยียดสุดโดยปราศจากการแตกหักของท่อนำเส้นประสาทอย่างไรก็ตามท่อนำเส้นประสาทจาก PLGA สามารถถูกทำลายบางส่วนและทำให้ยึดขยายขึ้นได้ที่ 18 มม. (โดยการเสียสภาพและการยึดขยายออกสามารถเกิดขึ้นในกรณีที่มีการเสื่อมสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท) การตรวจสอบทางรูปร่างลักษณะ (Histomorphology) ได้แสดงให้เห็นถึงการงอกใหม่ของAxon (Axonal regeneration) และการเจริญของเนื้อเยื่อประสาทผ่านใน ท่อนำเส้นประสาทและเข้าสู่ Distal nerve stump ที่ 12 สัปดาห์ ส่วน Walking track analysis แสดงให้เห็นการกลับคืนสู่สภาพเดิมของกล้ามเนื้อโดยการควบคุมด้วยระบบประสาท แต่ท่อนำเส้นประสาทจาก PLGA บางส่วนเสียหายและยึดขยายที่เวลามากกว่า 12 สัปดาห์ ส่วนท่อนำเส้นประสาทจาก PLLA ให้โครงสร้างที่คงทน และพบว่า PLLA มีนัยสำคัญในการปรับปรุงความแข็งแรงและความคงทนเหนือกว่า 75: 25 PLGA และได้มีการเสนอว่า PLLA porousท่อนำเส้นประสาทอาจใช้เป็น Scaffold สำหรับ Peripheral nerve regeneration ในส่วน Walking track analysis ได้ประเมินประจำทุกเดือนจนถึงเดือนที่ 8 พบว่าท่อนำเส้นประสาทจาก PLLA ยังคงมีโครงสร้างไม่เปลี่ยนแปลงและพบว่ามีเนื้อเยื่อและการเกิดหลอดเลือดขึ้น รวมถึงไม่พบการเสียหายของท่อนำเส้นประสาทเมื่อมีการเคลื่อนที่ของหนุ และไม่พบการยึดขยายของท่อนำเส้นประสาทในเดือนที่ 8 [Gregory D., 2000]

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาที่ใช้ท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตจาก 1 % Polyelectrolyte complex ของ Polysaccharide alginate และโคโคซานซึ่งมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างคล้ายโครงร่างตาข่ายโดยมีการเชื่อมขวางกันระหว่างพอลิเมอร์ (Cross-linked hydrogel) เนื่องจากมีประจุตรงข้ามกันใน Aqueous solution และใน In vivo นั้น Polymer เชิงซ้อนนี้จะสลายตัวอย่างช้าๆโดยการแทนที่ด้วยประจุ (Ion substitution) และการสลายตัวจากเอนไซม์ภายในร่างกาย (Enzymatic degradation) ในงานวิจัยนี้ท่อนำเส้นประสาทผลิตโดย Spinning mandrel technology ในส่วนของการทดสอบคุณสมบัติของท่อนำเส้นประสาทใน In vivo จะทำ

ใน Rat peripheral nerve ใช้ Gap ขนาด 3 มม. โดยจะเชื่อมด้วยท่อนำเส้นประสาทที่มีความยาว 6 มม. และได้ทำการประเมินความเข้ากันได้กับร่างกายและความสมบูรณ์ของท่อนำเส้นประสาทที่สัปดาห์ที่ 2 และ 4 จากการวิจัยสรุปได้ว่าการพัฒนาท่อนำเส้นประสาทจาก Polyelectrolyte complex ของ Polysaccharide alginate และโคโตซานแสดงการพองตัวและดูดน้ำเข้าหาตัวได้สูงถึง 90 % โดยน้ำหนัก ซึ่งสามารถก่อให้เกิดรูพรุน จึงรับรองได้ว่าสามารถใช้เป็นช่องทางในการแลกเปลี่ยนสารอาหารได้ และท่อนำเส้นประสาทที่พองตัวนี้ยังมีความแข็งแรงต่ำ ดังนั้นสามารถกำจัดความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการกดทับเส้นประสาท รวมถึงยังมีความคงตัวเชิงกลเพื่อคงไว้ซึ่งรูปร่างที่คงที่และมีการตอบสนองต่อการอักเสบเพียงเล็กน้อย [Bellamkonda R., 2006]

นอกจากนี้ Scaffold ยังรวมถึงโมเลกุลซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของเซลล์มีการใช้ Laminin, Fibronectin และ คอลลาเจน สามารถส่งเสริมการงอกของ Axon ดังนั้นจึงใช้รวมอยู่ในท่อนำเส้นประสาท [Yannas IV., 2001] โดยพบว่าสิ่งเหล่านี้เป็น Extracellular matrix molecule ที่พบอยู่ใน Basement membrane ที่สร้างขึ้นโดย Schwann cell จึงสามารถเข้ากับร่างกายได้และนอกจากนี้ในส่วนของ Laminin ยังพบว่ายังแบ่งได้หลายชนิดและมีผลต่อระบบประสาทแตกต่างกันไป เช่นกรณี Laminin-1 ช่วยส่งเสริมการงอกและการ Migration ของเส้นประสาท เป็นต้น ในส่วนของ Fibronectin พบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญของเส้นประสาทและนอกจากนี้ยังพบว่า Schwann cell อาจใช้ Laminin ในการหยุดกระบวนการ Migration ของ Schwann cell และช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น Myelin sheath [Yannas IV., 2001; Murtoimaki S., 2000] ในส่วนงานวิจัยได้มีการศึกษาที่ใช้ท่อนำเส้นประสาทเชื่อมเส้นประสาทที่ขาดและเพื่อส่งเสริมการงอกของเส้นประสาทจึงได้มีการใช้เจลคอลลาเจน ที่มีสารที่ส่งเสริมการเจริญของเส้นประสาท (Growth promoting substances) โดยเติมภายในท่อนำเส้นประสาทก่อนที่จะนำไปเย็บติด แต่อย่างไรก็ตามถ้า matrice จากคอลลาเจนไม่สลายตัวโดยกระบวนการ Proteolysis ตัว matrice จากคอลลาเจนสามารถจะรบกวนกระบวนการงอกใหม่ โดยจะเป็นตัวขัดขวางการเคลื่อนย้าย (Migration) ของเซลล์ แม้ว่าเจลคอลลาเจน matrice นั้นจะมีสารที่ส่งเสริมการเจริญของเส้นประสาทก็ตาม ในงานวิจัยนี้ได้มีการใช้ท่อนำเส้นประสาทจากซิลิโคน ซึ่งเติมสารเพื่อส่งเสริมการงอกของเส้นประสาท 3 ชนิดนั้นคือ คอลลาเจน, Laminin และ Fibronectin โดยเชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ที่มี Gap ขนาด 10 มม. ใน Sprague –Dawley rat จากการศึกษาพบว่าหลังการฝัง Tube 6 สัปดาห์ กลุ่มท่อนำเส้นประสาทจากซิลิโคนที่เติมด้วยเจลจากคอลลาเจนซึ่งมี Laminin และ Fibronectin เป็นส่วนประกอบ พบว่ามีการสร้างเส้นประสาทใน Tube 90 % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีการสร้างเส้นประสาทเพียง 60 % แต่พบว่าทั้งกลุ่มที่เติมสารสำคัญ (Mixture-filled) และกลุ่มควบคุม (Empty tubes) เมื่อตรวจสอบโดยตัดตาม

ขวาง (Cross sections) เส้นประสาทที่งอกใหม่ พบว่ามีการสร้างหลอดเลือดและเส้นประสาทที่มีเยื่อ Myelin หุ้ม จำนวนมากภายในบริเวณ Endoneurium อย่างไรก็ตามท่อนำเส้นประสาทที่ได้จาก Mixture-filled tubes จะมีการเจริญของเส้นประสาทมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำเส้นประสาททกลวงโดยเจริญดีกว่าทั้งส่วน Endoneurium และส่วน Perineurium รวมถึงในกลุ่ม Mixture-filled จะมีจำนวนของเส้นประสาทที่มีเยื่อ Myelin หุ้ม มากกว่าและพื้นที่หน้าตัดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำเส้นประสาททกลวง ในงานวิจัยนี้ได้เสนอว่าคอลลาเจนเจลที่ประกอบด้วย Laminin และ Fibonectin สามารถเพิ่มศักยภาพในการงอกใหม่ของเส้นประสาท [Chen Y. และคณะ, 2000]

2.4.3.2 Support cells ได้มีการทดลองที่สนับสนุนว่า Schwann cells (Scs) เป็นสิ่งที่เพิ่ม Axon regeneration และยังปลดปล่อย Bioactive factors จึงได้มีการใช้ Schwann cells (Scs) เป็นส่วนประกอบใน Scaffold เพื่อการงอกใหม่ของเส้นประสาทโดยการแสดง Adhesion molecules (โมเลกุลที่ช่วยในการติดของเซลล์) บนพื้นผิวของ Plasma membrane (เยื่อหุ้มเซลล์) อีกทั้งยังสร้างโครงข่ายเพื่อส่งเสริมการงอกใหม่ของ Axon (แต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานของ Schwann cells) [Gregory D., 2000] การศึกษาวิจัยที่ใช้ Schwann cell บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาทจาก Poly(glycolic acid) เชื่อมต่อใน Sciatic nerve ที่มีระยะขาด 10 มม. ของ Nude mice พบว่าจำนวนของ Axon และผลวิเคราะห์การเดิน (Walk track analysis) ที่แปลผลออกมาเป็นค่า The sciatic functional index (SFI) ของกลุ่มทดลองดังกล่าวนี้สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ใช้ Silicone และกลุ่มที่ใช้ Autograft) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 2 เดือน [Komiyama, T. และคณะ, 2004] และการศึกษาอื่นที่ใช้ Schwann cell บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาทจาก Polyhydroxybutyrate (PHB) และเชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ในหนู Sprague-Dawley ที่มีระยะขาด 10 มม. พบว่ากลุ่มที่ใช้ Schwann cell มีการเจริญของ Axon และ Schwann cell เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใช่ Schwann cell [Tohill, M. และคณะ, 2004] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ใช้ Schwann cell บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาทจากคอลลาเจนเชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ในหนู Wistar ที่มีระยะขาด 20 มม. พบว่ากลุ่มที่บรรจุ Schwann cell มีจำนวนของเส้นใยประสาทมากกว่ากลุ่มที่ไม่มี Schwann cell อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [Stang, F., 2005]

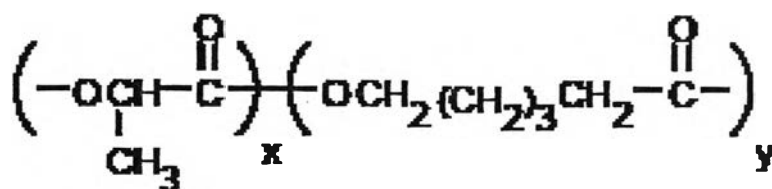
2.4.3.3 โกรทแฟคเตอร์ (สารที่ส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อหรือเซลล์) โดยภายหลังการขาดของเส้นประสาทการสังเคราะห์ โกรทแฟคเตอร์จะถูกควบคุมโดยทั้งส่วนของเส้นประสาทที่ขาดและส่วนของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาท (Nonneuronal cell) โดยเฉพาะ

Schwann cell ทั้งจากส่วนต้นและส่วนปลายของเส้นประสาทที่ขาด [Kwon K. และ Matsuda T. , 2005] โดยสามารถโกรทแฟคเตอร์ที่สกัดได้จากภายนอกเข้าไปในโดยใช้ร่วมกับท่อนำเส้นประสาท ซึ่งพวกโกรทแฟคเตอร์เหล่านี้ได้แก่ Nerve growth factor (NGF), Brain derived neurotrophic factor (BDNF), และ Fibroblast growth factor (FGF), แต่ปรากฏว่า NGF ให้ผลดีที่สุดและแสดงผลในการป้องกันการตายของเส้นประสาทรับความรู้สึกที่ขาดได้อย่างสมบูรณ์โดยการใช้เป็นส่วนที่ให้เสริมจากภายนอกเข้าไป (Exogenous administration) [Gregory D., 2000] ในหลายการศึกษาวิจัยได้มีการใส่ NGF เข้าไปในท่อนำเส้นประสาทที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาทที่ขาด โดยการศึกษาจะประเมินผลในช่วง 3-5 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยประสาทและมีการเพิ่มขึ้นของเส้นใยประสาทที่มีเยื่อ Myelin หุ้ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่า NGF เพิ่มการงอกใหม่ของเส้นประสาทรับความรู้สึก (Sensory neuron) และเพิ่มการงอกใหม่ของ Axon อย่างมีนัยสำคัญแต่พบว่าการเพิ่มการงอกใหม่นี้จะให้เฉพาะช่วงต้น แต่จะไม่ปรากฏหลังจาก 4 สัปดาห์ ที่พบว่าการงอกใหม่จะมีจำนวน เส้นประสาทที่มีเยื่อ Myelin หุ้มเท่ากัน ในส่วนของ Acid fibroblast growth factor (aFGF) และ Basic fibroblast growth factor (bFGF) พบว่า ทั้ง aFGF และ bFGF เพิ่มการเจริญของ Axon อย่างมีนัยสำคัญ และในการศึกษาแบบ *In vitro* ช่วยเพิ่มการเจริญและการเคลื่อนย้าย (Migration) ของ Fibroblast, Endothelial cell, Schwann cell อย่างมีนัยสำคัญ [Yannas IV., 2001] หลังจากที่มีการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย โมเลกุลของ bFGF และ Fibroblast growth factor receptor (FGFR) จะสูงขึ้นในปมประสาท (Ganglia) ทั้งในส่วนต้นและส่วนปลายที่ขาดของเส้นประสาท แหล่งที่พบหลักๆของ bFGF และ FGFR คือ เส้นประสาทรับความรู้สึก (Sensory neuron) , Schwann cell และ Macrophage ที่จะพบในตำแหน่งที่มีการบาดเจ็บในระหว่างที่มีการเสื่อมสลาย แบบ Wallerian degeneration และพบว่า bFGF ที่ได้จาก Macrophage สามารถกระตุ้นการเจริญของ Schwann cell และ Fibroblast ระหว่างการเกิด Wallerian degeneration และ ยังมีผลเกี่ยวกับการส่งเสริมการเกิดหลอดเลือดขึ้นใหม่ระหว่างการซ่อมแซมเส้นประสาท และนอกจากนี้ในการศึกษาแบบ *In vitro* ยังพบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของ Schwann cell แล้ว ยับยั้งการเกิด Myelination ระหว่างการเจริญของ Axon และจากการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ผลของ bFGF ที่ใส่จากภายนอกเข้าไป ในการเพิ่มการงอกใหม่ของเส้นใยประสาทส่วนปลายโดยศึกษาในหนูทดลองที่ทำการตัดเส้นประสาท Sciatic nerve พบว่าเพิ่มการเจริญของเส้นใยประสาทและเพิ่มการสร้างหลอดเลือดของเส้นใยประสาทที่งอกใหม่ [Grothe C. และ Nikkhah G., 2001]

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ PLCL

PLCL ได้จากส่วนประกอบ 2 ชนิดคือ L-lactide และ Caprolactone เป็นพอลิเมอร์ผสมที่ได้จากพอลิเมอร์ 2 ตัว คือ Poly(L-lactide) และ Polycaprolactone ตามลำดับ Poly(L-lactide) เป็น Aliphatic polyester ที่ใช้บ่อยครั้งทางการแพทย์ รวมถึงเป็น Semicrystalline polymer ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายด้วยกระบวนการ Hydrolysis ค่อนข้างช้า โดยมี Glass transition temperature (Tg) และ Melting temperature (Tm) ประมาณ 55-58 องศาเซลเซียส และ 215 องศาเซลเซียส ตามลำดับและมีความเป็นผลึกประมาณ 37 % ส่วน Polycaprolactone เป็น Linear polyester สร้างโดยการนำ Caprolactone มาผ่านกระบวนการ Ring-opening polymerization Polycaprolactone เป็น Semicrystalline polymer ซึ่งมี Tg และ Tm ค่อนข้างต่ำ (Tg = -60 องศาเซลเซียส และ Tm = 60 องศาเซลเซียส) และมีความเป็นผลึกประมาณ 50 % Polycaprolactone มีความยืดหยุ่นสูงและมีค่า Modulus ต่ำ อัตราการสลายตัวช้ากว่า Poly(L-lactide) [Hakkarainen, M., 2002; Barbucci, R., 2002]

ในงานวิจัยนี้ใช้ PLCL (รูปที่ 2.3) เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่ยังไม่มีการจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด แต่เนื่องจากเข้ากับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) ได้โดยไม่เป็นอันตรายกับเซลล์สิ่งมีชีวิต, เป็นวัสดุที่มีการสลายตัวช้าและแข็งแรง นอกจากนี้ยังไม่พบความเป็นพิษ (Toxicity) จึงนำมาใช้ขึ้นรูปเป็นท่อนำเส้นประสาทสำหรับการงอกใหม่ของเส้นประสาทส่วนปลาย [Zhu Y. และคณะ, 2006 ;2007] รวมถึงประเทศไทยยังไม่มีการผลิตท่อนำเส้นประสาทจากพอลิเมอร์สำหรับใช้ภายในมนุษย์ มีเพียงแต่การใช้เส้นประสาทจากตัวผู้ป่วยเอง (Autografts) [ภาณุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] มาใช้เป็นท่อนำเส้นประสาทเพื่อให้เกิดการงอกใหม่ หรือเย็บซ่อมเส้นประสาทที่ขาดเชื่อมกันเท่านั้น เนื่องจาก PLCL เป็นวัสดุที่ใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable scaffold) พบการศึกษาวิจัยที่ผลิตโคพอลิเมอร์ของ PLCL อัตราส่วน Lactide ต่อ Caprolactone 84:16 โดยโคพอลิเมอร์ PLCL ที่ผลิตขึ้นจะเป็นโพลิเมอร์ที่มีความยืดหยุ่น (Elastomeric) ที่อุณหภูมิห้องเนื่องจากมี Glass transition temperature (Tg = 9 องศาเซลเซียส) ต่ำอย่างไรก็ตามเนื่องจากโดยทั่วไป PLCL ค่อนข้างเฉื่อยและไม่มีส่วนที่เพิ่มการเจริญของเซลล์ เพราะ PLCL มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และขาดส่วนที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่พึงประสงค์ (Bioactive domain) กับสิ่งมีชีวิต ในการวิจัยนี้จึงได้ใช้วิธีการปรับเปลี่ยนพื้นผิว (Surface modification) เพื่อปรับปรุงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และส่วนของ PLCL (Substrate membrane) เพราะการที่จะเกิดการตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุที่ฝังภายในร่างกายได้นั้น โดยทั่วไปจะขึ้นกับคุณสมบัติพื้นผิวของวัสดุ (Surface properties) [Zhu Y. และคณะ, 2007] ในปัจจุบันพบข้อมูลการนำ PLCL copolymer มาใช้ในงานศึกษาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) และงานทางด้านระบบนำส่งยา (Drug delivery system)



รูปที่ 2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของ PLCL

ที่มา : <http://www.sial.com/aldrich>

### 2.5.1 งานศึกษาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

PLCL ได้ถูกนำมาใช้อย่างหลากหลายในงานศึกษาวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากเข้ากับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) ได้ดี รวมถึงยังสามารถปรับส่วนประกอบของโคพอลิเมอร์ ให้มีลักษณะตามที่พึงประสงค์ได้ เช่น เพื่อปรับความยืดหยุ่นและความคงทนแข็งแรง เป็นต้น โดยถ้าเพิ่มส่วนของ Lactide การสลายตัวของพอลิเมอร์จะเร็วขึ้นและจะเพิ่มความแข็งแรงของพอลิเมอร์ และถ้าเพิ่มส่วนของ Caprolactone การสลายตัวของพอลิเมอร์จะช้าลงและพอลิเมอร์สามารถถูกยึดได้ง่ายขึ้น [Lu XL. และคณะ, 2006; Mo X. และคณะ, 2004]

ปี 2004 Mo X. และคณะ ศึกษาวิจัยโดยใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75 :25 สำหรับผลิตเป็น Scaffold ในรูป Electrospun PLCL nanofiber เพื่อศึกษาผลของ Electrospinning parameter อันได้แก่ Needle diameter, ความเข้มข้นของโพลิเมอร์, และความต่างศักย์ที่มีผลต่อ Electrospinning ของ PLCL รวมถึงศึกษาการเจริญของ Smooth muscle cell (SMC) และ Endothelial cell (EC) บน Electrospun PLCL nanofiber พบว่าทั้ง SMC และ EC สามารถเจริญได้ดีบนเส้นใยขนาดเล็กของ Scaffold นอกจากนี้ EC ยังคงไว้ซึ่งรูปร่างลักษณะ (Phenotype shape) ที่ปกติบน Scaffold โดยรวมพบว่าผลที่ได้สนับสนุนการเข้ากันได้กับเซลล์ของ Scaffold เส้นใยจาก PLCL ที่ขึ้นรูปด้วยวิธี Electrospinning จึงมีการเสนอแนะว่าเส้นใยขนาดเล็กที่สังเคราะห์ขึ้นชนิดนี้ให้ทั้งข้อดีในด้านการเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและสามารถสร้างเป็น Extracellular matrix ที่สร้างขึ้นในระดับนาโนเมตร จึงคาดหวังว่าจะสามารถนำไปใช้ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ [Mo X. และคณะ, 2004]

#### 2.5.1.1 วิศวกรรมเนื้อเยื่อของหลอดเลือด (Vascular tissue engineering)

มีการศึกษาวิจัยที่ใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50 :50 โดยขึ้นรูปเป็นท่อที่มีรูพรุนขนาดเล็ก (Microporous PLCL-base tubular foam) เพื่อใช้เป็น Scaffold สำหรับ Vascular graft โดยศึกษาใน *In vitro* ซึ่งใช้ Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) สำหรับปลูกถ่ายลง

บน Scaffold ในการศึกษานี้ได้ทำการผลิต PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50 :50 ทั้งแบบที่ประกอบด้วยคอลลาเจน และแบบที่ประกอบด้วย Heparin โดยวิธี Co-electrospinning เพื่อให้ได้เส้นใยระดับน้อยกว่า 100 นาโนเมตร ถึง ไมโครเมตร การใส่คอลลาเจน (ในที่นี้ใช้ คอลลาเจน ชนิดที่ 1) เพื่อส่งเสริมการติดของเซลล์ (Cell adhesion) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferation) ส่วนการใส่ Heparin (ในที่นี้ใช้ Tri-n-butylamine salt of heparin (heparin-TBA)) ในที่นี้เพื่อต้องการให้แสดงคุณสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant activity) [Kwon K. และ Matsuda T., 2005]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50:50 สำหรับสร้างเป็น Scaffold ที่มีลักษณะเป็นท่อ (Tubular scaffold) เพื่อศึกษาความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) และการสลายตัว (Degradation) ใน In vivo โดย Tubular scaffold เตรียมโดยใช้เทคนิค Extrusion-particulate leaching แล้วทำการปลูกถ่าย Smooth muscle cells (SMC) ลงบน Scaffold แล้วนำไปฝังใน Nude mice (ติดตามผลหลังจาก 1, 3, 5, 8 และ 15 สัปดาห์) ผลการศึกษาพบว่า SMC แสดงลักษณะโครงสร้าง (Morphology) และหน้าที่ (Biofunction) อย่างเป็นปกติบน scaffold จาก PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50:50 รวมถึงพบ Vascular smooth muscle matrices ภายใน Scaffold ด้วยจากผลดังกล่าวนี้แสดงว่า PLCL scaffold เข้ากับ SMC ได้ดีและอาจนำไปใช้ประโยชน์สำหรับ Vascular tissue engineering นอกจากนี้พบว่า scaffold จาก PLCL ที่ฝังใน Nude mice ยังสลายตัวช้าโดยที่เวลาผ่านไป 15 สัปดาห์ยังมีมวลคงเหลือ 81.3 % ดังแสดงในตารางที่ 1 (โดยส่วนของ Caprolactone จะสลายตัวเร็วกว่าส่วนของกรดแลคติก [Jeong S. และคณะ, 2004])

ตารางที่ 2.1 แสดงมวล (%) ของ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50:50 เมื่อเวลาผ่านไป 1, 3, 5, 8 และ 15 สัปดาห์

Analysis of scaffold material explanted

	Composition (LA:CL, mol%) <sup>a</sup>	$M_n^b$ ( $\times 10^3$ )	$M_w^b$ ( $\times 10^3$ )	PDI <sup>b</sup>	Mass (%)
Control	51:49	186 (100%)	305 (100%)	1.30	100
In vivo 1 week	53:47	188 (101%)	282 (92%)	1.50	98.7
3 weeks	54:46	100 (54%)	233 (76%)	2.32	96.3
5 weeks	54:46	90 (48%)	210 (68%)	2.35	92.1
8 weeks	56:44	75 (40%)	174 (57%)	2.43	89.3
15 weeks	58:42	43 (23%)	122 (39%)	2.54	81.3

มีการใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75 :25 ในการศึกษาสำหรับสร้างเป็น Scaffold ของหลอดเลือดโดยใช้วิธี Electrospinning เพื่อขึ้นรูปเป็น scaffold เส้นใยขนาดเล็กที่มีการเรียงตัวเป็นระเบียบ (Aligned PLCL nanofibrous scaffold) ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลาง (Diameter) ของเส้นใยโดยทั่วไปจะประมาณ 500 nm การขึ้นรูปเช่นนี้จะเป็นการเลียนแบบรูปแบบการเรียงตัว

โดยรอบของเซลล์และ Fibril (Circumferential orientation) ที่พบในชั้นกลางของหลอดเลือดแดง (Medial layer ของ native artery) และปลูกถ่าย Human coronary artery smooth muscle cells (SMCs) เพื่อศึกษาการติด (Adhesion) และการเจริญของ SMCs บน Scaffold โดยใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75 :25 ที่ขึ้นรูปเป็นฟิล์มและ Tissue culture polystyrene (TCPS) เป็นกลุ่มควบคุม (เหตุที่ใช้ Vascular SMCs ในการศึกษาเนื่องจากไม่เพียงแต่ Vascular SMCs จะคงไว้ซึ่ง ความตึงของผนังหลอดเลือด (Vascular wall tension) แต่ยังมีผลต่อการเจริญของหลอดเลือด (Vascular growth) รวมถึงการปรับปรุงและซ่อมแซมหลอดเลือด) ผลศึกษาพบว่า Scaffold จาก PLCL ที่ขึ้นรูปโดยวิธี Electrospinning มีนัยสำคัญในการปรับปรุงการติดและอัตราการเจริญ (Proliferation rate) ของ SMCs มากกว่า PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75 :25 ที่ขึ้นรูปเป็นฟิล์ม และได้มีการเสนอแนะว่าการขึ้นรูปให้มีลักษณะการเรียงตัวเป็นระเบียบร่วมกับคุณสมบัติที่ดีของ พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต (Synthetic biodegradable polymer) ซึ่งอาจใช้เป็นต้นแบบของ Scaffold สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อของหลอดเลือด [Xu C. และคณะ, 2004]

นอกจากนี้ยังมีการใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75 :25 ในการศึกษาเพื่อขึ้นรูปเป็น Scaffold ของหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็ก (Small diameter biodegradable blood vessel scaffold) โดยใช้วิธี Electrospinning เพื่อใช้เป็น Extracellular matrix ที่มีเส้นใยขนาดเล็กสำหรับ วิศวกรรมเนื้อเยื่อหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular tissue engineering) ในที่นี้ได้ทำการปลูกถ่าย Human coronary artery smooth muscle cells (SMC) และ Endothelial cell (EC) ลงบน Scaffold พบว่าทั้ง SMCs และ EC ติดและเจริญได้เป็นอย่างดีบน Scaffold ที่มีเส้นใยขนาดเล็กของ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75 :25 นั้นแสดงว่า PLCL ที่ขึ้นรูปเป็นเส้นใยขนาดเล็กมีเข้ากับสิ่งมีชีวิตได้ดี [Mo X. และคณะ, 2003]

#### 2.5.1.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกอ่อน ( Tissue engineering of cartilage)

มีการใช้ PLCL เพื่อสร้างเป็น scaffold สำหรับ Cartilage repair นอกจากนี้ยังพบข้อมูลการใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75 :25 (ซึ่งสังเคราะห์โดยใช้ Nontoxic zirconium acetylacetonate เป็น Initiator ของ Polymerization) โดยนำมาขึ้นรูปเป็น Thin polymer films สำหรับศึกษาการเจริญของ Chondrocyte (ได้จาก Costal cartilage ของซี่โครงผู้ป่วยอายุ 3 ปี ซึ่งได้รับการผ่าตัดที่ทรวงอก) บน Films เหล่านี้เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นได้แก่ poly(caprolactone-co-trimethylene carbonate) สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 30:70, poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 30:70 และ poly(caprolactone-co-glycolide) สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 90:10 จากการศึกษาพบการเจริญของ Chondrocyte ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แม้จะมีประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์ติดและแพร่กระจายบน Scaffold ได้ดีก็ตาม



แต่โดยทั่วไปพบว่าพอลิเมอร์ทุกชนิดเหมาะสำหรับการเจริญของ Chondrocyte [Zhao K และคณะ, 2003]

### 2.5.1.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูก (Bone tissue engineering)

มีการใช้ N-methyl-2-pyrrolodone มาใช้ร่วมกับโคพอลิเมอร์ชนิดอื่นในการผลิตเป็น Medical implant ซึ่ง PLCL เป็นตัวเลือกหนึ่งที่สามารถใช้เป็นส่วนประกอบ Medical implant ในที่นี้ผลิตเพื่อใช้สำหรับกระตุ้นการเจริญของกระดูกเนื่องจากส่วนประกอบของพอลิเมอร์ที่ผสมเข้าด้วยกันมีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (Osteogenic) และยังช่วยเพิ่มการซ่อมแซมกระดูกหลังจากกระดูกหัก [U.S. Patent, 2005]

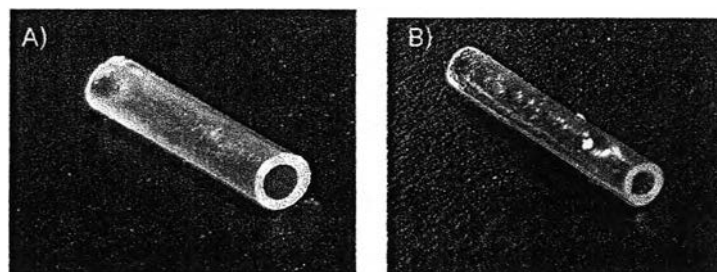
รวมถึงยังมีการใช้ PLCL ประกอบร่วมกับ Hydroxyapatite และ Tricalcium phosphates สำหรับศึกษาในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูก PLCL สังเคราะห์โดยใช้ L-lactide และ Caprolactone ด้วยกระบวนการ Ring-opening polymerization และจะทำการผสม Hydroxyapatite หรือ Tricalcium phosphates เป็นส่วนประกอบ เพื่อสร้างเป็นโคพอลิเมอร์ PLCL ที่มีตัวประกอบแต่ง (PLCL copolymer composites) ส่วนการขึ้นรูปนั้นจะทำเป็นฟิล์ม (ทั้งของโคพอลิเมอร์ธรรมดาและโคพอลิเมอร์ที่มีสารประกอบแต่ง (Composite materials)) ด้วยวิธี Solvent casting และทำให้ฟิล์มมีโครงสร้างเป็นรูพรุนโดยให้อยู่ภายใต้ Supercritical CO<sub>2</sub> ที่ 3300 psi ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยขนาดรูพรุนจะอยู่ในช่วง 40-80 μm จากการศึกษาพบว่าฟิล์มที่มีรูพรุน (ทั้งของโคพอลิเมอร์ธรรมดาและโคพอลิเมอร์ที่มีสารประกอบแต่ง) สลายตัวใน Ringer solutions เร็วมากกว่าฟิล์มที่ไม่มีรูพรุน (Untreated non-porous films) [Aydin H., 2004]

นอกจากนี้ยังมีการใช้ Scaffold แบบฟองน้ำของ PLCL (PLCL sponge) สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 5 :95 โดยนำไปเคลือบด้วย Ca/apatite สำหรับทำเป็นวัสดุใส่ในกระดูกที่เสียหายเพื่อช่วยสร้างเนื้อกระดูก (Bone-filling material) และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Non coated control sponges) โดยทำการฝังเพื่อทดสอบในส่วนเปลือกของกระดูกต้นขา (Femur cortical) ที่ทำให้บาดเจ็บในหนูและภายใน Dorsal subcutaneous space แล้วตรวจสอบทาง Histological หลังการฝังที่เวลา 2, 4, 33 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า วัสดุที่ใช้ฝัง (Implants) พบปริมาณกระดูกเท่าๆกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบการตอบสนองการอักเสบเล็กน้อย ส่วนการสลายตัวของพอลิเมอร์พบว่าส่วนใหญ่ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้พบว่า Osteoblasts เพิ่มจำนวนได้ดีบน Ca/apatite-coated material ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบเล็กน้อยเท่านั้น จากการศึกษาสรุปได้ว่าการเคลือบ PLCL sponges ด้วย Ca/apatite ช่วยในติดของ Osteoblasts แต่ไม่ได้เพิ่ม

จำนวนการสร้างเนื้อกระดูกมากไปกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อศึกษาใน *In vivo* [Holmbom J. และคณะ , 2005]

#### 2.5.1.4 วิศวกรรมเนื้อเยื่อของเส้นประสาทส่วนปลาย (Peripheral nerve tissue engineering)

มีการศึกษาที่ใช้ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ Lactide : Caprolactone 50:50 เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar ที่มีระยะขาดเท่ากับ 10 mm พบว่าท่อนำเส้นประสาท PLCL มีการสลายตัว (สังเกตด้วย Light microscopy และ Electron microscopy) เกือบสมบูรณ์ที่ 180 วัน และให้คุณสมบัติเชิงกลที่ดีสามารถทำการเย็บได้ โดยง่ายโดยท่อนำเส้นประสาทไม่แตกและนอกจากนี้ยังพบการงอกของ Axon ที่มี Myelin หุ้ม และการกลับคืนหน้าที่ของเส้นประสาทไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเส้นประสาทของตัวหนู Wistar เอง (Autologous nerve grafts) ที่ 180 วัน นอกจากนี้พบว่ามี Foreign body giant cell ที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยรอบท่อนำเส้นประสาทแต่ไม่พบการอักเสบเกิดขึ้น , ไม่พบเนื้อเยื่อพังผืดโดยรอบและท่อนำเส้นประสาทไม่ก่อให้เกิดพิษ [Nicoli N. และคณะ, 1996a; 2000b] และมีการศึกษาในประเทศไทยที่ทำการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL (รูปที่ 2.4) ด้วยวิธีที่แตกต่างกันได้แก่ วิธี Dip-coating ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากทำได้ง่ายแต่ความยาวของท่อนำเส้นประสาทถูกจำกัดด้วยขนาดของพิมพ์ และอีกวิธีหนึ่งคือการใช้เทคนิคการปั่นแบบหลอม (Melt-extrusion) สามารถผลิตท่อที่มีความยาวมากขึ้นโดยใช้แม่พิมพ์แบบวงแหวนจากการทดลองพบว่าสามารถขึ้นรูปได้เป็นท่อขนาดตามต้องการ แต่ยังคงมีฟองอากาศ ซึ่งต้องแก้ไขในกระบวนการผลิตต่อไป [Somsamak P. และคณะ, 2005] นอกจากนี้ยังพบการกล่าวอ้างถึงการใช้ PLCL ในการศึกษาเพื่อสร้างเป็นท่อนำเส้นประสาทโดยกล่าวอ้างว่าให้ผลดีกว่าที่ใช้ Polyglactin grafts ที่เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบ รวมถึงยังพบการงอกของเส้นประสาทได้ดี [Middle East Technique University-Biotechnology Research Unit, 2006]



รูปที่ 2.4 ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL A) ผลิตด้วยวิธี Dip-coating และ B) ผลิตด้วยวิธี Melt-extrusion (ที่มา : Somsamak P และคณะ, 2005)

### 2.5.1.5 วิศวกรรมเนื้อเยื่อของหลอดอาหาร (Esophageal tissue engineering)

มีการศึกษาวิจัยที่ใช้ PLCL ในงานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อของหลอดอาหาร แต่เนื่องจากพบว่า PLCL เข้ากับเซลล์ได้ต่ำ (Poor cytocompatibility) เนื่องจากมีลักษณะเฉื่อยและไม่ได้ช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์และการติดของเซลล์เพราะ PLCL มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และขาดส่วนที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ฟังก์ชัน (Bioactive domain) กับสิ่งมีชีวิต ในการวิจัยนี้จึงได้ใช้วิธีการปรับเปลี่ยนพื้นผิว (Surface modification) เพื่อปรับปรุงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และส่วนของ PLCL (Substrate membrane) เนื่องจาก PLCL ไม่มีคุณสมบัติดัง Polymer-protein interaction กล่าวข้างต้น จึงได้ใช้วิธี Aminolysis ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่าง Diamine และ Polyester matrix (ในที่นี้คือ PLCL ) เพื่อให้เกิด Free amino groups ที่พื้นผิว Polyester matrix และโปรตีนจึงสามารถจับกับพื้นผิวของ PLCL ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการดังกล่าวเพื่อเชื่อมติด Fibronectin และคอลลาเจนบน PLCL membrane เพื่อส่งเสริมการติดยึดและการเติบโตของเซลล์ทั้ง 3 ชนิดของ Esophageal cells (ได้แก่ Smooth muscle cell (SMC), Fibroblast, และ Epithelial cell (EC) เป็นต้น) ขั้นตอนแรกจะทำการ Aminolyzed พื้นผิวของ PLCL ด้วย 1,6-hexanediamine เพื่อให้ได้ Amino groups (ซึ่ง Amino groups จะเป็น Active sites) และจะนำ Fibronectin (Fn) และคอลลาเจน (Col) มาจับกับ Amino groups โดยใช้ กลูทาราลดีไฮด์ (เป็น Coupling agent) ผลการศึกษาพบว่าทั้ง PLCL ที่จับด้วย Fibronectin และคอลลาเจน, PLCL-Fn และ PLCL-Col ตามลำดับ) มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของ SMC และ EC ส่วนทั้ง Modified และ Unmodified PLCL ส่งเสริมการเจริญของ Fibroblasts และยังพบว่า PLCL-Fn ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของ EC มากกว่า PLCL-Col การศึกษานี้สรุปว่า PLCL-Fn ได้รับการคาดหวังว่าจะสามารถใช้เป็นวัสดุที่ใช้เป็น Scaffold ของเนื้อเยื่อหลอดอาหาร เพื่อส่งเสริมการเจริญสำหรับเซลล์ทั้ง 3 ชนิดของ Esophagus (Smooth muscle cell (SMC), Fibroblast, และ Epithelial cell (EC)) เพื่อใช้ในการผลิต Artificial esophagus substitute ต่อไปในอนาคต [Zhu Y. และคณะ, 2007]

ในการศึกษาต่อมาคณะวิจัยกลุ่มเดียวกันได้ทำการศึกษาการเจริญของเซลล์เยื่อหลอดอาหาร (Esophageal epithelium regeneration) โดยใช้ Fibronectin เชื่อมติดบน Scaffold (Fn bonded scaffold) จาก PLCL โดยเตรียม PLCL ด้วยวิธีเดียวกันและเชื่อมติด Fn บน PLCL ด้วยกระบวนการเดิม ในการศึกษานี้จะทำการปลูกถ่าย Porcine esophageal epithelial cells บน Fn bonded scaffold และทดสอบการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ปรับปรุงคุณสมบัติดังกล่าว) โดยใช้ Tissue culture polystyrene (TCPS) plate เป็น กลุ่มควบคุมบวกและทำการเปรียบเทียบ Mitochondrial activity (Absorbance at 490 nm) ซึ่งจะแปรค่าเป็นการแสดงถึง Cell activities ผลการศึกษาพบว่า Fn bonded

scaffold เพิ่มการเจริญของ EC บน Scaffold โดยมี Mitochondrial activity สูงกว่า กลุ่มควบคุม หรือ TCPS plate แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในเวลา 14 วัน ในการศึกษาแบบ *In vitro* [Zhu Y. และคณะ, 2007]

#### 2.5.1.6 วิศวกรรมเนื้อเยื่อของผิวหนัง (Skin tissue engineering)

มีการศึกษาวิจัยที่ใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50 :50 ที่มีลักษณะเป็นรูพรุนสำหรับใช้เป็นส่วนประกอบในผิวหนังเทียม 3 ชั้น (Triple layer artificial skin) สำหรับใช้รักษาบาดแผลที่ลึกในระดับผิวหนังแท้ (Full thickness wound) ในหนู และใช้เป็นต้นแบบสำหรับการงอกใหม่ของผิวหนังชั้นใน (Neodermis regeneration) ในการศึกษาที่ใช้ PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50 :50 เป็นส่วนชั้นกลางและชั้นล่าง (จากผิวหนังเทียมซึ่งมีทั้งหมด 3 ชั้น) ส่วนชั้นบนผลิตจาก Polyetherurethane เป็นชั้นเยื่อเลือกผ่าน (Semi-permeable layer) ซึ่งใช้สำหรับให้ของเหลว เช่น น้ำ เป็นต้น ผ่านออกมาได้ เพื่อป้องกันการคั่งของของเหลวภายในรูพรุน รวมถึงใช้เป็นชั้นป้องกันแบคทีเรีย ส่วนชั้นกลางและชั้นล่างนั้นเตรียมจาก PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50 :50 ซึ่งต่างกันในโครงสร้างรูพรุน ชั้นกลางจะเตรียมโดยกระบวนการแห้งเยือกแข็งและวิธี Salt leaching ซึ่งให้รูพรุนที่มีลักษณะเป็นทรงกลม (Spherical appearance) ส่วนชั้นล่างเตรียมโดยกระบวนการแห้งเยือกแข็งซึ่งให้รูพรุนที่มีลักษณะเป็นช่อง (Channel-like appearance) ชั้นกลางจะใช้เป็นชั้นชั่วคราวที่อยู่ระหว่างทั้ง 2 ชั้น จนกระทั่งหา Autograft ที่เพียงพอมาแทนเข้าไป ส่วนชั้นล่างใช้เป็น Scaffold สำหรับการงอกของเนื้อเยื่อ (Tissue regeneration) จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้ PLCL ที่มีรูพรุนสำหรับการงอกใหม่ของผิวหนังชั้น Dermis และพบว่า PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50 :50 มีอัตราการสลายตัวสูงจึงยากต่อการลอกชั้น Interface layer (ชั้นกลาง) ออกมาภายหลังจาก 3 สัปดาห์ สามารถแก้ปัญหาได้โดยแทนที่ส่วนชั้นกลางด้วย Non-biodegradable polymer ตัวอย่าง เช่น Polyetherurethane เป็นต้น ในการศึกษาที่ภายใน 1, 2, หรือ 3 สัปดาห์ ชั้น Interface layer (ชั้นกลาง) สามารถลอกออกได้และแทนด้วย Split skin graft (ผิวหนังส่วนแยกออกมาได้ เช่น Autograft เป็นต้น) ปรากฏว่าชั้นล่างสุด (Lower layer) เป็นส่วนฐานของแผลที่เหมาะสมสำหรับ Split-thickness skin graft การติดของ Split skin graft กับ Lower layer ป้องกันการหดของแผล ดังนั้นผิวหนังเทียมสามารถใช้เป็น Semi-permanent skin แทนที่ Full thickness wound จนกระทั่งหา Autograft ที่เพียงพอสำหรับแผลมาได้ [Groot J. และคณะ, 1995] นอกจากนี้ยังมีการใช้ PLCL เป็นส่วนประกอบสำหรับสร้างผิวหนังเทียมโดยขึ้นรูปเป็น Copolymer ของ L-lactide และ Caprolactone ที่มี 2 ชั้น และมี Poly(ether-urethane) เป็นชั้นนอก (Membrane dressing) เพื่อใช้เป็นผิวหนังเทียมสำหรับทดแทน (Biosynthesis skin substitute) [Term J. และคณะ, 1995]

### 2.5.2 งานทางด้านระบบนำส่งยา (Drug delivery system)

มีการใช้ PLCL เป็นตัวเลือกหนึ่งสำหรับเป็นส่วนประกอบหรือใช้ร่วมกับพอลิเมอร์อื่นๆ เพื่อสร้างเป็นอุปกรณ์สำหรับนำส่งยาในกรณีนี้คือ Drug eluting vascular stents ใช้สำหรับเป็นอุปกรณ์ที่ฝังในร่างกายช่วยในการนำส่งยา เพื่อใช้รักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับลดปัญหาการตีบตันของหลอดเลือดอีก (Restenosis) ภายหลังจากการรักษาแล้วด้วย Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) รวมถึงลดปัญหาในการเกิด Thrombosis ด้วย [U.S. patent, 2006]

รวมถึงยังมีการใช้ PLCL ในสิทธิบัตรทางเภสัชกรรมสำหรับทำเป็นอนุภาคขนาดเล็ก (Microparticle) ที่ใช้บรรจุยาขนาดสูงในรูปส่วนประกอบที่ผสมอนุภาคขนาดเล็กในรูปยาฉีด (Injectable microparticle composition) เพื่อรักษาภาวะติดสาร Opioid (Opioid addicts) โดยทำการทดสอบในมนุษย์ โดย Microparticle จะประกอบไปด้วย Biodegradable polymer matrix เช่น PLCL ซึ่งเป็นตัวเลือกหนึ่งที่กล่าวถึง และ Buprenorphine (เป็น Opioid) ซึ่งมีปริมาณมากกว่า 50 % โดยน้ำหนัก ของ Microparticle ซึ่งจะอยู่ในสูตรตำรับยาฉีด และ Buprenorphine จะปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ และในปริมาณที่เหมาะสม (Sustained release) เพื่อลดการใช้ Opioid ในมนุษย์ และสำหรับใช้รักษาภาวะ Opioid drug dependence (ภาวะติด Opioid เนื่องจากการใช้) และในกรณีที่เปลี่ยนสารออกฤทธิ์ (Active ingredient) เป็น Methadone หรือ naltrexone (ทั้ง 2 ตัวนี้เป็นสารที่ใช้รักษาภาวะ Opioid drug dependence โดยมีฤทธิ์เป็น Opioid antagonist) Microparticle ที่ผลิตขึ้นจะเป็นกระสวยยาสำหรับนำส่งยา (Drug delivery vehicles) ในสูตรตำรับยาฉีด Microparticle ที่ผลิตได้สามารถฉีดเข้าสู่ร่างกายได้และสลายตัวภายในร่างกาย เพื่อปลดปล่อยตัวยาออกมาอย่างช้าๆ (Sustained release) เข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย เพื่อให้อยู่ในช่วงเวลาที่ยังพอที่จะรักษาภาวะ Opioid drug dependence condition จุดประสงค์ของการรักษาประกอบด้วยอาการถอนการอยากยา (Withdrawal symptoms) การลดการบริโภคยา และในที่สุดเพื่อให้หายจากอาการอยากยา นอกจากนี้ PLCL ยังเป็นตัวเลือกหนึ่งสำหรับใช้เคลือบ Microparticle ที่ผลิตขึ้นในกรณีข้างต้นด้วย [U.S. patent, 2006]

นอกจากนี้มีการใช้ PLCL โดย Dunn et al. ซึ่งได้สิทธิบัตรสำหรับ Thermosetting system ในกระบวนการนี้จะประกอบด้วยสารสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่เชื่อมขวางกัน (Crosslinkable polymer) และมีผลรักษาภายใน In situ โดยช่วยนำส่งยา Thermosetting system จะสร้างตัวเป็นของแข็งด้วยการเติมตัวเร่งปฏิกิริยาโดยผ่านกระบวนการ Copolymerization ของ D,L-lactide หรือ L-lactide กับ Caprolactone เมื่อฉีดจะไหลเข้าภายในท่อหรือช่องที่มันอยู่และจะขึ้นรูปเป็นของแข็งหลังจาก 5-30 นาที ข้อดีคือ ง่ายในการฉีด แต่ข้อเสียคือจำกัดในการใช้ เนื่องจากมี

ปลดปล่อยออกมาปริมาณสูงมาก (Burst effect) เนื่องจากมี Lag time ของการเกิดการแข็งตัวของพอลิเมอร์ ซึ่งนำไปสู่ความเข้มข้นของยาที่สูง ในตำแหน่งของการออกฤทธิ์ของยา จึงทำให้เกิดอาการข้างเคียงของยาได้ ยิ่งไปกว่านั้นปฏิกิริยาการเชื่อมขวาง (Crosslinking reaction) เป็นปฏิกิริยาคายความร้อน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดการตายของเนื้อเยื่อที่อยู่โดยรอบและนอกจากนี้ การใช้ Benzoyl peroxide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อาจกระตุ้นให้เกิดเนื้องอก (Tumor) ได้ [U.S. patent, 2006]

## 2.6 ข้อมูลการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา

ข้อมูลของ Aliphatic polyesters ที่เป็น Biocompatible และ Biodegradable polymer ซึ่งองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้ทางการแพทย์และทางเภสัชกรรม พบเพียง Poly (D,L-lactide-co-caprolactone) ส่วน Poly (L-lactide-co-caprolactone) ยังไม่ผ่านการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา [Park H. และคณะ, 2005]

## 2.7 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับท่อนำเส้นประสาท

เนื่องจากมีผู้คิดค้นผลิตภัณฑ์ท่อนำเส้นประสาท ในรูปแบบต่างๆขึ้น จึงได้มีการจดสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับท่อนำเส้นประสาท ดังนี้ คือ

### 2.7.1 สิทธิบัตรต่างประเทศ

#### 2.7.1.1 ท่อสำหรับนำเส้นประสาทที่งอกใหม่ (Nerve regeneration conduit)

: United States Patent 5019087, ปี 1986

เจ้าของผลงาน : Nichols Joseph : American Biomaterials Corporation (Plainsboro, NJ)

กล่าวถึงวิธีการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทโดยใช้คอลลาเจนและ Laminin เป็นส่วนประกอบ โดยสังเขปดังนี้ คือ นำ Laminin ที่สกัดได้จากรกของมนุษย์ (Human placenta laminin) 15 มิลลิกรัม มาผสมกับคอลลาเจน (สกัดได้จากเอ็นของวัว) 15 มิลลิกรัม ที่กระจายในสารละลาย 0.5% กรด Lactic acid 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย Deionized, ultrafiltered water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 12 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นใช้ 0.29 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ในการตกตะกอนคอลลาเจนและ Laminin ที่ผสมกันอยู่ หลังจากนั้นสารผสมของคอลลาเจนและ Laminin (คอลลาเจน/laminin matrix) ที่กระจายตัวอยู่จะถูกนำไปใส่ภาชนะออกภายใต้สุญญากาศ และจะเทสารผสมที่ขึ้นของคอลลาเจนและ Laminin ในหลอดทดลองแล้วปั่นด้วยแกน Teflon (Teflon mandrel) อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนใสออกและ กด Mandrel ที่มี คอลลาเจน/laminin matrix เคลือบอยู่ ไว้ด้านข้างของหลอดทดลองเพื่อไล่

สารละลายของเหลวส่วนเกินออก และ คอลลาเจน/laminin matrix ยังคงอยู่บน Mandrel ภายใต้ อากาศแห้งใน Larminar flow hood 20 ชั่วโมง จะได้ท่อนำเส้นประสาทที่แห้งแล้วนำออกจาก Mandrel และนำไปเชื่อมขวางด้วย 0.3 % Formaldehyde solution ที่ pH 8 เป็นเวลา 15 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการล้างท่อนำเส้นประสาทที่เชื่อมขวางด้วยน้ำที่ผ่านการกรองและ ปราศจากสารก่อไข้ (Pyrogen-free deionized ultrafiltered water) และแช่ในน้ำ 3 ชั่วโมง เพื่อ กำจัด Formaldehyde ที่หลงเหลืออยู่และสุดท้ายนำท่อนำเส้นประสาทไปทำให้แห้งโดยนำไปวาง ภายใต้อากาศแห้งใน Larminar flow hood [U.S. patent, 1986]

### 2.7.1.2 โพลิเมอร์และการสร้างท่อนำเส้นประสาท (Polymer and nerve guide conduits formed thereof)

: United States Patent Application 20030060836, ปี 2001

เจ้าของผลงาน : Wang, Shu; Wan, Andrew C.A.; Yu, Hanry; Leong, Kam W (ไม่ระบุ หน่วยงาน)

กล่าวถึงการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทด้วยวิธี Dip-Coating/Immersion Precipitation Method และ Film Rolling Method โดยโพลิเมอร์ที่ใช้ คือ poly(phosphoesters) ในที่นี้คือ P(BHET-EOP/TC)(EOP/TC=80:20)

- Dip-Coating/Immersion Precipitation Method เตรียมโดยละลายโพลิเมอร์ใน Chloroform (โดยใช้ Magnetic stirring) หลังจากนั้นใช้ แกน Teflon (Teflon mandrel) จุ่มลงไปในการละลาย โพลิเมอร์ ในแนวตั้งจากด้วยความเร็ว 8.3 มิลลิเมตรต่อวินาที และแช่ในการละลาย 30 วินาที และ แกน Teflon mandrel จะถูกนำออกจากสารละลายด้วยความเร็ว 24 มิลลิเมตรต่อวินาที หลังจากนั้น จะนำไปแช่โดยตั้งในอ่าง Non solvent 10 นาที ต่อมนำไปเข้าเครื่องหมุน 10 นาที โดยให้อยู่ ในแนวแกนนอนเพื่อควบคุมความหนาของผนังท่อให้ใกล้เคียงกัน ต่อมนำไปแช่น้ำทิ้งไว้ตลอดคืน แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำมา Freeze-dried ที่ความดัน 0.1 Torr อย่างน้อย 1 สัปดาห์ และนำออกจาก Mandrel

- Film Rolling Method เตรียมโดยละลายโพลิเมอร์ในคลอโรฟอร์ม (โดยใช้ Magnetic stirring) และนำสารละลายโพลิเมอร์ 10 มิลลิลิตร มาขึ้นรูปในแม่พิมพ์ และนำไปไล่สารละลายออกเป็น เวลา 3 วันหลังจากนั้นตัดลอกออกจากแม่พิมพ์และตัดเป็นแผ่น และนำไปม้วนรอบ Mandrel ตาม เส้นผ่าศูนย์กลางที่ต้องการและเชื่อมโพลิเมอร์ให้เป็นท่อโดยใช้ Chloroform หรือ Dimethyl-formamide และนำไปทำให้แห้งใน Vacuum-dried อย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ [U.S. patent, 2001]

### 2.7.1.3 ท่อนำเส้นประสาททางการแพทย์ (Medical guide tubes)

: United States Patent 7135040, ปี 2002

เจ้าของผลงาน : Shu Wang, Bini Thumbarathy Balalerishnan : Agency for Science, Technology and Research.

กล่าวถึงวิธีการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทโดยใช้ poly(L-lactide-co-glycolide) ซึ่งขึ้นรูปโดยการดักเปียเป็นท่อโดยใช้เครื่องดักเปียสำหรับเส้นใยขนาดเล็ก (Microbraider) การขึ้นรูปวิธีการคือใช้เส้นใยของ 10:90 poly(L-lactide-co-glycolide) ที่ประกอบขึ้นจากเส้นใยเดี่ยว 10 เส้นหมุนเข้ารวมกันเป็นหนึ่งเส้น ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 ไมครอน และเส้นใย poly(L-lactide-co-glycolide) ที่หมุนเข้ารวมกันดังกล่าวจะทำเป็นมัด (Bundles) โดยมีเส้นใย (ที่หมุนรวมกันเป็นหนึ่งเส้น) 6 เส้นต่อ 1 มัด และเส้นใย 10 มัดจะถูกหมุนด้วยแกนหมุนของเครื่อง Microbraider และเครื่องดังกล่าวจะดักเปียเส้นใยโดยใช้มุมในการดัก (Braiding angle) 45 องศา เพราะฉะนั้นจะได้ท่อนำเส้นประสาทออกมาโดยมีความหนาประมาณ 200-300 ไมครอน และมีขนาดรูพรุนอยู่ระหว่าง 50-100 ไมครอน เมื่อนำไปใช้จะตัดความยาวให้เหมาะสมกับการใช้งาน [U.S. patent, 2002]

### 2.7.2 สิทธิบัตรในประเทศ : ไม่พบ

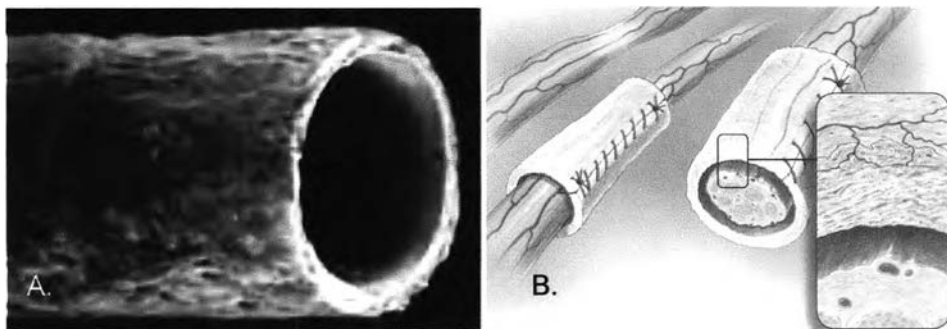
## 2.8 ท่อนำเส้นประสาทส่วนปลายที่มีในระบบการค้า

ในปัจจุบันมีการผลิตท่อนำเส้นประสาทในเชิงการค้าเพื่อใช้สำหรับรักษาการบาดเจ็บอย่างรุนแรงของเส้นประสาทส่วนปลาย โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 ใหญ่คือ กลุ่มที่ได้จากธรรมชาติ (Natural graft) และกลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthetic graft) โดยกลุ่มที่ได้จากธรรมชาติบางส่วนไม่ได้ระบุรายละเอียดข้อมูลมาให้แต่จะอ้างว่าใช้สำหรับการบาดเจ็บกรณีรุนแรงของเส้นประสาทส่วนปลายได้แก่ SURGISIS<sup>®</sup> Nerve Cuff (Cook Biotech Incorporated, West Lafayette, Indiana) ซึ่งได้จากเนื้อเยื่อได้ชั้นเยื่อเมือกในลำไส้เล็กของหมู (Porcine small intestine submucosa) และ Nerve conduits (AxoGen Inc., Gainesville, Florida) ซึ่งไม่ระบุแหล่งที่มา เพราะฉะนั้นในกรณีที่ยังเป็นส่วนของเนื้อเยื่ออยู่และได้จากสัตว์ต่างสายพันธุ์หรือของบุคคลอื่นควรนำมาใช้ในสัตว์ทดลองมากกว่าซึ่งน่าจะเหมาะกับกรณีใช้ในการศึกษาวิจัย ส่วนกลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์นั้นส่วนมากใช้ คอลลาเจนเป็นส่วนประกอบโดยขึ้นรูปเป็นท่อหรือนำมาใช้หุ้มส่วนของเส้นประสาทส่วนปลาย (ดูรูปที่ 2.5) ที่บาดเจ็บโดยส่วนใหญ่สกัดได้จากเอ็นของวัวและมีข้อห้ามใช้ในกรณีแพ้สารที่ได้รับจากวัว ได้แก่ NeuraGen<sup>™</sup> Nerve Guide (Integra Lifesciences



Corp. Atlanta, New Jersey USA) , Collagen Nerve Cuff (Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, New Jersey, USA) , NeuraWrap™ Nerve Protector (Integra Lifesciences Corp. Atlanta, New Jersey, USA), และ Collagen Nerve Wrap (Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, New Jersey, USA) โดยมีความยาวระหว่าง 2-4 cm และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในอยู่ระหว่าง 1.5-10 mm นอกจากนี้ยังมีพอลิเมอร์ตัวอื่น (ดูรูปที่ 2.5) ได้แก่ GEM Neurotube® Nerve ท่อนำเส้นประสาท(Synovis Micro Companies Alliance, St. Paul , Minnesota, USA) ผลิตจาก Polyglycolic acid , SaluBridge Nerve Cuff (Salumedica, LLC , Atlanta, Georgia, USA) ผลิตจาก Polyvinyl alcohol และ Neurolac® Nerve Guides (Polyganics B.V. ,Groningen , Netherland) ผลิตจาก Poly(DL-lactide-co-caprolactone) ในส่วนของท่อนำเส้นประสาทจาก Neurolac® Nerve Guides ซึ่งผลิตจาก Poly(DL-lactide-co-caprolactone) จะยึดหยุ่นมีลักษณะโปร่งแสงเข้ากับร่างกายได้เป็นอย่างดี ยังคงความแข็งแรงเชิงกลเมื่อเวลาผ่านไป 10 สัปดาห์และสลายตัวเมื่อเวลาผ่านไปหลายสัปดาห์และสลายตัวอย่างสมบูรณ์ที่เวลา 1 ปี ใช้กับเส้นประสาทส่วนปลายที่ขาดจากกันอย่างสมบูรณ์โดยมีระยะที่ขาดสูงได้ถึง 20 mm

ท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตขึ้นในท้องตลาดมีความยาวระหว่าง 20-63.5 mm และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในอยู่ระหว่าง 2-10 mm โดยระบุว่าใช้สำหรับกรณีเส้นประสาทส่วนปลายขาดโดยไม่ได้ระบุตำแหน่งของเส้นประสาทที่จะนำมาใช้ ในส่วนของการสลายตัวข้อมูลที่พบจะอยู่ระหว่าง 6 เดือน ถึง 1 ปี รายละเอียดข้อมูลผลิตภัณฑ์ท่อนำเส้นประสาทแต่ละประเภทแสดงดังตาราง 2.2 ถึง 2.4

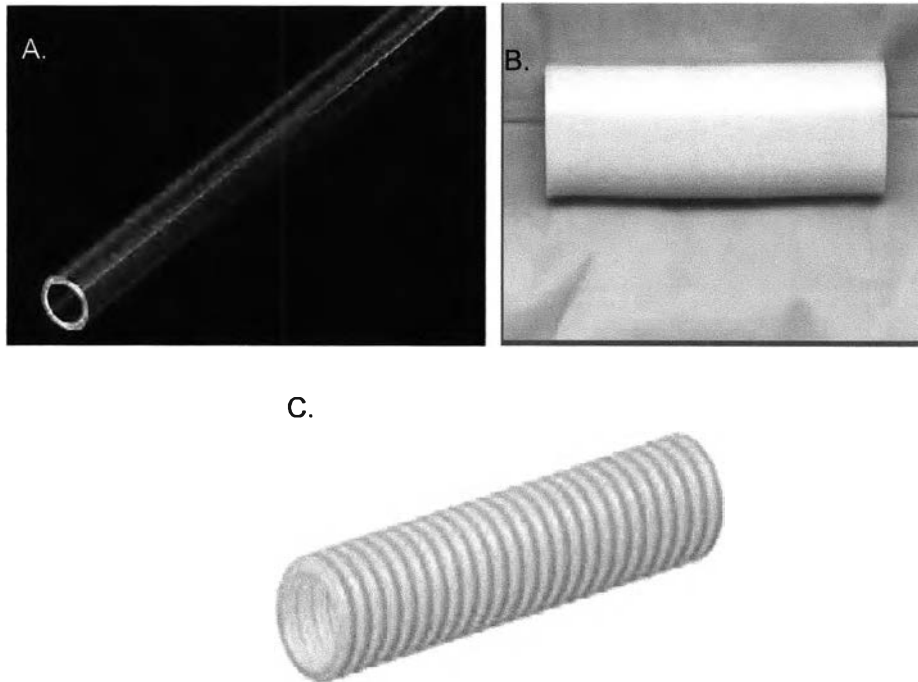


รูปที่ 2.5 ท่อนำเส้นประสาทที่สังเคราะห์ (Synthetic graft) จากคอลลาเจน A. NeuraGen™ Nerve Guide B.

NeuraWrap™ Nerve Protector

ที่มา : Integra Lifesciences Corp. NeuraGen® Nerve Guide (Clinicians). Available at URL : [http://www.integrals.com/corporate\\_info/profile.asp](http://www.integrals.com/corporate_info/profile.asp) Access date : Jan 22, 2007.

: tegra Lifesciences Corp. NeuraWrap® Nerve Protector (Clinicians). Available at URL : <http://www.integrals.com/products/?product=198> Access date : Jan 22, 2007.



รูปที่ 2.6 ท่อนำเส้นประสาทที่สังเคราะห์ (Synthetic graft) จากพอลิเมอร์ชนิดอื่นได้แก่ A. Neurolac® Nerve Guides ผลิตจาก Poly(DL-lactide-co-caprolactone) , B. SaluBridge Nerve Cuff ผลิตจาก Polyvinyl alcohol และ C. GEM Neurotube® Nerve ท่อนำเส้นประสาทผลิตจาก Polyglycolic acid

ที่มา : Synovis Micro Companies Alliance, Inc. GEM Neurotube® . Available at URL : <http://www.synovismicro.com> Access date : Dec 7, 2006.

: uMedica ,LLC. SaluBridge™ Physician Information. Available at URL : <http://www.salumedica.com/salubridgeinfodoc.htm> Access date : Dec 7, 2006.

: Bioresorbable solution POLYGANICS. 510(k) Summary of Safety and Effectiveness. Available at URL : <http://www.fda.gov/cdrh/pdf5/k050573.pdf> Access date : Dec 13, 2006.




ตารางที่ 2.2 ท่อนำเส้นประสาทสำหรับเส้นประสาทส่วนปลายที่ได้จากธรรมชาติ (Natural graft)

ชื่อผลิตภัณฑ์	ความยาว	เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน	วัสดุที่ใช้	บริษัทที่ผลิต	คุณสมบัติ	FDA (510 K) approved date
SURGISIS® Nerve Cuff	5 เซนติเมตร	2-7 มิลลิเมตร	เนื้อเยื่อได้ชั้นเยื่อเมือกภายในลำไส้เล็กของหมู (Porcine small intestinal submucosa)	Cook Biotech Incorporated, West Lafayette, Indiana	สำหรับซ่อมแซมเส้นประสาทส่วนปลายที่ขาด	2003
Nerve Conduits	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	ไม่ระบุที่มาของเนื้อเยื่อนำมาใช้ (ระบุเพียงว่านำเนื้อเยื่อที่จะมาปลูกถ่าย (Graft) มาทำให้ปราศจากส่วนที่เป็นเซลล์และกำจัดส่วนที่ทำให้เกิดการต่อต้านโดยระบบภูมิคุ้มกันออกไป	AxoGen Inc. , Gainesville, Florida	สำหรับซ่อมแซมเส้นประสาทส่วนปลายที่ขาด โดยอ้างว่าสามารถช่วยให้เกิดการงอกของเส้นประสาทอย่างรวดเร็ว เนื่องจากใช้สารที่ยับยั้งการทำงานของ Nerve growth inhibitor (สารยับยั้งการเจริญของเส้นประสาท ซึ่งจะถูกลดปล่อยออกมาเมื่อเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บแต่ในภาวะปกติสารนี้จะรักษาภาวะคงที่ (Homeostasis) ของ Axon)	ไม่พบข้อมูล

ตารางที่ 2.3 ท่อนำเส้นประสาทสำหรับเส้นประสาทส่วนปลายที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthetic graft) จากคอลลาเจน

ชื่อผลิตภัณฑ์	ความยาว	เส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน (มิลลิเมตร)	วัสดุที่ใช้	บริษัทที่ผลิต	คุณสมบัติ	FDA (510 K) approved date
NeuraGen™ Nerve Guide 	2 -3 เซนติเมตร	1.5-7	คอลลาเจน (Collagen) ที่สกัดได้จากเอ็นของวัว	Integra Lifesciences Corp. Atlanta, New Jersey	สำหรับซ่อมแซม เส้นประสาทส่วน ปลายที่ขาด	2001
Collagen Nerve Cuff	ไม่ระบุ	ไม่ระบุไว้	คอลลาเจน (Collagen)	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, New Jersey	สำหรับซ่อมแซม เส้นประสาทส่วน ปลายที่ขาด	2001
NeuraWrap™ Nerve Protector 	2 -4 cm	3-10	คอลลาเจน (Collagen) ที่สกัดได้จากเอ็นของวัว	Integra Lifesciences Corp. Atlanta, New Jersey	สำหรับซ่อมแซม เส้นประสาทส่วน ปลายที่ขาด	2004
Collagen Nerve Wrap	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	คอลลาเจน (Collagen)	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, New Jersey	สำหรับซ่อมแซม เส้นประสาทส่วน ปลายที่ขาด	2006

ตารางที่ 2.4 ท่อนำเส้นประสาทสำหรับเส้นประสาทส่วนปลายที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthetic graft) จากพอลิเมอร์ชนิดอื่น

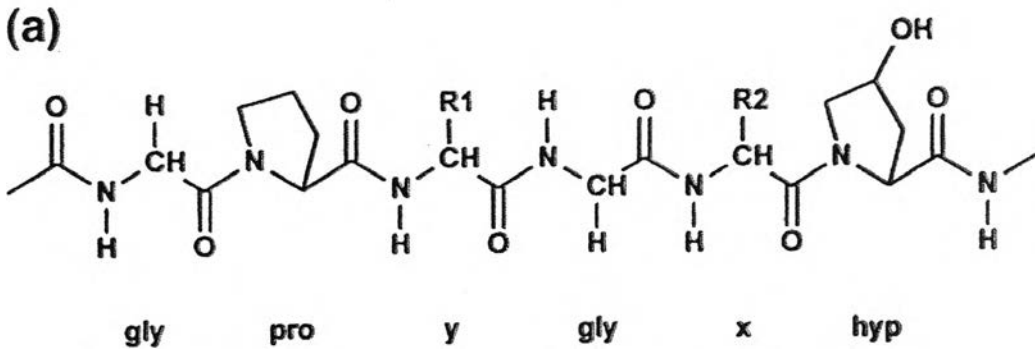
ชื่อผลิตภัณฑ์	ความยาว	เส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน(mm.)	วัสดุที่ใช้	บริษัทที่ผลิต	คุณสมบัติ	FDA (510 K) approved date
GEM Neuratube® Nerve Conduit 	20-40 mm.	2.3-8.0	Polyglycolic acid	Synovis Micro Companies Alliance, St. Paul , Minnesota	สำหรับเส้นประสาทส่วนปลาย โดยขึ้นรูปเป็นท่อนมี ผนังย่นเป็นลอนเพื่อให้มีความยืดหยุ่นและทนทาน	1999
SaluBridge Nerve Cuff 	6.35 cm	2, 5 และ 10	Polyvinyl alcohol	Salumedica, LLC , Atlanta, Georgia	สำหรับเส้นประสาทส่วนปลายเท่านั้น	2000
Neurolac® Nerve Guides 	ไม่ระบุ	4- 10	Poly(DL-lactide- co- caprolactone)	Polyganics B.V. ,Groningen , Netherlands	ยืดหยุ่นมีลักษณะโปร่งแสงเข้ากับร่างกายได้เป็น อย่างดี ยังคงความแข็งแรงเชิงกลเมื่อเวลาผ่านไป 10 สัปดาห์และสลายตัวเมื่อเวลาผ่านไปหลาย สัปดาห์และสลายตัวอย่างสมบูรณ์ที่เวลา 1 ปี ใช้ กับเส้นประสาทส่วนปลายที่ขาดจากกันอย่าง สมบูรณ์โดยมีระยะที่ขาดสูงได้ถึง 20 มิลลิเมตร [Marietta, J.O.E., และคณะ 2005]	2005

## 2.9 งานวิจัยในประเทศที่เกี่ยวข้องกับท่อนำเส้นประสาท

งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับท่อนำเส้นประสาทในประเทศไทยพบว่ามีการใช้พอลิเมอร์หลายชนิดมาขึ้นผลิตเป็นท่อนำเส้นประสาท ในงานวิจัยของพจมาน สมสมัคร และคณะ ปี 2548 ได้มีการศึกษาการขึ้นรูป PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 50:50 ด้วยวิธี Dip-coating และวิธี Melt-extrusion พบว่าวิธี Dip-coating ขึ้นรูปได้ง่ายแต่ความยาวของท่อนำเส้นประสาทถูกจำกัดด้วยขนาดของพิมพ์ และวิธี Melt-extrusion สามารถผลิตท่อที่มีความยาวมากขึ้นโดยใช้แม่พิมพ์แบบวงแหวน จากการทดลองพบว่าสามารถขึ้นรูปได้เป็นท่อนำตามต้องการ แต่ยังคงมีฟองอากาศซึ่งต้องแก้ไขในกระบวนการผลิตต่อไป นอกจากนี้ยังพบการศึกษาการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทจาก poly(L-lactide) และ PLCL ด้วยวิธี Dip-coating โดยท่อนำเส้นประสาทจาก poly(L-lactide) จะมีสีขาวขุ่น, แข็งและมีรูพรุนที่ผิวด้านนอก ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL มีลักษณะนุ่มและยืดหยุ่น มีผิวเรียบและคงรูปได้โดยไม่ยุบตัว [ธรรมบุญ คำสาร และ วินิตา บุญโยดม, ไม่ระบุรี] นอกจากนี้ยังพบการใช้ poly(L-lactide-co-glycolide) มาขึ้นรูปเป็นท่อนำเส้นประสาทด้วยวิธี Dip-coating ได้ท่อที่มีลักษณะโปร่งใสและยืดหยุ่น [จุฑามาศ ต้นปลุก และสายสุดา ผลจันทร์, 2547]

## 2.10 คอลลาเจน

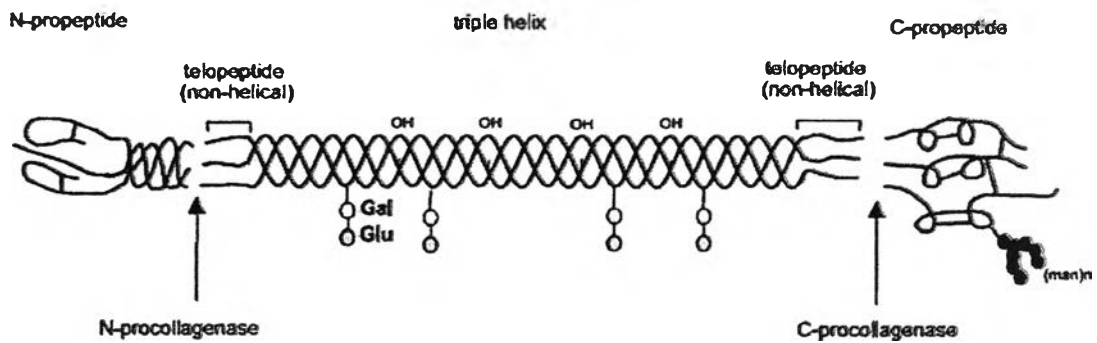
คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุด ในมนุษย์และสัตว์ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนในร่างกาย คอลลาเจนเป็นส่วนประกอบของ extracellular matrix (ECM) หรือเรียกว่าเป็นที่อยู่ของเซลล์ ซึ่งทำให้คอลลาเจนทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับอวัยวะต่างๆ เช่น เส้นเอ็น กระดูก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมดและยังคงพบคอลลาเจนในรอยต่อของเนื้อเยื่อที่ประกอบขึ้นเป็นส่วนของอวัยวะ คอลลาเจนช่วยสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อและอวัยวะ ให้มีโครงสร้างที่คงสภาพสมบูรณ์ ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีกลุ่มวิจัยต่างๆ สนใจคอลลาเจนเป็นจำนวนมากและได้แบ่งกลุ่มคอลลาเจนดังแสดงในตารางที่ 2.5 ซึ่งคอลลาเจนในแต่ละกลุ่มจะมีหน่วยซ้ำที่เหมือนกันคือ Gly-X-Y ซึ่ง X แทน proline และ Y แทน 4-hydroxyproline แสดงดังรูปที่ 2.7 คอลลาเจนมีความเข้ากันได้ดีเท่ากับเซลล์ เนื่องจากพบมากตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย มี Arginine-Glycine-Aspartic acid peptide (R-G-D peptide) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมีปฏิกริยาสร้างภูมิคุ้มกันที่ต่ำ [Friess, W. 1998] โมเลกุลของคอลลาเจนประกอบไปด้วย polypeptide alpha-chain 3 เส้น ซึ่ง alpha-chain ทั้ง 3 เส้นพันรวมกันทำให้คอลลาเจนมีโครงสร้างเป็นแบบ triplehelix [Gelse, K. และคณะ, 2003] แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนชนิดที่ 1

(ที่มา: Friess, W., 1998; 45: 113-136.)

การใช้ประโยชน์จากคอลลาเจนในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีมาก โดยเฉพาะคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งซึ่งนิยมนำมาเป็นวัสดุทดแทนผิวหนังและแผลที่เกิดจากไฟไหม้ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะสมบัติทางกลที่เหมาะสมและมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์ ซึ่งบริษัทที่ผลิตคอลลาเจน เช่น sigma-aldrich และงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อยังได้พัฒนาการใช้ คอลลาเจนในงานด้านอื่นๆ นอกจากผิวหนัง เช่น การแทนที่ของท่อลำเลียงเลือด ลิ้นปิดหัวใจ และ เอ็นยึด เนื่องจากคอลลาเจนแสดงสมบัติที่มีความสามารถในการห้ามเลือด โดยเหนียวนำไปเกิด การจับตัวเป็นลิ่มหรือก้อนของเลือด และแสดงความสามารถในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ [Auger, FA. และคณะ, 1998]



รูปที่ 2.8 โครงสร้างแบบ triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1

(ที่มา: Gelse, K., 2003; 55: 1531-1546.)

คอลลาเจนเหมาะสำหรับการนำมาสร้างเป็นโครงเลี้ยงเซลล์มนุษย์ เนื่องจากพบมากในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทั้งยังมีสมบัติการเข้ากันได้กับร่างกาย มีการต้านต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายที่ต่ำ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ และสามารถเพิ่มความสามารถในการชักนำเซลล์เข้า

มายึดเกาะและเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามมีปัญหาบางประการที่นำคอลลาเจนมาใช้งาน ได้แก่ [Friess, W. 1998 และ Lee, CH. และคณะ, 2001]

- เนื่องจากคอลลาเจนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สกัดได้จากแหล่งที่ต่างกันและมีอยู่ตามอวัยวะต่างๆในร่างกายจึงทำให้คอลลาเจนมีความเป็นเนื้อเดียวกันต่ำหรือมีความสม่ำเสมอทางโครงสร้างต่ำ จึงทำให้เกิดความแปรปรวนต่างๆ เช่น ความหนาแน่นในการเชื่อมขวาง ขนาดของเส้นใย ความบริสุทธิ์ และการย่อยสลาย
- การเตรียมคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งให้บริสุทธิ์ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากการสกัดคอลลาเจนจากเนื้อเยื่อเป็นไปได้ยากเนื่องจากโมเลกุลในคอลลาเจนถูกเชื่อมโยงด้วยพันธะโควาเลนต์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุของสิ่งมีชีวิตและชนิดของเนื้อเยื่อที่สกัด อีกทั้งคอลลาเจนที่สกัดจำหน่ายในท้องตลาดมีราคาค่อนข้างสูง
- การคงสภาพโครงสร้างโมเลกุลของคอลลาเจนทำได้ยาก เนื่องจากคอลลาเจนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ มีการรุกรานของจุลินทรีย์ต่างๆ ง่ายและมีรายงานการติดเชื้อในคนไข้
- คอลลาเจนมีสมบัติทางกลที่ไม่แข็งแรง คือ มีการหดตัว (contraction) ของเส้นใย โดยเฉพาะ เมื่ออยู่ในสารละลายซีรัม

ลักษณะเด่นของคอลลาเจนคือ มีปริมาณกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ที่สูงซึ่งกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophobic protein และมีปริมาณของ กรดอะมิโน tyrosine, tryptophan, isoleucine, cystine และ histidine ที่ต่ำ [Neuman, RE. 1949]



ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของคอลลาเจนชนิดต่างๆ

Table 1

Table showing the various collagen types as they belong to the major collagen families

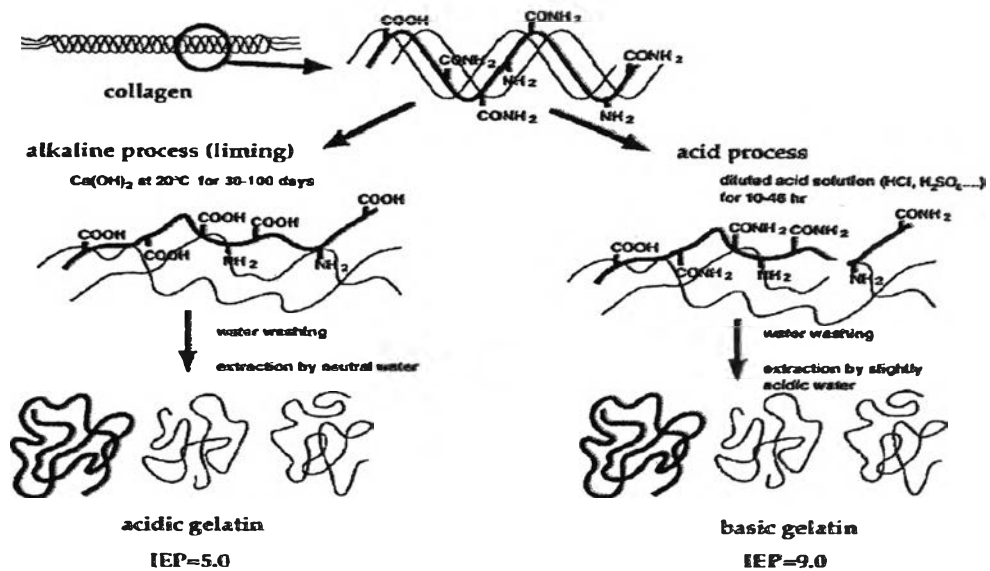
Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
<i>Fibril-forming collagens</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31-q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11-q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2-q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3=COL2A1	cartilage, vitreous body
<i>Basement membrane collagens</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36-q37) COL4A4 (2q36-q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	basement membranes
<i>Microfibrillar collagen</i>			
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
<i>Anchoring fibrils</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	skin, dermal-epidermal junctions; oral mucosa, cervix,
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	COL8A1 (3q12-q13.1) COL8A2 (1p34.3-p32.3)	endothelial cells, Descemet's membrane
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1 (6q21-q22.3)	hypertrophic cartilage
<i>FACIT collagens</i>			
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33-p32.2)	cartilage, vitreous humor, cornea
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12-q13)	perichondrium, ligaments, tendon
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12-q14)	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$		corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3-11.2)	blood vessel wall
<i>Transmembrane collagens</i>			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1 (10q22)	epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermal-epidermal junctions
<i>Multiplexins</i>			
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1 (9q21-q22)	fibroblasts, smooth muscle cells, kidney, pancreas,
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1 (21q22.3)	lungs, liver

Given are the molecular composition, the genomic localization of the different chains as well as the basic tissue distribution.

## 2.11 เจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติชนิดหนึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน ซึ่งสกัดมาจากคอลลาเจน โดยขบวนการ acidic และ alkaline process แล้วจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์, เพิ่มความเข้มข้น, ผ่านขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อโรคและการทำให้แห้ง จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมา 2 ชนิดคือ basic gelatin หรือ เจลาตินชนิด A และ acidic gelatin หรือ เจลาตินชนิด B

ซึ่งขั้นตอนการสกัดเจลาตินทั้งสองชนิดนี้ แสดงดังรูปที่ 2.9 โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรมและทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพและมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ [Young, S. และคณะ, 2005]



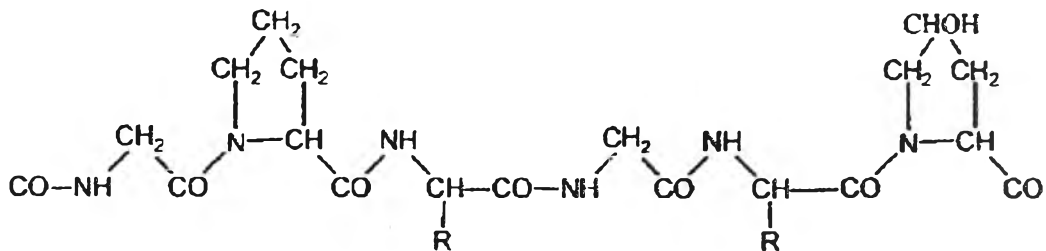
รูปที่ 2.9 ขั้นตอนการสกัดเจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B (ที่มา: Tabata, Y., 1998; 31: 287-301.)

เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ [Tabata, Y. 1998]

1. เจลาตินชนิด A : ได้มาจาก acid process แสดงดังรูปที่ 2.9 มีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนและเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด
2. เจลาตินชนิด B : ได้มาจาก alkaline process ดังรูปที่ 2.9 เป็นขบวนการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมต์ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิล ปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุลบเมื่ออยู่ใน pH 7.4 และมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบสหรือมีประจุที่เป็นบวกสำหรับใช้ควบคุมการปลดปล่อยโดยอาศัยสมบัติความแตกต่างระหว่างประจุ

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิดและมีปริมาณของกรดอะมิโน glycine, proline และ hydroxyproline ที่มากเช่นเดียวกับคอลลาเจนและเนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโน

methionine, tyrosine และ cystine ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนจำพวกนี้จะแสดงพฤติกรรมเป็น hydrophilic จึงทำให้เจลาตินละลายน้ำได้ดี [Neuman, RE. 1949] โครงสร้างของเจลาติน ประกอบไปด้วยหน่วยซ้ำของกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันคือ glycine-X-Y ซึ่ง X และ Y คือ proline และ hydroxyproline ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2.10



R = glycine-X-Y triplet

X และ Y คือ proline และ hydroxyl proline ตามลำดับ

รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเจลาติน

(ที่มา: Lee, SB., 2005; 24: 2503-2511.)

เนื่องจากเจลาตินเป็นสารโปรตีนที่มีคุณค่า ผลิตจากผลพลอยได้ของสัตว์ที่มีราคาถูกและมีสมบัติในการเปลี่ยนเจลเป็น sol (reversible gel-to-sol transition) ของสารละลายเจลาตินทำให้สารละลายเจลาติน มีความเหนียว สามารถเป็น protective colloid เมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายที่ใส ด้วยสมบัติที่ดีของเจลาติน ในตลาดโลกปีหนึ่งๆ เจลาตินจึงมีมูลค่าเกินกว่า 400 ล้านดอลลาร์สหรัฐ จากสถิติในตลาดโลกมีการใช้สารประเภทนี้มากในปีหนึ่งๆ ประมาณ 110,000 – 140,000 ตัน และคาดว่าจะมีแนวโน้มมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากปัจจุบันตลาดของผลิตภัณฑ์ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบหลักกำลังขยายตัวอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นตลาดที่ใหญ่ที่สุดของการใช้เจลาติน เจลาตินในส่วนนี้เรียกว่า edible gelatin ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ซึ่งคาดว่าจะมีการใช้มากถึงร้อยละ 55 ของตลาดทั่วโลก ตลาดที่ใหญ่รองลงมา คือ อุตสาหกรรมยา ซึ่งด้านนี้ใช้ประมาณร้อยละ 25 ของตลาดทั่วโลก และใช้ในอุตสาหกรรมถ่ายภาพร้อยละ 15 นอกนั้นอีกร้อยละ 5 ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษชัต อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมลูกกอล์ฟ ตัวพิมพ์ และไม้ขีด [วีระศักดิ์ สหชัยเสรี, 2544]

นอกจากนี้เจลาตินยังถูกนำมาในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อดังที่พบได้จากงานวิจัยของ Tabata ในปี 1999 ที่ศึกษาการใช้เจลาตินเป็นวัสดุทดแทนผิวหนังที่มีสมบัติในการควบคุมการนำส่ง (control release) โกรทแฟคเตอร์ bFGF (basic fibroblast growth factor โดยในการทดลองทำการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจลจากเจลาติน แล้วเชื่อมขวางด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำแผ่นไฮโดรเจลที่ได้แช่ในสารละลายไกลซีน (glycine) เพื่อกำจัดหมู่แอลดีไฮด์ออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำแห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง จากนั้นทำการเติม bFGF จากผลการทดลองให้ไฮโดรเจล ในการควบคุมการส่งผ่าน bFGF พบว่า bFGF ที่อยู่ในเจลาตินชนิด A จะถูกนำส่งได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่ bFGF ที่อยู่ในเจลาตินชนิด B จะถูกนำส่งได้น้อย และไฮโดรเจลที่มีค่าการดูดซับน้ำสูงกว่า จะสลายตัวได้เร็วกว่าไฮโดรเจลที่มีค่าการดูดซับน้ำที่ต่ำกว่า ซึ่งแสดงถึงผลการใช้เจลาตินในการควบคุมการนำส่งโกรทแฟคเตอร์ในโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

## 2.12 การควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีน

ในการศึกษาทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้มีการใช้โกรทแฟคเตอร์เป็นส่วนหนึ่งสำหรับกระบวนการเกิดขึ้นใหม่ของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาแต่เพื่อประสิทธิภาพของการส่งเสริมการเกิดขึ้นใหม่ของเนื้อเยื่ออย่างมีประสิทธิภาพจึงได้มีการใช้ระบบควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ เพื่อให้สามารถปลดปล่อยออกมาได้ในปริมาณและในระยะเวลาที่เหมาะสมกับระบบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อแต่ละชนิด การสร้างระบบควบคุมการปลดปล่อยนั้นจะใช้วัสดุที่แตกต่างกันไป โดยวัสดุที่ใช้สำหรับควบคุมการปลดปล่อยนั้นจะเป็นวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้และต้องเป็นวัสดุที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์

การควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์โดยการจับกับระหว่างโกรทแฟคเตอร์และโปรตีนอาจใช้สารเคมีช่วยในการเชื่อมพันธะดังกล่าวของการศึกษาของ Chen P. และคณะ ในปี 2005 ที่ขึ้นรูป Scaffold จากเจลาตินที่ผสม Tricalcium phosphate และเชื่อมขวางด้วย กลูทาไรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1 % มาจับกับ NGF โดยใช้ 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) เป็นสารเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซีที่อยู่บนพื้นผิวของเจลาตินและหมู่เอมีนของ NGF โดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ การสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์จะช่วยปลดปล่อย NGF ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Differentiation) ของ PC12 cell (ใน In vitro) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากปมประสาท อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในด้านการปลดปล่อย NGF (ใช้เวลาทดสอบ 2 เดือน) พบว่า NGF จะถูกปลดปล่อยออกมาแบบการแพร่ (Diffusion) ซึ่งปลดปล่อยออกมา

อย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกและหลังจากนั้นการปลดปล่อยจะเกิดจากการสลายตัวของพื้นผิว (Surface degradation) ของ Scaffold

มีการศึกษาที่ใส่พอลิเมอร์สังเคราะห์ขึ้นรูปเป็นอนุภาคขนาดเล็กช่วยปลดปล่อย NGF โดยในปี 2003 Xu X. และคณะ ได้ผลิตท่อนำเส้นประสาทจาก Poly(phosphoester) (PPE) ด้วยวิธี Dip-Coating มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1.5 mm มีความยาว 14 mm และ Microsphere ของ PPE ที่มี NGF ภายในและศึกษาการงอกของประสาทส่วนปลายโดยใช้ Microsphere ของ PPE ที่มี NGF บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาทเพื่อให้ปลดปล่อยแบบยาวนาน โดยศึกษาในเส้นประสาทบริเวณสะโพก (Sciatic nerve) ในหนู Wistar เพศผู้ โดยมีความยาว Gap เท่ากับ 10 mm จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่มี Microsphere ของ PPE ที่มี NGF มีเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นประสาทใหญ่กว่าและความหนาแน่นของเส้นประสาทสูงกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ใช้ NGF เปล่า, กลุ่มที่ใช้ Bovine serum albumin (BSA) ใน Microsphere อย่างเดียวและกลุ่มที่ใช้น้ำเกลืออย่างเดียว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ในปี 2005 Yang Y. และคณะ ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อย NGF ที่บรรจุใน Microsphere ของ Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75:25 จากท่อนำเส้นประสาท PLGA เพื่อควบคุมการปลดปล่อย NGF ให้เป็นแบบออกฤทธิ์ยาวนาน จากการศึกษาพบว่า การปลดปล่อย NGF ช่วงแรกจะค่อนข้างรวดเร็วต่อมาจะค่อยๆปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ซึ่งเป็นการปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์ยาวนาน (Sustained release) ในส่วนผลที่มีต่อการงอกของเส้นประสาท (ศึกษาใน In vitro โดยใช้ Embryonic chick dorsal root ganglia) พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมบวก(ใช้ NGF ใส่ใน ท่อนำเส้นประสาท) ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าแม้ผลในเรื่องการงอกของเส้นประสาท ไม่ต่างกัน แต่ประสิทธิภาพของ NGF ที่ผลิตในรูป Microsphere ยังคงอยู่

ในกรณีของการจับกันของโกรทแฟคเตอร์และโปรตีนโดยอาศัยความชอบน้ำไม่ชอบน้ำ มีการศึกษาของ Ozeki M. และคณะ ในปี 2006 ที่ใช้ Scaffold จากเจลาตินชนิด B (ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นลบ) ดูดซับ Heparocyte growth factor (HGF) และ 5 amino-acid residues (FLPSS sequence) deleted (dHGF) ซึ่งทั้งสองตัวเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่เร่งการเจริญของเซลล์ตับ ผลการศึกษาการปลดปล่อยใน In vitro และ In vivo (mouse) ของ HGF หรือ dHGF ที่ดูดซับอยู่บนเจลาตินพบว่า dHGF จะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็ว และ HGF จะเหลือบนเจลาตินมากกว่า อาจเนื่องมาจากการที่การที่ HGF มี FLPSS sequence ซึ่งมี Phenylalanine และ Leucine ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และมีส่วน Serine ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลช่วยในเรื่องการเกิดพันธะไฮโดรเจน จึงทำให้จับกับเจลาติน ได้ดีกว่าและคาดว่า การปลดปล่อยของ HGF เกิดขึ้นเมื่อมีการสลายตัวของ Scaffold ในส่วนของ dHGF จะปลดปล่อยจาก Hydrogel โดยเกิด

การแพร่แบบธรรมดา (Simple diffusion) ออกจาก Hydrogel เนื่องจากจับกับ Hydrogel ได้น้อยกว่า HGF

ในหลายการศึกษาและบทความจำนวนมากและได้กล่าวถึงการใช้สมบัติความแตกต่างระหว่างประจุช่วยควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์โดยใช้เจลาตินชนิด B ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นลบจากหมู่คาร์บอกซิลใช้จับกับ bFGF (เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่ช่วยในการสร้างหลอดเลือดและเส้นประสาท เป็นต้น) ซึ่งมีประจุบวก [Tabata Y. และ Ikada Y., 1998; Tabata Y. และคณะ, 1998; Young S. และคณะ, 2005] ในการศึกษาของ Tabata Y และคณะ ปี 1999 ที่ศึกษาการปลดปล่อย bFGF แบบ *In vitro* และการสลายตัวใน *In vivo* (Mice) ของ bFGF โดยใช้ Scaffold จากเจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ และนอกจากนี้ยังศึกษาการสร้างหลอดเลือดโดยประเมินจากการตรวจวัด เม็ดเลือดแดงจากเนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ ที่ฝัง Scaffold ภายในชั้นใต้ผิวหนังของหนู Mice จากการศึกษาพบว่า bFGF ถูกปลดปล่อยออกมาจากเจลาตินชนิด B ได้ในวันแรกและหลังจากนั้นการปลดปล่อยจะค่อนข้างคงที่และเป็นปริมาณน้อยอาจเนื่องมาจากผลของการเกิดการจับกันของประจุระหว่าง bFGF และเจลาตินชนิด B โดยการปลดปล่อยของ bFGF ที่คงที่หลังจากวันแรกเกิดจากการสลายตัวของเจลาตินชนิด B ในส่วนของเจลาตินชนิด A นั้น bFGF จะถูกปลดปล่อยออกมาเกือบ 100 % เลยในช่วงแรก โดยพบว่าการปลดปล่อยเป็นแบบการแพร่ธรรมดา เป็นดังนี้เนื่องจากไม่เกิดการจับกันของประจุระหว่าง bFGF และเจลาตินชนิด A ในส่วนของการสลายตัวพบว่าเจลาตินชนิด B และเจลาตินชนิด A ซึ่งซึมซับ bFGF ที่มีปริมาณการดูดซับน้ำ (Water content) สูงจะมีการสลายตัวเร็วกว่า Scaffold ที่มีปริมาณการดูดซับน้ำต่ำและเมื่อศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่พบว่า bFGF ที่ซึมซับด้วยเจลาตินชนิด B จะมีการสร้างหลอดเลือดในระยะเวลาที่นานกว่าส่วน bFGF ที่ซึมซับด้วยเจลาตินชนิด A จะมีการสร้างหลอดเลือดช่วงต้นเนื่องจากการปลดปล่อย bFGF ออกมาเกือบทั้งหมดในช่วงต้น

ในปี 2006 Shao-Hong LI และคณะ ได้ศึกษาคุณลักษณะของ Poly(lactide-co-glycolic acid)(PLGA) สัดส่วนโคพอลิเมอร์ 75:25 ซึ่งทำเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก (Microsphere) ที่หุ้มอนุภาค (Particle) ของเจลาตินชนิด B (ซึ่งภายในบรรจุ bFGF อยู่) โดยวิธี Phase separation จากการศึกษาคุณลักษณะของ microsphere ที่สร้างขึ้นพบว่าสามารถบรรจุ bFGF อยู่ภายในสูงถึง 80.5 % ของปริมาณที่ให้เริ่มต้นและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Microsphere 5-18  $\mu\text{m}$  ในส่วนการปลดปล่อย bFGF พบว่าในช่วง 18 วันแรก การปลดปล่อยค่อนข้างเร็วโดยจะปลดปล่อย 50 % ของ bFGF ที่บรรจุภายใน Microsphere และหลังจากวันที่ 42 bFGF ยังคงสามารถปลดปล่อยได้ โดยจะปลดปล่อย 65 % ของ bFGF ที่บรรจุภายในและอัตราการปลดปล่อยจะต่ำกว่าช่วงแรก การปลดปล่อยอย่างช้า ๆ ในช่วงหลังอาจเกิดจากการที่ bFGF จับอยู่ภายในเจลาติน

รวมถึงการปลดปล่อย bFGF ออกมาได้ นั้นต้องมีการสลายตัวของ PLGA ก่อน และอาจเกิดจากการแพร่ผ่านชั้นของเจลลาตินที่พองตัวด้วยน้ำ และ ชั้น PLGA ที่มีส่วนของน้ำอยู่ โดยทั้งสองส่วนของเจลลาตินที่พองตัวและชั้น PLGA จะควบคุมให้ bFGF ค่อย ๆ แพร่ออกมา จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการที่ระบบนี้มีคุณสมบัติที่สามารถปลดปล่อย bFGF สูงในช่วงแรกและต่อมามีการปลดปล่อยแบบอย่างช้าๆทำให้สามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นระบบนำส่ง bFGF แบบออกฤทธิ์นานได้

นอกจากนี้ยังรวมถึงกลุ่มที่ใช้โปรตีนดูดซับโกรทแฟคเตอร์ใน Scaffold โดยกลุ่มของ Kanematsu A. และคณะ ในปี 2004 ศึกษาการปลดปล่อย bFGF ที่ดูดซับบน Scaffold แบบพองน้ำของคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง ที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment) แบบ *In vivo* (หนู mice) และ *In vitro* และศึกษาการปลดปล่อย bFGF (20 µg/ 2 mg collagen microsponge) แบบ *In vivo* (หนู mice) ที่ดูดซับบน Scaffold แบบพองน้ำขนาดเล็กของคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง (Microsponge (CellGen™)) ที่เชื่อมขวางด้วยวิธี Ultraviolet irradiation และศึกษาการสร้างหลอดเลือดโดยการวัดการไหลเวียนของเลือด (Blood flow) ในกรณีการทำให้เกิดการขาดเลือดของขาด้านหลังในหนู Mice โดยตัดหลอดเลือด Femoral vein และ Artery จากการศึกษาพบว่า การปลดปล่อย bFGF จะค่อยๆถูกปลดปล่อยออกมาตามการสลายตัวของคอลลาเจนและ bFGF ยังแสดงผลในการสร้างหลอดเลือดโดยขึ้นกับปริมาณของ bFGF นอกจากนี้การฉีด Microsponge ของคอลลาเจนที่มี bFGF เข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular injection) พบว่ากระตุ้นให้เกิดการไหลเวียนของเลือดและความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยเพิ่มขึ้นในบริเวณที่มีการตัดหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ Microsponge ของคอลลาเจนเปล่า, กลุ่มที่ใช้สารละลาย bFGF และกลุ่มที่ไม่ได้ทำการรักษาด้วยสิ่งใดเลย

### 2.13 การเชื่อมขวาง (crosslinking)

การเชื่อมขวางเป็นวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญมากในการปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน เนื่องจากการเชื่อมขวางนั้นเป็นการทำให้สมบัติเชิงกล (mechanical properties), อัตราการย่อยสลาย (degradation rate), และความสามารถในการบวมน้ำ (swelling capacity) ของโครงเลี้ยงเซลล์มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น เนื่องจากการเชื่อมขวางสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายและอัตราการสร้างเนื้อเยื่อของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ [Ma L. และคณะ, 2003] ซึ่งพบว่าในระบบการเชื่อมขวางนั้นมีวิธีการอยู่หลายวิธี โดยจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆคือ การเชื่อมขวางทางกายภาพ, การเชื่อมขวางทางเคมี และการเชื่อมขวางโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา

การเชื่อมขวางทางกายภาพ ได้แก่ การใช้ความร้อน หรือ dehydrothermal treatment (DHT), การใช้รังสี เช่น UV-irradiation และการใช้พลาสมา เป็นต้น ส่วนการเชื่อมขวางทางเคมี

ได้แก่ การใช้หมู่แอลดีไฮด์ เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (GA), formaldehyde , glycerinaldehydes, การใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), การใช้ polyepoxides, และการใช้ isocyanates เป็นต้น [Young S. และคณะ, 2005]

### 2.13.1 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพ

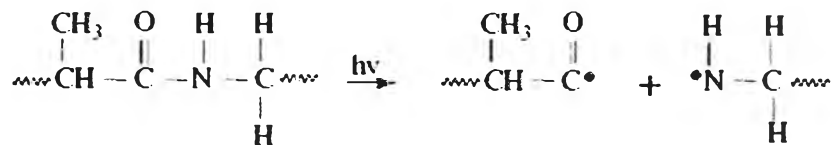
#### ก) การเชื่อมขวางโดยการให้ความร้อน (dehydrothermal treatment, DHT)

การเชื่อมขวางแบบให้ความร้อน เป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้เพื่อหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ใช้เป็นตัวเชื่อมขวาง (cross-linker) ดำเนินการโดยอาศัยความร้อนภายใต้สุญญากาศที่ความดัน 0 มิลลิบาร์ ซึ่งกระบวนการนี้เกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) ระหว่างหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ติดกัน โดยทำการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่แล้วปรับเปลี่ยนระยะเวลาให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด เพื่อให้ได้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสมมากที่สุด [Ueda H. และคณะ, 2002] ตัวอย่างเช่น โครงเลี้ยงเซลล์ที่สร้างมาจากคอลลาเจนถูกปรับปรุงให้มีความแข็งแรงมากขึ้นและมีการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้าลง ด้วยการเชื่อมขวางระหว่างสายโซ่ (interchain crosslinks) จากปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) ระหว่างหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ติดกันของคอลลาเจนในโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์ผ่านการเชื่อมขวางแบบให้ความร้อนแล้ว ทำให้ปริมาณหมู่เอมีนอิสระและความสามารถในการกักเก็บน้ำในโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง ส่งผลให้ความทนต่อแรงดึง (tensile strength) เพิ่มขึ้น [Pieper J.S. และคณะ, 1998] และเมื่อมีการนำการเชื่อมขวางแบบให้ความร้อนมาใช้กับคอลลาเจน ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าวิธีการนี้จะขับน้ำออกจากโมเลกุลของคอลลาเจน และทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในภายในไซของคอลลาเจน ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในการเชื่อมขวาง แต่การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้ก็ยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของคอลลาเจน (denature collagen) และความแข็งแรงของโครงเลี้ยงเซลล์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ [Wess T.G. และคณะ, 2000] แต่มีรายงานว่าได้มีการนำวิธีการเชื่อมขวางแบบให้ความร้อนไปใช้ร่วมกับการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี EDC/NHS ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากคอลลาเจนผสมกับ chondroitin-6-sulfate เริ่มต้นจากการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนคอลลาเจน 92% chondroitin-6-sulfate 8% โดยอาศัยเทคนิคการทำแห้งแข็ง (freeze-dried) ก่อน แล้วจึงนำมาเชื่อมขวางแบบให้ความร้อนในตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven) ที่สภาวะ 105 องศาเซลเซียส ความดัน 0 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเชื่อมขวางอีกครั้งโดยการแช่ในสารเคมี EDC/NHS ซึ่งสามารถเพิ่มความสามารถในการบวมน้ำสูงขึ้น 1.5 เท่า และเพิ่มความแข็งแรงทางกลสูงขึ้น 3 เท่าให้กับโครงเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี EDC/NHS ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว [Pek Y.S. และคณะ, 2004]



### ข) การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสีอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Irradiation, UV)

การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสี UV เกิดจากการที่รังสี UV ทำให้เกิด photodegradation และพลังงานแสง เข้าไปกระตุ้นพันธะภายในโมเลกุลของคอลลาเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งไวต่อการเกิดปฏิกิริยาของหมู่เอมีนขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.11 โดยหมู่เอมีนอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะไปเชื่อมขวางกับหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนโมเลกุลอื่นทำให้เกิดการเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีน [Sionkowska A. 2006]



รูปที่ 2.11 การเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางโดยการใช้ UV irradiation  
(ที่มา :Sionkowska A., 2006; 82: 9-15)

### ค) การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสีแกมมา (gamma radiation)

การเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้รังสีแกมมา เป็นเทคนิคอย่างหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ซึ่งเทคนิคนี้ได้มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านการแพทย์ เช่น การตรึงเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะถูกตรึงอยู่บนพอลิเมอร์ ซึ่งเอนไซม์ที่นำมาใช้กับเทคนิคนี้ได้แก่ urease, cellulose, glucose, oxidase, lipase, glucosamylase และ invertase เป็นต้น โดยดำเนินการเชื่อมขวางที่อุณหภูมิต่ำๆ เมื่อนำรังสีแกมมามาใช้กับคอลลาเจนและ poly(L-lactic acid) ที่ยึดเกาะกันด้วยพันธะโควาเลนต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ รังสีแกมมาจะเหนี่ยวนำให้คอลลาเจนและ poly(L-lactic acid) เกิดเป็นอนุมูลอิสระขึ้นโดยคอลลาเจนเกิดหมู่เอมีนอิสระ ( $\text{NH}_2^\bullet$ ) ส่วน poly(L-lactic acid) เกิดหมู่คาร์บอกซิลิกอิสระ ( $\text{COOH}^\bullet$ ) จากนั้นหมู่เอมีนอิสระที่เกิดขึ้นจะเชื่อมขวางกัน ส่งผลให้โครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์มีความเสถียร และมีความสามารถในการบวมน้ำลดลง [Yang Y. และคณะ, 2002]

นอกจากนี้รังสีแกมมาถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการทำให้กระดูกปราศจากเชื้อ (sterilization of bone) จากเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรีย แต่การใช้รังสีแกมมาจะสร้างความเสียหายให้กับกระดูก เนื่องจากการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นจากการแผ่รังสี โดยปฏิกิริยา radiolysis กับโมเลกุลของน้ำ ในรูปของอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล ( $\text{OH}^\bullet$ ) [Akkus O. และคณะ, 2005]

### ง) การเชื่อมขวางโดยใช้พลาสมา (วิธีการแผ่รังสีในก๊าซเฉื่อย)

พลาสมาเป็นสถานะหนึ่งของสสาร ซึ่งโดยทั่วไปเรียกว่าเป็นสถานะที่ 4 ของสสาร ถัดจากของแข็ง ของเหลวและก๊าซ พลาสมามีความแตกต่างจากสถานะของแข็ง สถานะของเหลว และสถานะก๊าซ

สถานะที่ 4 ของสสารนี้ มีการเอ่ยถึงครั้งแรก โดยเซอร์ วิลเลียม ครูกส์ (Sir William Crookes) เมื่อปี 1879 และคำว่าพลาสมา (plasma) ถูกใช้ครั้งแรกเมื่อปี 1928 โดยนายเออริง แลงมัวร์ (Irving Langmuir) ผู้ที่สังเกตเห็นการแตกตัวของอะตอมไปเป็นไอออนและอิเล็กตรอนเมื่อกระแสไฟแรงสูงถูกส่งผ่านสายไฟหนา (ลวดโคมไฟ) หลังจากนั้น เขาได้รับรางวัลโนเบล ในสาขาเคมีในปี 1932 และนักวิทยาศาสตร์อีกคนหนึ่งชื่อ ฮานส์ อัลฟเวน (Hannes Alfvén) ได้รับรางวัลโนเบลในสาขาฟิสิกส์ในปี 1970 จากผลงานเกี่ยวกับพลาสมาเช่นกัน [<http://th.wikipedia.org/wiki/>]

พลาสมา คือ ก๊าซที่ถูกกระตุ้นหรือได้รับพลังงานมากพอจนบางส่วนเกิดการแตกตัวเป็นไอออนและอิเล็กตรอนอิสระรวมกันอยู่ในระบบและมีประจุไฟฟ้าอิสระทั้งบวกและลบโดยเฉลี่ยแล้วเท่ากัน มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปจากก๊าซในภาวะปกติ เช่น ก๊าซไฮโดรเจนไม่ใช่ตัวนำไฟฟ้า แต่เมื่อเปลี่ยนสถานะไปเป็นพลาสมาก็จะเป็นตัวนำไฟฟ้าได้ สสารทุกชนิดสามารถทำให้เป็นพลาสมาได้เมื่อรับพลังงานในรูปแบบต่างๆ เช่น ความร้อน คลื่นวิทยุ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า สสารและธาตุหนักขึ้น ยิ่งทำให้เป็นพลาสมาได้ยากขึ้น ไฮโดรเจนซึ่งเป็นธาตุเบาที่สุด สามารถทำให้เป็นพลาสมาได้ง่ายที่สุด รังสีพลาสมาประกอบด้วยอนุภาคหรือไอออน จึงมีความเร็วต่ำกว่าแสงในสุญญากาศ คือประมาณ 300,000 กิโลเมตรต่อวินาที ในธรรมชาติมีตัวอย่างพลาสมาให้เห็นได้ เช่น พลาสมาในฟ้าผ่า ปรากฏการณ์พลาสมา คือกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับพลาสมาร้อน เช่น บริเวณใจกลางดวงอาทิตย์เกิดปฏิกิริยานิวเคลียร์ฟิวชั่นขึ้น อะตอมไฮโดรเจนในสถานะพลาสมาร้อนหลอมตัวกันจนเป็นฮีเลียม [สุพิชญา ชื่นชนม์, 2547]

เทคโนโลยีพลาสมาเป็นเทคโนโลยีที่มีการวิจัยพัฒนามากในช่วงไม่กี่สิบปีที่ผ่านมา ในปัจจุบันได้มีการนำเอาพลาสมามาใช้ประโยชน์เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของวัสดุในหลายๆ จุดประสงค์ เช่น การสร้างชั้นบางมากบนผิว (surface deposition), การสร้างฟังก์ชันหลากหลายแก่ผิว (surface functional) เป็นต้น [สุพิชญา ชื่นชนม์, 2547]

พลาสมาได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยมากมาย ส่วนใหญ่ใช้เพื่อการปรับปรุงคุณสมบัติของวัสดุเพื่อใช้ประโยชน์แตกต่างกันออกไปเช่น ในด้านการนำส่งยาพลาสมาถูกนำมาใช้ปรับปรุงพอลิเมอร์สำหรับกักเก็บยา (Reservoir) แบบให้เกิดรูพรุนขนาดเล็ก (เกิดจากการใช้พลาสมาของก๊าซออกซิเจน) ที่ตัวพอลิเมอร์กักเก็บยา ยาจึงค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาทางรูพรุนที่เกิดขึ้น หรือ

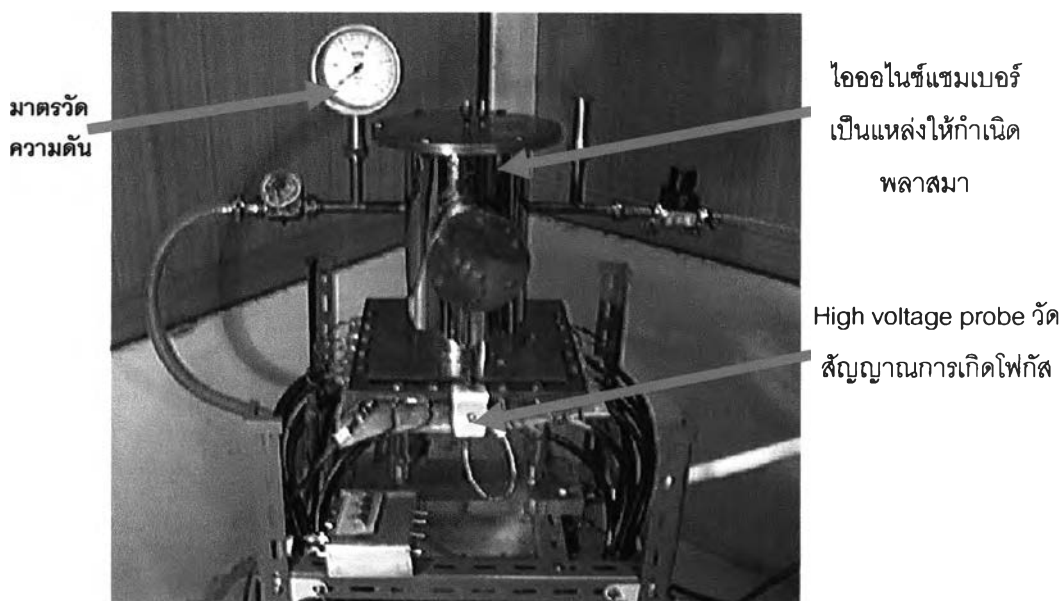
แบบที่มีการเชื่อมขวางของพอลิเมอร์ (เกิดจากการใช้พลาสมาของก๊าซอาร์กอน) เพื่อให้ยาปลดปล่อยออกมาเมื่อมีการสลายตัวของพอลิเมอร์ [Kuzuya M. และคณะ, 2005]

นอกจากนี้ยังมีการนำพลาสมาไปใช้ปรับปรุงพื้นผิวเพื่อเพิ่มความสามารถในการเปียกน้ำ (Wettability) ซึ่งเป็นการลดมุมสัมผัสกับน้ำ (Contact angle) ของวัสดุโดยใช้พลาสมาของก๊าซอาร์กอน พบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการเปียกน้ำของ Polystyrene โดยเชื่อว่าความสามารถในการเปียกน้ำที่เพิ่มขึ้นเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน, ผลของความไม่อิ่มตัวจากพันธะคู่ (Unsaturation effects) และการเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นผิวของวัสดุ [Guruvenket S. และคณะ, 2003]

ในส่วนของ การเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกๆ ที่ทำการเชื่อมขวางพันธะภายในโปรตีน รายงานอื่นพบเพียงการใช้พลาสมาของก๊าซอาร์กอนในการตรึงโปรตีนกับโคพอลิเมอร์สังเคราะห์ โดยตอนแรกตรึง Vinylmethylether-maleic anhydride (VEMA) บน Poly(ethylene naphthalate) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน หลังจากนั้นทำพื้นผิวของ VEMA ให้มีหมู่คาร์บอกซิลด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและนำ VEMA ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลที่ตรึงบน Poly(ethylene naphthalate) มาตรึงด้วย oligo-DNA โดยใช้สารเชื่อมขวาง (Crosslinking agent) เชื่อมขวางหมู่คาร์บอกซิลของ VEMA และหมู่เอมีนของ oligo-DNA [Kuzuya, M. และคณะ, 2005; Kondo, S., และคณะ, 2003] ซึ่งใช้ประโยชน์ในทางไบโอเซนเซอร์

#### (1) ทฤษฎีเกี่ยวกับเครื่อง Plasma focus [เสริมสุข แซ่ตั้ง, 2543]

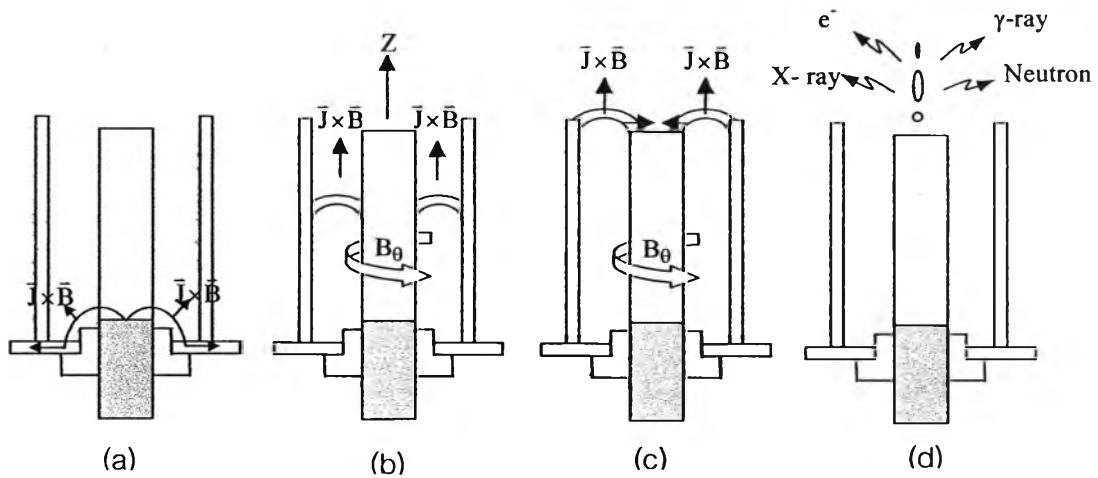
เครื่อง Plasma focus (United Nation University/ International Center for Theoretical Physics) (รูปที่ 2.12) ที่ใช้ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้เป็นเครื่อง Plasma focus ขนาดเล็ก ใช้พลังงานต่ำประมาณ 3.3 กิโลจูล ซึ่งเครื่อง Plasma focus เป็นอุปกรณ์ที่ใช้หลักการของการเปลี่ยนพลังงานศักย์ไฟฟ้าเป็นพลังงานแม่เหล็กและพลังงานจลน์ โดยสนามแม่เหล็กจะส่งผลให้เกิดการบีบอัดพลาสมา และมีการเปลี่ยนรูปพลังงานอย่างรวดเร็วจากพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าเป็นพลังงานจลน์ของอนุภาค พลังงานที่ใช้ในการทำให้เกิดการโฟกัสของพลาสมาจะมาจากตัวเก็บประจุขนาด 30 ไมโครฟารัด มีความต่างศักย์สูงและมีความเหนี่ยวนำต่ำ [ปวิตร มณีรัตน์, 2542] โดยเมื่อดูดอากาศออกจากไอออนัมแชมเบอร์จนภายในแชมเบอร์มีสภาวะเกือบเป็นสุญญากาศ จากนั้นให้ความต่างศักย์แก่อิเล็กโทรดจะมีการแตกตัวของแก๊สทำให้เกิดพลาสมาชีท (Plasma Sheath) บางๆ ขึ้นที่บริเวณผิวของฉนวน (Insulator) และมีการแตกตัวของแก๊สอยู่รอบๆ พลาสมาชีทนั้นด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลระหว่าง ขั้วแคโทดและแอโนด จึงส่งผลให้เกิดแรงลอเรนซ์ (Lorentz Force,  $\vec{J} \times \vec{B}$ ) ซึ่งทำให้พลาสมาชีทยกตัวขึ้นจากผิวของฉนวนและเคลื่อน



รูปที่ 2.12 แสดงรูปเครื่อง Plasma focus

ตัวไปข้างหน้า ทางด้านที่เปิดของโคแอ็คส์เซียลอิเล็กโทรด ซึ่งเป็นการขยายตัวในแนวแกน ทำให้เกิดการกวาดโมเลกุลของแก๊สที่ถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนออกไปด้วย กระบวนการนี้เรียกว่า กระบวนการสโนพโลว (Snowplough) เมื่อเคลื่อนที่ไปถึงปลายของอิเล็กโทรดอีกด้านหนึ่ง จะมีการขยายตัวในแนวรัศมีเข้าทางด้านใน เนื่องจากรูปทรงของอิเล็กโทรด ซึ่งทำให้เกิดการซ้อนทับกันในแนวแกน และจะซ้อนทับกันมากขึ้นเรื่อยๆ เกิดเป็นลำพลาสมา (Plasma Column) ที่อยู่ในสถานะเสถียรในช่วงเวลาที่สั้นมากในระดับนาโนวินาที จากนั้นจะเกิดการโฟกัส ทำให้เกิดพลาสมาร้อนที่มีความหนาแน่นสูง อนุภาคที่บริเวณนี้มีพลังงานสูงถึง 20 เท่าของค่าความต่างศักย์เริ่มต้นที่สะสมอยู่ในตัวเก็บประจุ บริเวณนี้เรียกว่า ฮอตสปอต (Hot Spot) ผลจากการโฟกัสทำให้เกิดการปลดปล่อยรังสีเอ็กซ์ออกมา [ปวิตร มณีรัตน์, 2542]

ช่วงสำคัญของการเคลื่อนที่ของพลาสมาซึ่งมี 3 ช่วง คือ ช่วงที่ประจุเกิดการแตกตัว (Breakdown Phase), ช่วงที่พลาสมาซึ่งยกตัวขึ้นจากผิวของฉนวน และเคลื่อนที่ขนานไปตามอิเล็กโทรด (Axial Phase) และช่วงที่พลาสมาซึ่งมีการขยายตัวในแนวรัศมีที่ปลายอิเล็กโทรด (Radial Phase) ทำให้เกิดการโฟกัสของพลาสมา (Focusing Phase) ซึ่งรังสีเอ็กซ์จะถูกปลดปล่อยออกมาด้วย โดยช่วงเวลาของการเกิดพลาสมาจนกระทั่งปลดปล่อยรังสีเอ็กซ์ของ Radial phase ใช้เวลาประมาณ 50 นาโนวินาที แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 ภาพแสดงช่วงของการเคลื่อนที่ของพลาสมาซีท (Plasma sheath) ที่สำคัญ 4 ช่วงได้แก่ (a) Break down phase, (b) Axial phase, (c) Radial phase, (d) Focusing phase โดย  $\vec{J}$  คือความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้าและ  $\vec{B}$  หรือ  $B_z$  คือสนามแม่เหล็กที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นเอง  
(ที่มา : ดุสิต งามรุ่งโรจน์, 2545)

จากการศึกษาของจิตติศักดิ์ กุลเกล้าปรากฏ (ปี 2548) ซึ่งวัดพลังงานอิเล็กตรอน (ตาราง 2.6) จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนด้วยเครื่อง Plasma focus ซึ่งกระบวนการเกิดพลาสมาในเครื่อง Plasma focus มีลักษณะเป็นช่วงที่ไม่ต่อเนื่อง (Pulse หรือ พัลส์) โดยพลังงานอิเล็กตรอนที่วัดได้สามารถแปรเป็นค่าความยาวคลื่นตามสมการ 2.1 ซึ่งค่าความยาวคลื่นที่คำนวณได้อยู่ในช่วงคลื่นของรังสีเอ็กซ์และทำให้ทราบถึงชนิดของรังสีเอ็กซ์ที่แผ่ออกมาโดยรังสีเอ็กซ์แบบเข้ม (Hard X-ray) มีความยาวคลื่นในช่วง 0.1-1 อังสตรอม (Å) และรังสีเอ็กซ์แบบอ่อน (Soft X-ray) มีความยาวคลื่นในช่วง 1-10 Å

$$\lambda = \frac{6200}{T_e} \quad (2.1)$$

$\lambda$  = ความยาวคลื่น (Å),  $T_e$  = พลังงานที่วัดได้จากอิเล็กตรอนของรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน (eV)

ตาราง 2.6 พลังงานของอิเล็กตรอน, ความยาวคลื่นรังสีเอ็กซ์, ชนิดของรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนที่ความดันต่างๆ ในแต่ละครั้งของช่วงคลื่นที่มีลักษณะไม่ต่อเนื่อง (พัลส์)

ความดันก๊าซอาร์กอน (mbar)	พลังงานของอิเล็กตรอน (keV)	ความยาวคลื่น (Å)	ชนิดของรังสีเอ็กซ์
0.5	6.4	0.97	Hard X-ray
1.0	4.3	1.44	Soft X-ray
1.5	5.5	1.13	Soft X-ray

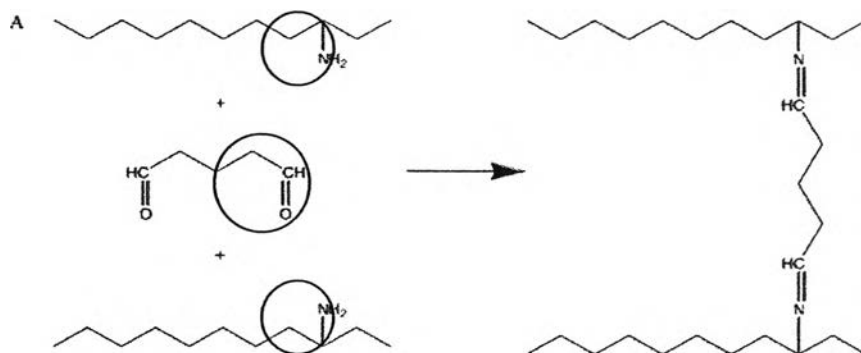
(ที่มา: จูดีศักดิ์ กุลเกล้าปรภากร, 2548)

### 2.13.2 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางเคมี

#### ก) การเชื่อมขวางโดยใช้ กลูทาราลดีไฮด์ (GA)

GA เป็นสารเคมี (reagent) ที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านชีวแพทยศาสตร์ (biomedical) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมขวาง (crosslinking agent) สำหรับโปรตีน และ พอลิแซคคาไรด์

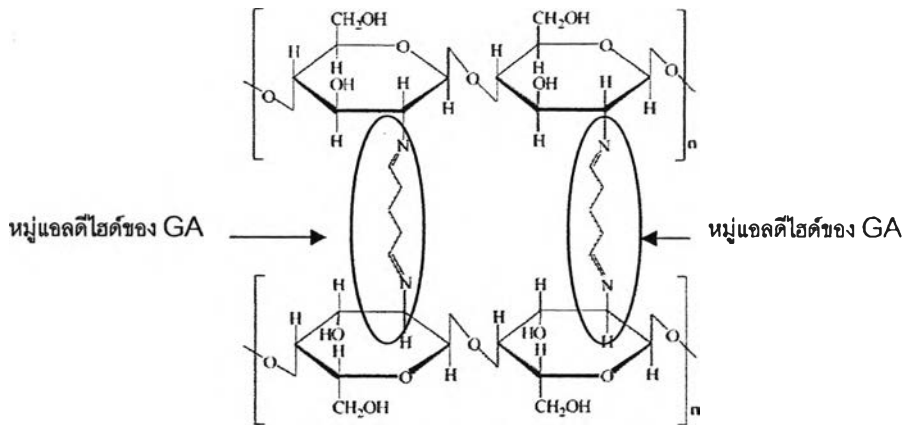
การเชื่อมขวางของคอลลาเจนเกิดขึ้นระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA กับหมู่เอมีน (-NH<sub>2</sub>) ของคอลลาเจนดังแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 การเชื่อมขวางของคอลลาเจนกับ GA

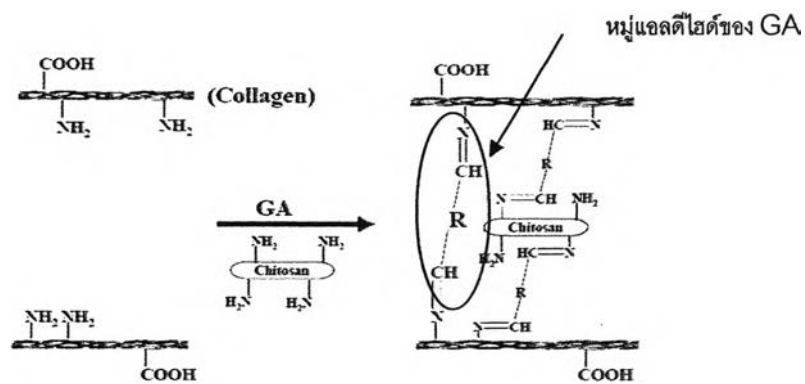
(ที่มา : Lee, C.R., 2001; 22: 3145-3154)

การเชื่อมขวางไคโตซานกับ GA เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของ GA กับหมู่เอมีน (-NH<sub>2</sub>) ของไคโตซาน หลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้วจะได้โครงสร้างอยู่ในรูปของ imine function ซึ่งพบว่าการเชื่อมขวางไคโตซาน กับ GA ดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 โครงสร้างของไคโตซานถูกเชื่อมขวางด้วย GA  
(ที่มา : Ngah, W, 2006; 277: 214-222)

โครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากคอลลาเจนเพียงอย่างเดียวมีคุณสมบัติเชิงกลที่ต่ำ และมีการย่อยสลายที่เร็ว จึงมีการทำการศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยนำวัสดุชีวภาพตัวอื่นมาผสมรวมเข้ากับคอลลาเจน ซึ่งไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพตัวหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติที่ดีในการห้ามเลือดที่ดี (hemostasis), ช่วยเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ fibroblast ใหม่ และช่วยต้านทานการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยไคโตซานสามารถให้หมู่เอมีนในการเชื่อมขวางกับหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในรูป 2.16 ดังนั้นไคโตซานที่นำมาผสมในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักสามารถใช้หมู่เอมีนช่วยในการเพิ่มปริมาณการเชื่อมขวางกับหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ซึ่งสามารถลดปริมาณสารเคมีที่ตกค้างของ GA ภายหลังจากเชื่อมโยงได้

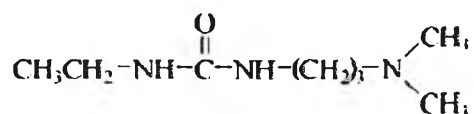


รูปที่ 2.16 โครงสร้างของคอลลาเจนกับไคโตซานเชื่อมขวางกับ GA  
(ที่มา : Ma, L., 2003; 24: 4833-4841)

หมายเหตุ R แสดงหมู่ของคาร์บอนที่อยู่ในโมเลกุล ซึ่งไม่ได้เป็นหมู่ฟังก์ชันที่ใช้เชื่อมขวาง

ข) การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

EDC (รูป 2.17) เป็นสารที่นิยมใช้กันมากในการเชื่อมขวาง เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีพิษ และมีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์และเลือด (biocompatible) โดยทำการเชื่อมขวางร่วมกับ N-hydroxysuccinimide (NHS) และบัฟเฟอร์ 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES)

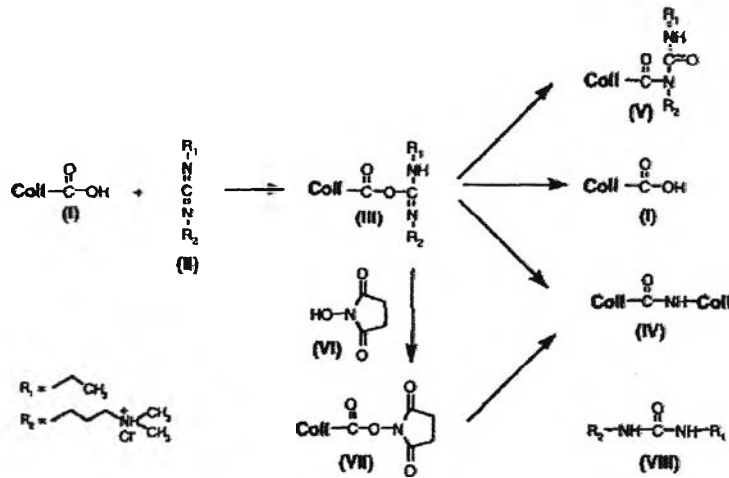


รูปที่ 2.17 โครงสร้างของ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

(ที่มา : Christiaens, P., 2006)

การเชื่อมขวางเกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน aspartic หรือ glutamic ซึ่งแสดงประจุรวมเป็นลบในคอลลาเจนกับ EDC ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือหมู่ O-acylisourea (III) จากนั้นจะเกิดการเชื่อมขวาง ต่อโดยหมู่ O-acylisourea และไปทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน lysine หรือ hydroxylysine ซึ่งแสดงประจุรวมเป็นบวก ได้เป็นกรดอะมิโนของคอลลาเจน ที่ต่อกันกับ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)urea (VIII) และการเติม N-hydroxyl succinimide (NHS) (VI) ในระหว่างการเชื่อมขวางจะช่วยเพิ่มจำนวนการเชื่อมขวาง, ลดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และเพิ่มอัตราการปฏิกิริยาในการเชื่อมขวาง โดย NHS จะหยุดปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยา อันดับแรกคือ การเกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิสของหมู่ O-acylisourea กลายเป็น 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)urea (VIII) และกลับไปเริ่มต้นใหม่ที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน และปฏิกิริยาอันดับสองหมู่ O-acylisourea ที่ไม่เสถียรจะจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของหมู่ N-acylurea (V) การทำงานของ NHS จะทำการเปลี่ยนหมู่ O-acylisourea ให้เป็นหมู่ NHS-activated carboxylic (VII) ซึ่งจะมีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ pH ต่ำๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหมู่ O-acylisourea [Damink, LO. และคณะ, 1996] ดังแสดงในรูปที่ 2.18



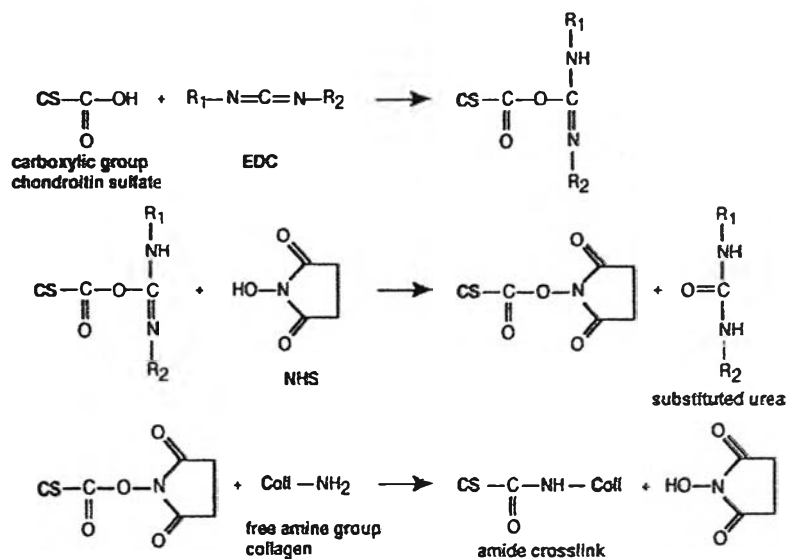


รูปที่ 2.18 การเชื่อมขวางของคอลลาเจนกับ EDC และ NHS

(ที่มา : Olde Damink, 1996; 17: 765-773)

การซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เช่น กระดูกอ่อน (cartilage) , กระดูก (bone) หรือ กล้ามเนื้อ (muscle) นั้น ได้มีการนำสารที่มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์และเลือด และสารที่มีความสามารถในการย่อยสลายมาใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย ซึ่งคอลลาเจนเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ เนื่องจากมีผลในการยึดเกาะของเซลล์ (cell-adhesion), การแพร่พันธุ์ของเซลล์ (proliferation) และการเกิดเป็นเนื้อเยื่อใหม่ แต่ข้อเสียของการนำคอลลาเจนมาใช้คือ มีสมบัติเชิงกล (ความแข็งแรง) ที่ต่ำ และมีการย่อยสลายที่เร็ว ดังนั้นจึงได้ใช้กระบวนการเชื่อมขวางด้วยสารเคมีเพื่อให้ได้คุณสมบัติเชิงกลที่ต้องการ โดยได้มีการศึกษาและคัดเลือกสารเคมี ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้คือ GA โดยจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (amino groups) ของคอลลาเจน แต่พบว่า GA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งในร่างกาย (in vivo) และในห้องทดลอง (in vitro) ซึ่งเกิดจากสารพิษที่ตกค้าง GA ภายหลังจากการเชื่อมขวาง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาสารที่ใช้เป็นตัวเชื่อมขวาง โดยได้มีการนำ EDC และ NHS มาทำการเชื่อมขวางกับคอลลาเจน ซึ่งมีความเข้ากันได้กับเซลล์และเลือด รวมทั้งส่งผลให้เซลล์สามารถแพร่พันธุ์ได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยในการยับยั้งอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยคอลลาเจนที่นำมาเชื่อมขวางสามารถสกัดได้จากวัว , หมู และแกะ เป็นต้น แต่ถ้าใช้คอลลาเจนที่สกัดมาจากวัวจะค่อนข้างมีความเสี่ยงจากโรควัวบ้า (mad cow disease) ซึ่งจะต้องผ่านการตรวจสอบก่อนที่จะนำมาทำเป็นสารเชื่อมขวาง นอกจากนี้ก็ยังสามารถเลือกใช้คอลลาเจนที่สกัดได้จากม้า ซึ่งมีความเสี่ยงจากการติดเชื้อหรือโรคติดต่อน้อยกว่าวัว ในการวัดระดับการเชื่อมขวางของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถวัดได้โดยแอสซาย์โครงเลี้ยงเซลล์ลงในสาร 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid (TNBS) แล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อให้โครงเลี้ยงเซลล์เกิดการละลาย จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง

spectrophotometer เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาระดับการเชื่อมขวาง โดยคิดจากค่าการดูดกลืนแสงของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมพันธะกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมพันธะ [Nagai, N. และคณะ, 2004] ในเวลาต่อมาได้มีการนำโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนมาผสมกับไกลโคซามิโนไกลแคน (GAG) เพิ่มเติมลงไปเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดย GAG ที่นำมาใช้จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆดังนี้ เช่น ชนิด, ตำแหน่งของ GAG ในโครงสร้าง และความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนที่นำ GAG มาผสมเพิ่มลงไป เมื่อทำการศึกษาพบว่า GAG ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลิกสร้างพันธะโควาเลนต์กับคอลลาเจนซึ่งมีหมู่เอมีน โดยใช้ EDC และ NHS เป็นตัวเชื่อมขวางโดย GAG ที่เลือกใช้จะเป็น chondroitin sulfate ซึ่งเป็น GAG ที่สามารถหาได้ง่ายและพบมากที่สุดดังแสดงในรูป 2.19



รูปที่ 2.19 การเชื่อมขวางโควาเลนต์ระหว่าง chondroitin sulfate กับคอลลาเจน โดยใช้ EDC และ NHS

(ที่มา : Pieper, J.S., 1999; 20: 1999: 847-858)

การเชื่อมขวางของคอลลาเจนโดยใช้ GA โมเลกุลของ GA จะเข้าไปแทรกวมอยู่กับคอลลาเจน โดยการเชื่อมขวางด้วย GA นี้มักมีสารพิษตกค้างหลังจากการเชื่อมขวาง เนื่องจากกำจัด GA ออกจากโครงเลี้ยงเซลล์ได้ไม่หมด ซึ่งจะส่งผลร้ายต่อเซลล์ (cytotoxicity) จึงได้มีการพัฒนาการเชื่อมขวางเพื่อป้องกันสารพิษที่หลงเหลือหลังกระบวนการเชื่อมขวางโดยได้มีการเปลี่ยนสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมขวาง (crosslinking agent) เป็น EDC และ NHS ซึ่งเป็นสารที่สามารถกำจัดสารพิษที่หลงเหลือหลังกระบวนการเชื่อมขวางได้ โดยการล้างด้วยน้ำกลั่นซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นอนุพันธ์ของยูเรีย [Wissink, M.J.B. และคณะ, 2001] นอกจากนี้ก็ยังสามารถใช้

GAG ตัวอื่นๆได้อีกไม่ว่าจะเป็น dermatan sulfate , heparin sulfate หรือ heparin มาผสมรวมกับคอลลาเจน [Pieper, J.S. และคณะ, 1999]

ความแตกต่างระหว่างการใช้สารเคมี EDC และ GA คือ โมเลกุลของ EDC จะไม่มีสารพิษตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการเชื่อมขวาง คือ อนุพันธ์ของยูเรีย หรือ 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) urea ที่สามารถกำจัดออกได้โดยการละลายน้ำทำให้ไม่มีสารตกค้างในโมเลกุลของสารพวกโปรตีน ด้วยเหตุนี้โครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย EDC จึงมีความเป็นพิษที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม EDC กำลังอยู่ในระหว่างกระบวนการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา [Liu, H. และคณะ, 2004] ส่วนการเชื่อมขวางโดยใช้ GA จะมี GA ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์หลังการเชื่อมขวาง ซึ่งมักจะมีกระบวนการกำจัดหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ที่ตกค้างอยู่ได้โดยการล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยไกลซีน เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ของ GA ที่เกินพอและล้างต่อน้ำหลายรอบ [Ozeki, M., 2004] ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเชื่อมขวางด้วย GA มีความเป็นเนื้อเดียวกันสูงเนื่องจาก GA มีการกระจายตัวของพันธะทางเคมีอย่างเป็นระเบียบในโมเลกุล ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ได้นั้นมีสมบัติทางกลที่สูงขึ้น [Goissis, G. และคณะ, 1998]

#### 2.14 ลักษณะที่เหมาะสมของท่อนำเส้นประสาทส่วนปลาย

จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องทั้งจากงานวิจัยและผลิตภัณฑ์ จึงประมวลลักษณะสมบัติของท่อนำเส้นประสาทที่น่าจะให้ผลดีในการส่งเสริมการงอกใหม่ของเส้นประสาทส่วนปลาย ได้ดังนี้

- เป็นท่อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในอยู่ในระหว่าง 1.5- 10 มิลลิเมตร และความยาวของท่อนำเส้นประสาทไม่น้อยกว่าระยะขาด (โดยทั่วไปนิยมในสัตว์ทดลองโดยมีระยะขาด 10 มิลลิเมตร) เนื่องจากไม่มีรายงานขนาดของเส้นประสาทในร่างกายดังนั้นการเลือกใช้ขึ้นกับวิจรรณญาณของศัลยแพทย์ที่ทำการผ่าตัด โดยควรเลือกขนาดให้เหมาะสมกับเส้นประสาทคือไม่บีบรัดเส้นประสาทและไม่ใหญ่กว่าเส้นประสาทมากเกินไป
- มีรูพรุนขนาดไม่น้อยกว่า 8 ไมโครเมตร (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดฝอย 8 ไมโครเมตร [สุวรรณ ธีระวรพันธ์, 2531]) เพื่อให้หลอดเลือดสามารถเจริญเข้าภายในและแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนและสารอาหารให้เส้นประสาทและส่วนของเซลล์ภายในที่จำเป็นต่อการงอกของเส้นประสาทสามารถดำรงอยู่ได้ ในส่วนสารที่จำเป็นต่อการงอกของเส้นประสาทนั้น เส้นประสาทที่ขาดและ Schwann cell ในเส้นประสาทที่ขาดสามารถสังเคราะห์ได้เองอยู่แล้วคือ ได้แก่ Nerve growth factor (NGF), Brain derived neurotrophic factor (BDNF) และ Ciliary neurotrophic factor (CNTF) [Evans, G., 2000]

- ท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตขึ้นสามารถเย็บได้, มีความแข็งแรง, ไม่ขาดง่ายและง่ายต่อการหยาบจับขณะเย็บ โดยมีรายงานการทดสอบความทนแรงดึงในเส้นประสาท sciatic ของหนู F344 (F344 rat) ซึ่งมีค่า Elastic modulus (ซึ่งแสดงถึงความแข็งแรงของวัตถุนั้น) ประมาณ 0.576 MPa ค่า Tensile strength (ซึ่งแสดงถึงความสามารถของวัตถุในการทนต่อแรงกระทำ) ประมาณ 1.4 MPa ดังนั้นค่าทั้งสองไม่ควรน้อยกว่านี้ [Borschel, G., และคณะ, 2003]
- คงไว้ซึ่งโครงสร้างของท่อนำเส้นประสาทอย่างน้อย 3 เดือน [Pfister, L., และคณะ 2004] เพื่อให้เส้นประสาทสามารถเจริญ (ด้วยอัตราเร็ว 1-2 มิลลิเมตรต่อวัน) ผ่านภายใน Band of Bungner ของ Schwann cell ที่อยู่บริเวณท่อนำเส้นประสาทไปได้ก่อนและในระหว่างนี้จะมีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหุ้มรอบเส้นประสาทที่อกใหม่ ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหล่านี้ช่วยป้องกันอันตรายให้กับเส้นประสาทที่อกใหม่ได้ และจากหลายข้อมูลท่อนำเส้นประสาทสามารถย่อยสลายตัวได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 3-12 เดือน [Lee, DU., และคณะ 2006, Nicoli Aldini, N., และคณะ 2000, Marietta, J.O.E., และคณะ 2005] แต่อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะห่างระหว่างปลายที่ขาดถ้ามากการงอกใหม่ของเส้นประสาทจะใช้เวลาานาน, อายุของผู้ป่วยถ้าสูงอายุการงอกใหม่ของเส้นประสาทจะช้ากว่าในเด็ก เป็นต้น
- สามารถบรรจุและควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์เพื่อช่วยในการงอกใหม่ของเส้นประสาทได้ นอกจากนี้โกรทแฟคเตอร์ยังมีผลถึงระยะที่มีการสร้างเยื่อ Myelin (Myelination) และระยะ Maturation ของ Axon ด้วย ดังนั้นระยะที่มีการควบคุมการปลดปล่อยควรอยู่ได้อย่างน้อย 2-3 เดือน
- ท่อนำเส้นประสาทและสิ่งทีบรรจุภายในมีความคงทนทนต่อกระบวนการฆ่าเชื้อ (Sterilization) และไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมี