บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

เพื่อพัฒนาท่อนำเส้นประสาทแบบใหม่ที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ งานวิจัยนี้จึงออกแบบการทดลองโดยขั้นแรกได้ศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีนตัวเติมแบบฟองน้ำจากคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ต่อมาได้ศึกษาการเชื่อมขวางโปรตีนตัวเติมทั้ง 3 ชนิด ด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสม (การเชื่อมขวางสูงสุด) แล้วจึงขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเติมทั้ง 3 ชนิดแล้วดูดซับด้วยโกรทแฟคเตอร์ จึงนำไปทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการงอกใหม่ของเส้นประสาทในสัตว์ทดลอง

โปรตีนตัวเติมแบบฟองน้ำจาก คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B เพื่อศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ NGF และ bFGF จากโปรตีนตัวเติมที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ เพื่อมุ่งหวังให้เกิดการสลายตัวน้อยที่สุด โดยต้องการอาศัยสมบัติความแตกต่างระหว่างประจุของโกรทแฟคเตอร์และโปรตีนตัวเติม ซึ่งคาดว่าเจลาตินชนิด B จะสามารถช่วยควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ทั้งสองชนิดโดยอาศัยสมบัติดังกล่าว เนื่องจากโกรทแฟตเตอร์ทั้ง NGF และ bFGF มีรายงานว่ามีประจุบวกจึงควรจับกับเจลาตินชนิด B ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นลบ แต่ในงานวิจัยนี้พบว่าแม้เจลาตินชนิด B สามารถช่วยควบคุมการปลดปล่อยได้แต่ยังให้ผลการปลดปล่อย bFGF ใกล้เคียงกับเจลาตินชนิด A ในกรณีการปลดปล่อย NGF พบว่าเจลาตินชนิด B จะปลดปล่อย NGF ออกมาปริมาณน้อยที่สุดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประจุที่ต่างกันระหว่างเจลาตินชนิด B และ NGF มีผลทำให้ NGF จับกับเจลาตินชนิด B ได้ดีจึงทำให้ NGF ถูกปลดปล่อยออกมาปริมาณน้อยที่สุด

จากงานศึกษาวิจัยที่มีการใช้โกรทแฟตเตอร์กับเส้นประสาท พบว่า NGF เพิ่มการงอกใหม่ของเส้นประสาทและเพิ่มการเคลื่อนย้าย (Migration) ของ Schwann cell มายังบริเวณที่มีการบาดเจ็บของเส้นประสาท [Evans, G., 2000; Lee, A., และคณะ, 2003; Xu, X., และคณะ, 2003; YANNAS, IV., 2001;] นอกจากนี้ bFGF ยังมีรายงานเช่นกันว่าช่วยส่งเสริมการงอกของเส้นประสาทและเพิ่มการเจริญของ Schwann cell แต่ยับยั้งกระบวนการเกิดการสร้างเยื่อ Myelin (Myelination) [Grothe, C. และ Nikkhah, G., 2001] ดังนั้นในวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกใช้ NGF มาทดสอบในสัตว์ทดลอง

สำหรับการเชื่อมขวางโปรตีนตัวเติมสำหรับใช้ในท่อนำเส้นประสาทด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนซึ่งเป็นวิธีใหม่ที่ไม่มีการรายงานมาก่อนและเหตุผลที่เลือกการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้เนื่องจากการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี เช่นกลูทาราลดีไฮด์ ต้องใช้น้ำเป็นส่วนประกอบในขั้นตอนการเชื่อมขวาง ซึ่งน้ำสามารถทำให้ PLCL สลายตัวก่อนการใช้งานจริงได้ ส่วนการเชื่อมขวางด้วยความร้อนจะทำให้ท่อนำเส้นประสาท PLCL หลอมเหลวจึงก่อให้เกิดการเสียรูปดังนั้นจึงเลือกใช้การเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนโดยขึ้นรูปโปรตีนตัวเติมภายในท่อ PFA แล้วหาสภาวะที่เหมาะสม (การเชื่อมขวางสูงสุด) โดยเปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (DHT) พบว่าคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A ควรใช้ความดันก๊าซอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ 5 พัลส์ และเจลาตินชนิด B ควรใช้ความดันก๊าซอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ 1 พัลส์ จะเห็นได้ว่าต้องอาศัยสภาวะที่เหมาะสม (การเชื่อมขวางสูงสุด) ของโปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันไปและการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนยังให้ระดับการเชื่อมขวางใกล้เคียงกับวิธี DHT แม้ว่าการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมามีลักษณะเป็นช่วงที่ไม่ต่อเนื่องและใช้เวลาในการเชื่อมขวางสั้นกว่าแต่สามารถให้ระดับการเชื่อมขวางในบางสภาวะใกล้เคียงวิธี DHT แสดงถึงว่าการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์ใช้พลังงานที่สูงกว่าจึงใช้เวลาที่สั้น

สำหรับการผลิตท่อนำเส้นประสาทเลือกใช้ PLCL เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้ในสิ่งมีชีวิตและไม่พบความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอีกทั้งมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีไม่ขาดง่าย [Nicoli N. และคณะ, 1996a; 2000b] จึงขึ้นรูปด้วยวิธี Dip-coating ได้ท่อนำเส้นประสาทเส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 1.6 mm หนาประมาณ 0.3 mm ยาว 1.4 cm ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมสำหรับเส้นประสาท sciatic ในสัตว์ทดลองนอกจากนี้ยังไม่ขาดและไม่แฟบง่ายโดยมีค่าความทนแรงดึงประมาณ 1 MPa และมีค่าความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด ประมาณ 100 % เพราะฉะนั้น PLCL เหมาะสำหรับนำมาผลิตเป็นท่อนำเส้นประสาท

การศึกษาความเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 fibroblasts) พบว่าที่ PLCL ความเข้มข้นสูงมีผลให้การเจริญของเซลล์น้อยกว่า PLCL ที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า PLCL ในทุกความเข้มข้นมีการเจริญของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ (Zinc sulphate)

ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ปลูกถ่ายใต้ผิวหนังหนู Wistar มีการสลายตัวเกิดขึ้นเนื่องจากมีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลและค่า PDI สูงขึ้นแต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีการสลายตัวค่อนข้างช้าเนื่องจากท่อยังคงสภาพค่อนข้างสมบูรณ์เมื่อนำออกมาจากสัตว์ทดลองหลังจากเวลาผ่านไป 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ดังนั้นอาจเกิดผลเสียกรณีที่สลายตัวช้าเกินไปเพราะอาจไปกดทับเส้นประสาทที่งอกใหม่ ดังนั้นการคงอยู่ของท่อนำเส้นประสาทควรสวนทางกับการเจริญของเส้นประสาทที่งอกใหม่ไปยังอวัยวะเป้าหมายที่เคยควบคุมการทำงานอยู่

การทดสอบการเชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ที่มีระยะขาด 10 มิลลิเมตร ในหนู Wistar ด้วยท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเติมทั้ง 3 ชนิด ซึ่งผ่านการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน สำหรับควบคุมการปลดปล่อย NGF มีผลแสดงว่าเส้นประสาทสามารถเจริญในท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุโปรตีนตัวเติมทุกชนิด แต่การเจริญเด่นชัดในท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามเส้นประสาทที่งอกใหม่ยังมีขนาดเล็กเนื่องจากเวลา 1 เดือนค่อนข้างสั้น นอกจากนี้ยังพบว่าโดยรอบท่อ PLCL มีเนื้อเยื่อพังผืดหุ้มอยู่แต่ไม่ก่อให้เกิดการเสียรูปของท่อนำเส้นประสาท รวมถึงยังมี Multinucleate giant cells ที่ผนังของท่อนำเส้นประสาท PLCL ซึ่งแสดงถึงกลไกปกติของร่างกายในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกาย

5.2 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

5.2.1 สามารถผลิตท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL สัดส่วน Lactide: caprolactone 75:25 ความเข้มข้น 3% ด้วยวิธี Dip-coating ซึ่งสามารถผลิตได้ง่ายได้ขนาดและรูพรุนที่พอเหมาะและสามารถนำมาศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองได้

5.2.2 ทราบสภาวะการเชื่อมขวางของโปรตีน 3 ชนิด (คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B) จากการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน (รายงานเป็นครั้งแรก)

5.2.3 ทราบข้อมูลการสลายตัวของ PLCL สัดส่วน Lactide: caprolactone 75:25 ความเข้มข้น 3% น้ำหนักโมเลกุล 300,000 จากการปลูกถ่ายใต้ผิวหนังหนู Wistar

5.2.4 ทราบข้อมูลการเจริญของเส้นประสาทว่าท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุเจลาตินทั้งสองชนิดให้ผลในการเจริญของเส้นประสาทมากกว่าคอลลาเจน

5.2.5 ต้นแบบระบบท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตจาก PLCL บรรจุโปรตีนตัวเติมควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ที่สามารถกระตุ้นการงอกใหม่ของเส้นประสาทส่วนปลายในขั้นการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง เนื่องจากผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ยังไม่มีการผลิตในระดับการค้า

5.2.6 ทราบข้อมูลที่จะเป็นแนวทางในการพัฒนาท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL สำหรับผลิตใช้ภายในมนุษย์ต่อไป

5.2.7 ส่งเสริมงานวิจัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตและการรักษาการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลายด้วยเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

5.3 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ผลการวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นนำไปสู่การใช้งานจริง จึงมีแนวทางปรับปรุงและศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

5.3.1 การศึกษาการเจริญของเส้นประสาทควรใช้ระยะเวลานานขึ้นเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลการเจริญของเส้นประสาทได้ชัดเจนขึ้น รวมถึงเพื่อให้เห็นความแตกต่างของการเจริญของเส้นประสาทในโปรตีนตัวเติมแต่ละชนิดและการศึกษาเพิ่มเติมควรครอบคลุมถึงการศึกษาหน้าที่การทำงานของเส้นประสาทที่งอกใหม่ด้วย

5.3.2 ควรเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน Lactide : Caprolactone ของ PLCL เพื่อให้เกิดการสลายตัวเร็วขึ้นหรืออาจปรับเปลี่ยนความเข้มข้นรวมถึงใช้น้ำหนักโมเลกุลที่น้อยลงเพื่อให้สลายตัวได้เร็วขึ้น