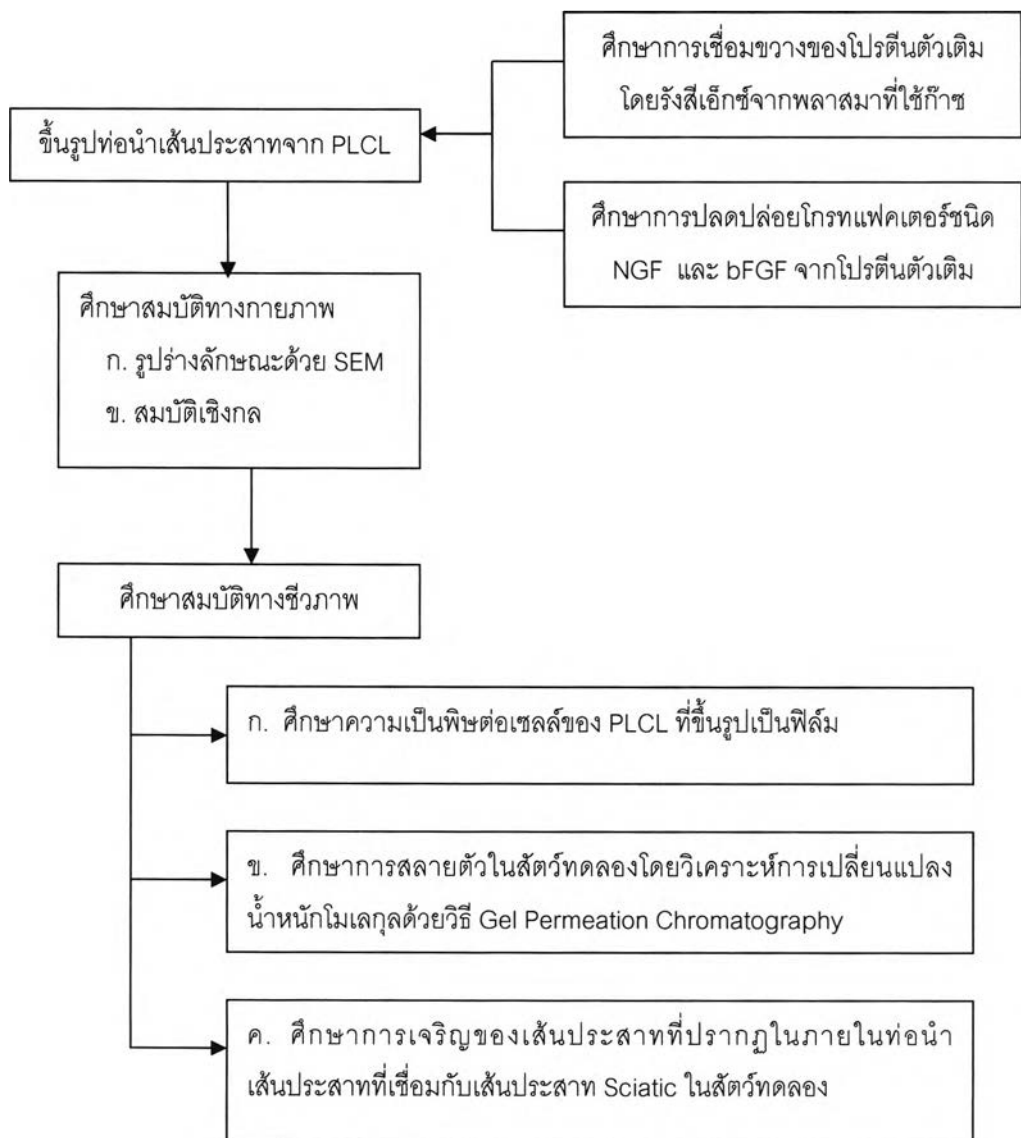




ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL ที่ขึ้นรูปโดยวิธี Dip-coating ได้บรรจุโปรตีนตัวเต็มได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B และทำการเชื่อมขวางของโปรตีนดังกล่าวด้วย รั้งสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม ได้ผ่านกระบวนการทดสอบสมบัติทั้งทางกายภาพและชีวภาพโดยมีกระบวนการดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ขั้นตอนการศึกษาสมบัติของท่อนำเส้นประสาท

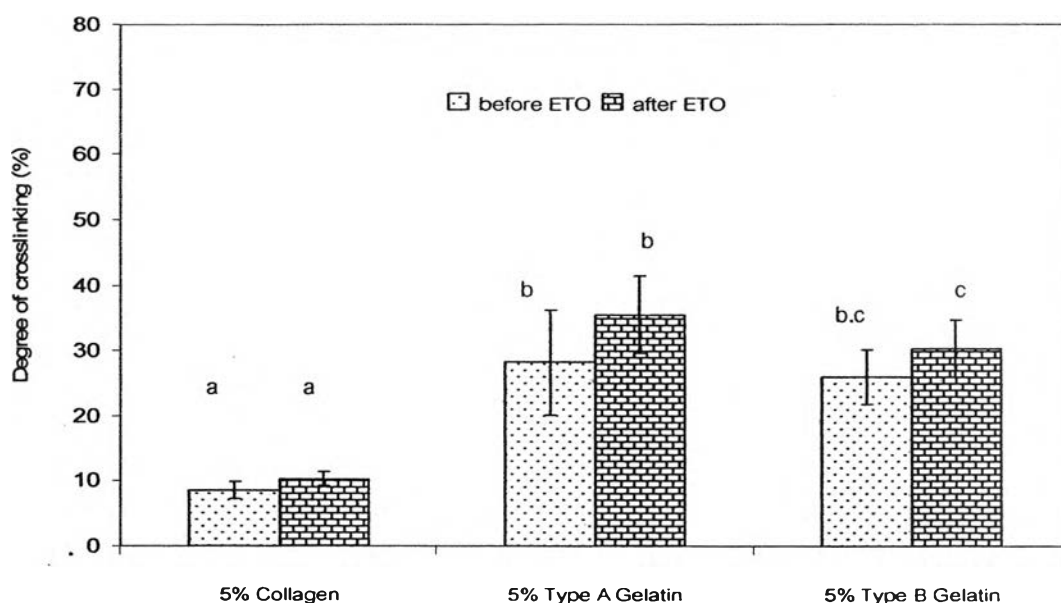
#### 4.1 ผลการศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีนตัวเต็มแบบฟองน้ำ

เนื่องจากมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้โปรตีนดูดซับโกรทแฟคเตอร์โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างประจุของโปรตีนที่ดูดซับและโกรทแฟคเตอร์ เพื่อใช้สำหรับการช่วยปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์โดยมีข้อมูลว่าเจลาตินชนิด B ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นลบ สามารถใช้ดูดซับ bFGF โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างประจุเนื่องจากเจลาตินชนิด B เมื่ออยู่ในสภาวะ pH 7.4 จะแสดงประจุเป็นลบและสามารถใช้ดูดซับและให้ควบคุมการปลดปล่อย bFGF ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นบวกได้ [Tabata, Y. และคณะ, 1998; 1999; Young, S. และคณะ, 2005] ในกรณีของ NGF ที่มีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 9.3 [Herrup, K. และ Shooter, E.M., 1993] เพราะฉะนั้นจึงมีประจุบวกเมื่ออยู่ในร่างกายซึ่งมี pH เท่ากับ 7.4 และยังมีงานวิจัยที่ใช้โปรตีนไฟโบรอินจากไหมซึ่งมีประจุลบช่วยควบคุมการปลดปล่อย NGF ที่มีประจุบวกสำหรับการส่งเสริมเจริญของเซลล์ประสาท [Uebersax, L. และคณะ, 2007] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการใช้เจลาตินชนิด B ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นลบในการควบคุมการปลดปล่อย NGF และ bFGF ซึ่งมีประจุบวกโดยอาศัยความแตกต่างระหว่างประจุและใช้คอลลาเจนกับเจลาตินชนิด A ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นบวกสำหรับเป็นกลุ่มควบคุมลบที่ใช้ควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ทั้งสองชนิด สาเหตุที่ใช้ทั้งคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A เนื่องจากคอลลาเจนเป็นสารตั้งต้นที่นำมาผลิตเจลาตินและยังมีประจุโดยรวมเป็นบวก ส่วนของเจลาตินชนิด A เป็นเจลาตินเช่นเดียวกันได้มาจากคอลลาเจนโดยผ่านกระบวนการ Acid process และมีประจุโดยรวมเป็นบวกจึงนำมาใช้เป็นกลุ่มควบคุมลบเพื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินชนิด B ในการควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) ,และในการศึกษาการเจริญของเส้นประสาทในท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบบรรจุโปรตีนตัวเต็มในสัตว์ทดลอง รวมถึงยังใช้ร่วมในการศึกษาเพื่อหาสภาวะการเชื่อมขวางเนื่องจากมีผลเกี่ยวเนื่องจากการใช้เป็นตัวเปรียบเทียบตั้งแต่ขั้นการศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์

ในการศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ 2 ชนิด คือ NGF และ bFGF จากโปรตีนตัวเต็มแบบฟองน้ำของคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ที่เตรียมจากสารละลายความเข้มข้น 5% โดยเชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ 0.65% [Yamamoto, M. และคณะ, 2003] เนื่องจากกลูทาราลดีไฮด์ให้ระดับการเชื่อมขวางเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป [Ma, L. และคณะ, 2003; Hennink, W.E. และคณะ, 2002] เพื่อให้โปรตีนมีการย่อยสลายน้อยที่สุดระหว่างการทดสอบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์โดยอาศัยการแพร่ (Diffusion) ในระดับห้องปฏิบัติการ

เมื่อหาระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มแบบฟองน้ำทั้ง 3 ชนิดก่อนและหลังฆ่าเชื้อด้วยการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์ซึ่งเป็นวิธีฆ่าเชื้อมาตรฐานของอุปกรณ์การแพทย์ในโรงพยาบาล

พบว่าระดับการเชื่อมขวางก่อนการฆ่าเชื้อค่อนข้างสูงอยู่แล้วแต่ภายหลังฆ่าเชื้อพบว่าระดับการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับก่อนฆ่าเชื้อ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B แบบฟองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ ทั้งก่อนและหลังการอบฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์

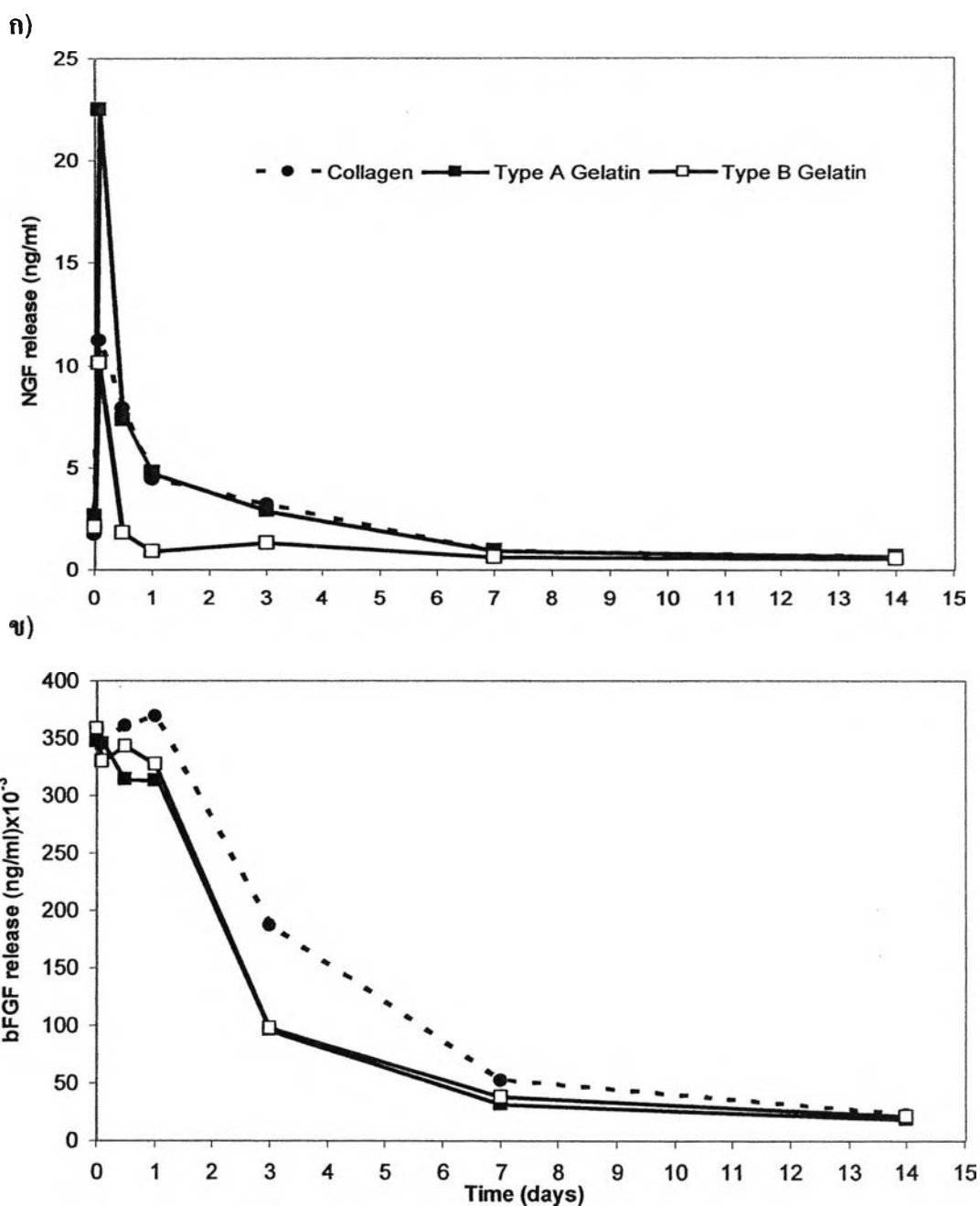
หมายเหตุ: ตัวอักษร a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการเชื่อมขวางที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  ( $n=4$ )

การทดสอบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ทั้ง NGF และ bFGF จากโปรตีนตัวเต็ม (ที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์) ที่เวลา 0, 2, 12, 24 ชั่วโมง, 3 วัน, 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน ในช่วงแรกมีการแพร่ของโกรทแฟคเตอร์ออกมาค่อนข้างสูงและตั้งแต่วันที่ 14 เป็นต้นไปการปลดปล่อยค่อนข้างคงที่

โปรตีนตัวเต็มทั้ง 3 ชนิด มีการปลดปล่อย NGF (รูปที่ 4.3 ก) ตั้งแต่เริ่มต้นถึง 2 ชั่วโมง แพร่ออกมาอย่างรวดเร็วจากบริเวณผิวของโปรตีน ในที่นี้รวมถึง NGF ที่เหลือเกินและไม่ได้จับกับโปรตีนด้วย การปลดปล่อย NGF จากโปรตีนตัวเต็มทั้ง 3 ชนิด ที่ 2 ชั่วโมง สูงขึ้นกว่าที่เวลา 0 ชั่วโมงและหลังจาก 2 ชั่วโมง ถึง 7 วัน การปลดปล่อยจะค่อยๆลดลง และหลังจาก 7 วัน ค่อนข้างต่ำอย่างคงที่และใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบการปลดปล่อย NGF จากโปรตีน ที่เวลา 2 ชั่วโมง การปลดปล่อย NGF จากเจลาตินชนิด A สูงที่สุด แต่คอลลาเจนและเจลาตินชนิด B ใกล้เคียงกัน และตั้งแต่วันที่ 12 ชั่วโมง ถึง 7 วัน การปลดปล่อย NGF จากคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A ค่อนข้างใกล้เคียงกันและสูงกว่าเจลาตินชนิด B เมื่อพิจารณาปริมาณที่ปลดปล่อย NGF จากพื้นที่ได้กราฟ (จากรูป 4.3 ก และตาราง ก.5 ในภาคผนวก ก) ซึ่งแสดงถึงปริมาณ NGF ที่ปลดปล่อย

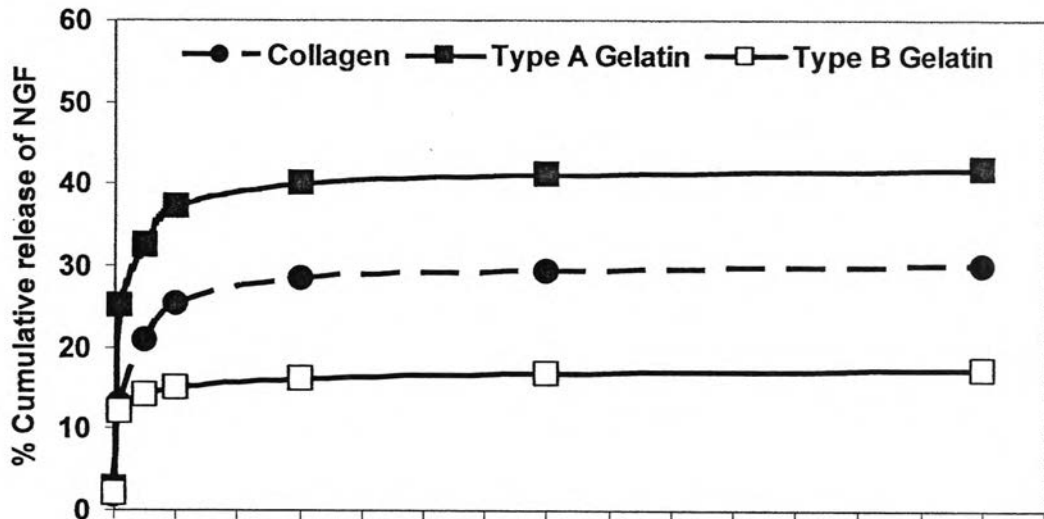
ออกมาทั้งหมดและจากข้อมูลร้อยละการปลดปล่อยสะสม (รูป 4.4 ก.) พบว่าทั้งคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A มีการปลดปล่อยออกมาค่อนข้างใกล้เคียงกันและสูงกว่าเจลาตินชนิด B ประมาณ 2 เท่า แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากเจลาตินชนิด B มีประจุโดยรวมเป็นลบ [Tabata, Y. และคณะ, 1998ก; 1998ข; 1999; Young, S. และคณะ, 2005] มีผลช่วยในการควบคุมการปลดปล่อย NGF ซึ่งมีประจุตรงข้าม [Herrup, K. และ Shooter, E.M., 1993] โดยอาศัยสมบัติความแตกต่างระหว่างประจุเข้ามาช่วยควบคุมการปลดปล่อยปริมาณการปลดปล่อย NGF จึงต่ำกว่าคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A

การปลดปล่อย bFGF จากโปรตีนตัวเต็ม (รูป 4.3 ข) พบว่าลักษณะการปลดปล่อย bFGF ของโปรตีนแต่ละชนิดจะมีรูปแบบคล้ายกันคือตั้งแต่เวลาเริ่มต้นถึง 24 ชั่วโมงจะมีการปลดปล่อยออกมาในปริมาณสูงอาจเนื่องมาจากการแพร่ออกมาอย่างรวดเร็วของ bFGF ที่ติดอยู่บนผิวของโปรตีนและหลังจากนั้นการปลดปล่อยค่อยๆลดลง แต่ในช่วง 24 ชั่วโมง ถึง 7 วัน bFGF จากคอลลาเจนปลดปล่อยค่อนข้างสูงกว่าเจลาตินทั้ง 2 ชนิด ส่วนช่วง 14 วัน ถึง 28 วัน การปลดปล่อย bFGF จากโปรตีนทั้ง 3 ชนิดค่อนข้างต่ำอย่างคงที่และใกล้เคียงกัน และเมื่อคำนวณเป็นพื้นที่ใต้กราฟแสดงปริมาณทั้งหมดที่ปลดปล่อยออกมา (รูป 4.3 ข และตาราง ก.5 ในภาคผนวก ก) พบว่าคอลลาเจนมีปริมาณการปลดปล่อยออกมาสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เจลาตินชนิด A ปลดปล่อย bFGF สูงกว่าเจลาตินชนิด B ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเจลาตินชนิด B มีประจุโดยรวมเป็นลบสามารถช่วยควบคุมการปลดปล่อย bFGF โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างประจุ [Tabata, Y. และคณะ, 1998a; 1998b; 1999; Young, S. และคณะ, 2005] และกรณีของ NGF มีรายงานว่าประจุเป็นบวก [Herrup, K. และ Shooter, E.M., 1993; Uebersax, L. และคณะ, 2007] ดังนั้นการปลดปล่อย NGF และ bFGF จากเจลาตินชนิด B น้อยกว่าโปรตีนตัวเต็มชนิดอื่นโดยอาศัยสมบัติความแตกต่างระหว่างประจุ แต่โกรทแฟคเตอร์ชนิด NGF ถูกปลดปล่อยออกมาจากคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเจลาตินชนิด B รวมทั้งโกรทแฟคเตอร์ชนิด bFGF ถูกปลดปล่อยออกมาจากเจลาตินชนิด A ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเจลาตินชนิด B อาจเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนตัวเต็มแต่ละชนิดจากแรงกลขณะที่มีการปั่นผสมเพื่อให้สารละลายเข้ากันก่อนเก็บสารละลายตัวอย่างเพื่อนำไปวัดปริมาณการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์หรืออาจเกิดจากจุลชีพซึ่งมีผลต่อการสลายตัวของโปรตีนเหล่านี้โดยทำให้เกิดการย่อยสลายตัวของเอนไซม์จากจุลชีพ [นราวุธ ทองมะโรงสี, 2547] จึงทำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนตัวเต็มและส่งผลให้มีการปลดปล่อยออกมาของโกรทแฟคเตอร์ก่อนที่ควรจะเป็น

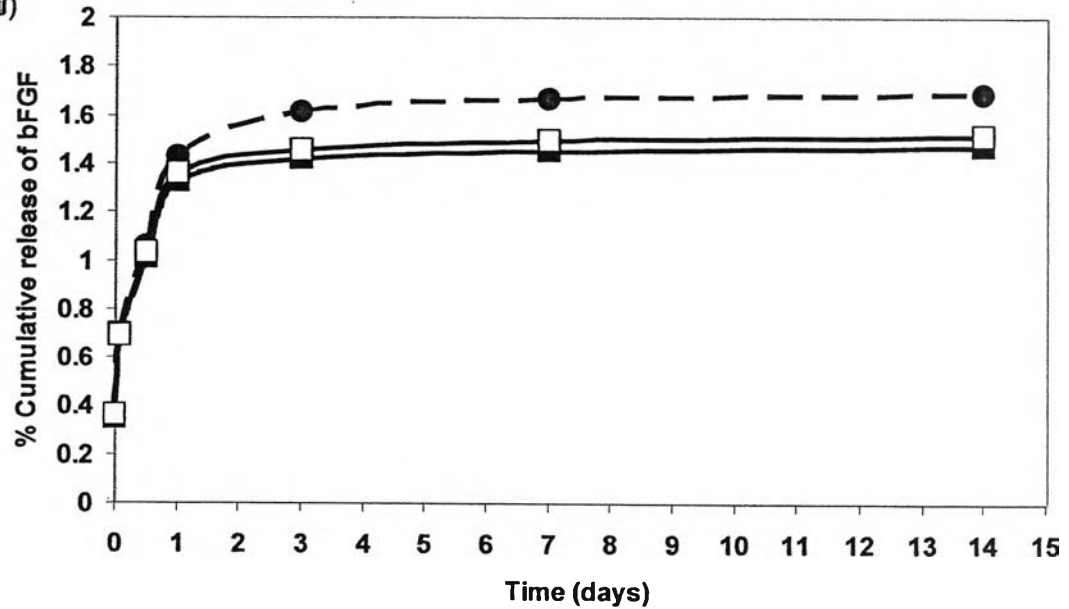


รูปที่ 4.3 การปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ ก) NGF และ ข) bFGF (100 นาโนกรัม ในสารละลาย PBS/0.1% BSA) จากโปรตีนตัวเต็มคอลลาเจน (●), เจลาตินชนิด A (■) และเจลาตินชนิด B (□) ที่เชื่อมขวางด้วยกลูทารัลดีไฮด์ ที่เวลา 0, 2, 12, 24 ชั่วโมง, 3 วัน, 7 วัน และ 14 วัน

ก)



ข)

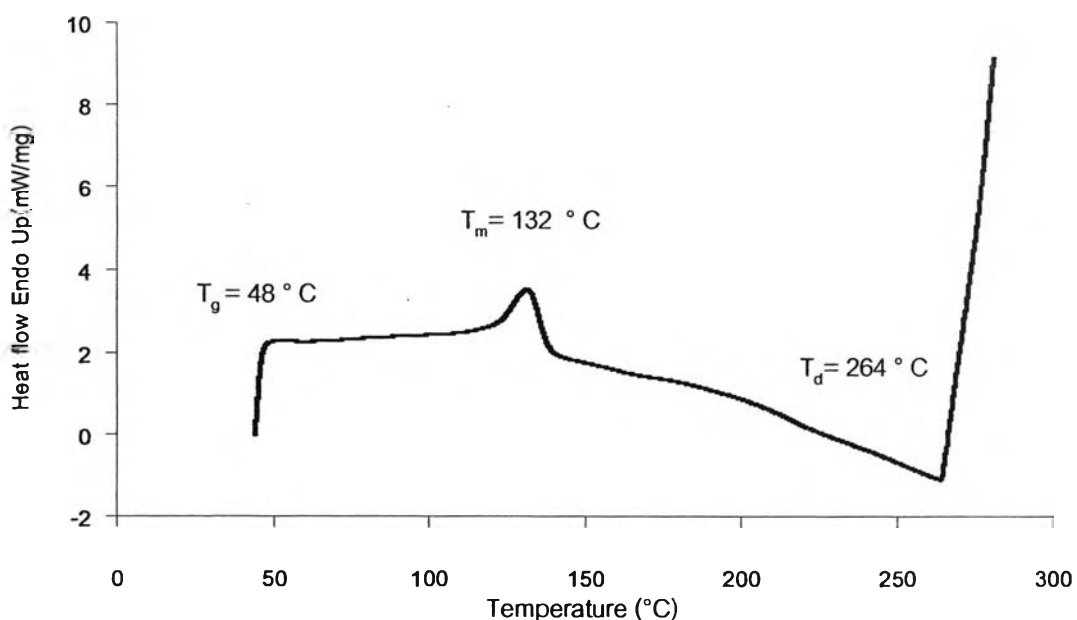


รูปที่ 4.4 ร้อยละของการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ ก) NGF และ ข) bFGF (100 นาโนกรัม ในสารละลาย PBS/0.1% BSA) จากโปรตีนตัวเต็มคอลลาเจน (●), เจลาตินชนิด A (■) และเจลาตินชนิด B (□) ที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ ที่เวลา 0, 2, 12, 24 ชั่วโมง, 3 วัน, 7 วัน และ 14 วัน

#### 4.2 ผลการศึกษาการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเดิมด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน

การเชื่อมขวางในปัจจุบันมีการนำมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติด้านความแข็งแรงคงทนของพอลิเมอร์กระบวนการเชื่อมขวางโดยทั่วไปมีหลายวิธี โดยจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ การเชื่อมขวางทางกายภาพ, การเชื่อมขวางทางเคมี และการเชื่อมขวางโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา การเชื่อมขวางทางกายภาพ ได้แก่ การใช้ความร้อน หรือ dehydrothermal treatment (DHT), การใช้รังสี เช่น UV-irradiation, การใช้พลาสมา (Plasma treatment) จากก๊าซเฉื่อย เป็นต้น การเชื่อมขวางทางเคมี ได้แก่ การใช้หมู่แอลดีไฮด์ เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (GA), formaldehyde, glycerinaldehydes, การใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) เป็นต้น [Young S. และคณะ, 2005]

การศึกษานี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเดิมด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนที่อยู่ภายในท่อนำเส้นประสาทจำลอง Perfluoroalkoxy polymer (PFA) สำหรับนำข้อมูลไปใช้กับโปรตีนตัวเดิมในท่อ PLCL ที่จะต้องทำการทดสอบสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่อไป โดยหวังผลให้โปรตีนตัวเดิมที่ผ่านการเชื่อมขวางช่วยควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟกเตอร์ได้ยาวนานขึ้นเนื่องจากโปรตีนตัวเดิมดังกล่าวสลายตัวเร็ว สาเหตุที่ทำการเชื่อมขวางโดยวิธีนี้เนื่องจากไม่ต้องการให้ท่อ PLCL เสื่อมสภาพก่อนการใช้งานจากการเชื่อมขวางด้วยวิธีการใช้ความร้อน เนื่องจากความร้อนจะทำให้เกิดการหลอมเหลวของท่อ PLCL บางส่วนก่อนการใช้งานเพราะหากเชื่อมขวางโปรตีนตัวเดิมที่บรรจุในท่อ PLCL โดยวิธี DHT จะมีผลทำให้ท่อเสียหายจากการหลอมเหลวด้วยความร้อนเนื่องจาก Melting Temperature ( $T_m$ ) ของ PLCL ประมาณ 132 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.5) หรือการใช้สารเคมี เช่น กลูตารัลดีไฮด์ หรือ ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ต้องใช้น้ำเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการ ซึ่งน้ำจะทำให้เกิดการสลายตัวก่อนการใช้งาน โดยการสลายตัวสามารถเกิดได้ทั้งส่วนของ Caprolactone และส่วนของ Lactide โดยน้ำแทรกซึมเข้าสู่ส่วนออสันฐานง่ายกว่ากรณีเป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากพอลิเมอร์ชนิดเดียว (Homopolymer) ของ Poly(Caprolactone) และ Poly(Lactic acid) [Jeong SI และคณะ, 2004] อีกทั้งการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์อาจมีการตกค้างของกลูตารัลดีไฮด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ [Ozeki M และ Tabata Y, 2005; Nagai N และคณะ, 2004] ดังนั้นจึงเลือกวิธีการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนสำหรับการเชื่อมขวางของโปรตีนภายในท่อ PLCL และจากรายงานการวิจัยของ จิตติศักดิ์ กุลเกล้าปราการ, ปี พ.ศ. 2548 พบว่าที่สภาวะของความดันก๊าซอาร์กอนแตกต่างกันจะให้พลังงานของอิเล็กตรอน, ความยาวคลื่นของรังสีเอ็กซ์และชนิดของรังสีเอ็กซ์ที่ต่างกันดังตาราง 4.1



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงสถานะตามอุณหภูมิของท่อ PLCL 75:25 (น้ำหนักโมเลกุล 300,000 ความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC) โดยมี Glass Transition Temperature ( $T_g$ ) ประมาณ 48 องศาเซลเซียส, Melting Temperature ( $T_m$ ) ประมาณ 132 องศาเซลเซียส และ Denaturation Temperature ( $T_d$ ) ประมาณ 264 องศาเซลเซียส

ตาราง 4.1 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 : จูติศักดิ์ กุลเกล้าปราการ, 2548)

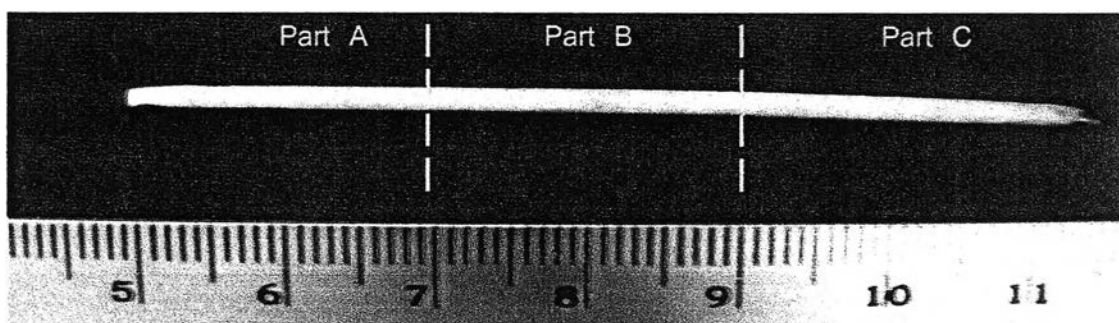
#### 4.2.1 ความสม่ำเสมอของระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเดิมในท่อ PFA

หลังการขึ้นรูปโปรตีนตัวเดิมในท่อนำเส้นประสาทจำลอง PFA และทำการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนในลักษณะช่วงที่ไม่ต่อเนื่องกัน (Pulse หรือ พัลส์) ด้วยเครื่อง Plasma focus (UNU/ICTP, ประเทศญี่ปุ่น) ที่ความดันต่างๆ คือ 0.55, 1.0 และ 1.5



มิลลิบาร์ ที่ 1, 3, 5 และ 7 พัลส์ (โดยพัลส์ที่เพิ่มขึ้นเป็นการเพิ่มจำนวนครั้งในการสัมผัสรังสีเอ็กซ์ จากพลาสติกของก๊าซอาร์กอน) เปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (DHT) โดยโปรตีน ตัวเต็มทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ความยาวประมาณ 6.5 เซนติเมตร (ขนาดประมาณ 0.204 ลบ. ซม.) ถูกตัดแบ่งเป็น 3 ท่อน คือ A, B และ C ยาวท่อนละประมาณ 2 ซม. (ขนาดประมาณ 0.063 ลบ. ซม.) (ดังภาพ 4.6) และนำมาหาระดับการเชื่อมขวางซึ่งคำนวณจากร้อยละของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงด้วยวิธี 2, 4, 6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) [N. Nagai และคณะ, 2004] ดังสมการ 4.1

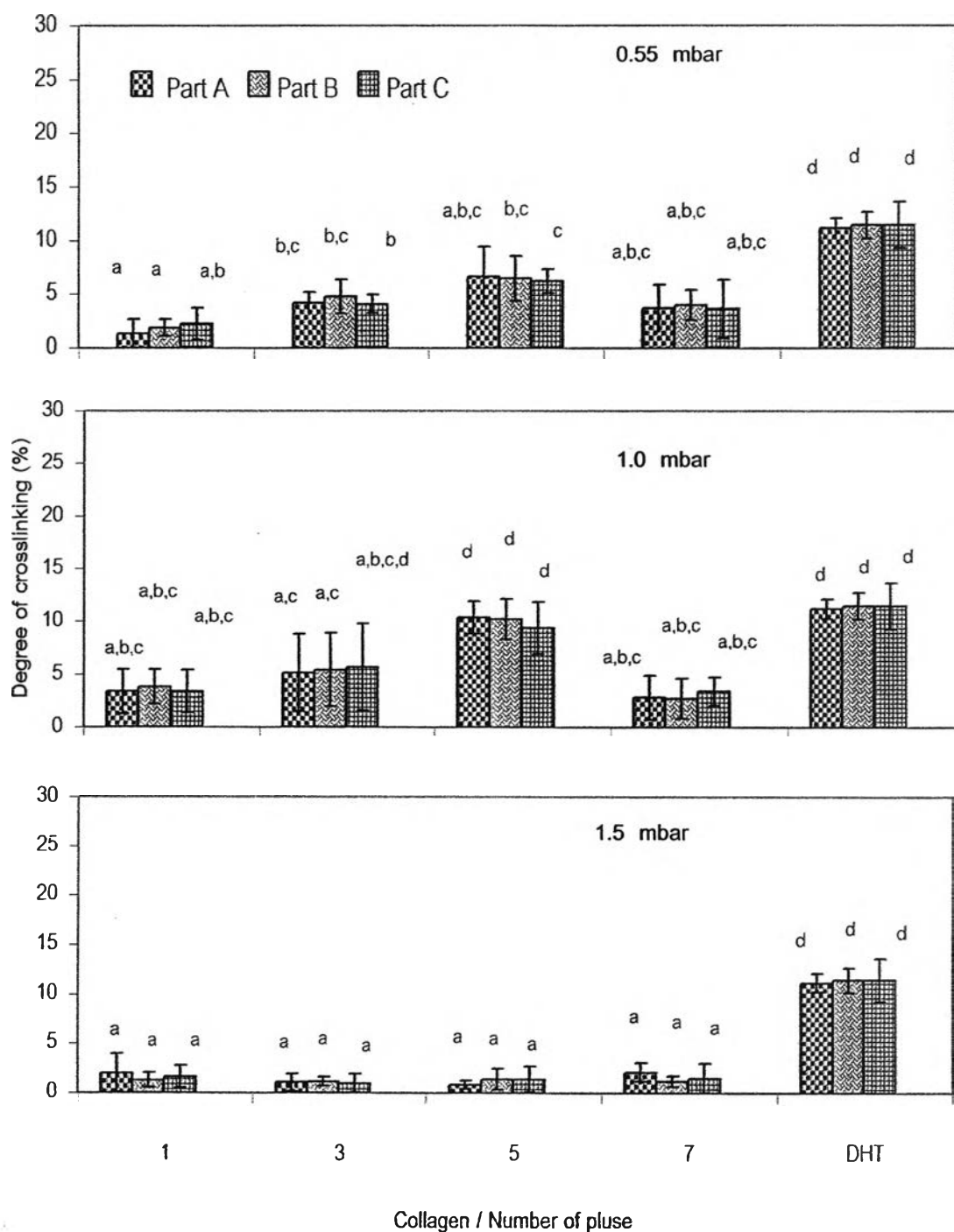
$$\text{ระดับการเชื่อมขวาง (Degree of Cross-linking)} = \left(1 - \frac{\text{ปริมาณกรดอะมิโนอิสระหลังการเชื่อมขวาง}}{\text{ปริมาณกรดอะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวาง}}\right) \times 100 \quad (4.1)$$



รูปที่ 4.6 การตัดตัวอย่างโปรตีนตัวเต็มที่ได้จากท่อ PFA เป็น 3 ส่วนคือ A, B และ C โดยมีความยาวแต่ละท่อนประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อให้หาความสัมพันธ์ของระดับการเชื่อมขวางในตัวอย่างชิ้นเดียวกัน

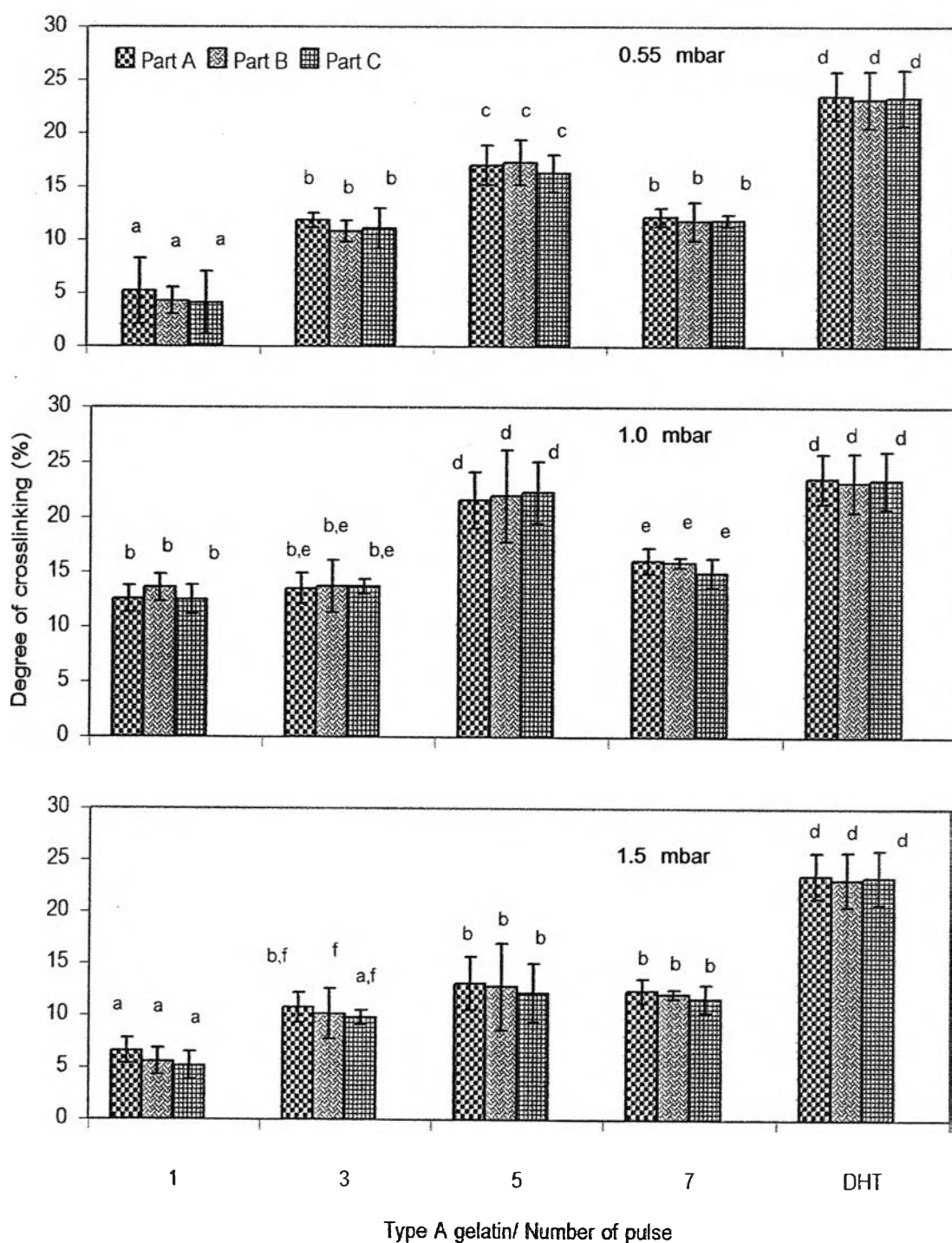
จากการศึกษาพบว่าทั้งคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B มีการเชื่อมขวาง ความสัมพันธ์เป็นเนื้อเดียวกันในตัวอย่างแต่ละชิ้น อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการศึกษาที่ใช้รังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก๊าซอาร์กอนในการเชื่อมขวางโปรตีนตัวเต็มทั้ง 3 ชนิดมาก่อน ในรูปที่ 4.7 แสดงระดับการเชื่อมขวางของคอลลาเจนด้วยรังสีเอ็กซ์พบว่าในแต่ละชิ้นของตัวอย่างมีความสัมพันธ์ของการเชื่อมขวาง การเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก๊าซอาร์กอนในคอลลาเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี DHT พบว่าที่สภาวะความดัน 0.55 และ 1.0 มิลลิบาร์ ที่ 1 ถึง 5 พัลส์ จะมีระดับการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นตามพัลส์ แต่กลับลดลงที่ 7 พัลส์และที่ความดัน 1.5 มิลลิบาร์ ของทุกพัลส์ โดยจะมีระดับการเชื่อมขวางลดลงอย่างมากคาดว่าอาจเกิดจากสภาวะนั้น

ไม่เหมาะสมหรืออาจเป็นการทำลายพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุล การเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของอาร์กอนในเจลาตินชนิด A (รูปที่ 4.8) พบว่าในแต่ละชั้นของตัวอย่างมีความสม่ำเสมอของการเชื่อมขวาง และให้ลักษณะแนวโน้มระดับการเชื่อมขวางคล้ายคอลลาเจน แต่ระดับการเชื่อมขวางโดยภาพรวมสูงกว่าคอลลาเจนมาก ระดับการเชื่อมขวางที่ความดัน 0.55 และ 1.0 มิลลิบาร์ จะสูงขึ้นตามพัลส์ตั้งแต่ 1 ถึง 5 พัลส์ หลังจากนั้นจะลดลงและที่ความดัน 1.5 มิลลิบาร์ระดับการเชื่อมขวางค่อนข้างต่ำกว่าที่ความดันอื่นและมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเมื่อพัลส์เพิ่มขึ้นแต่เริ่มครั้งที่ 5 ถึง 7 พัลส์ อาจเนื่องมาจากที่ความดันถึงจุดที่ไม่สามารถเชื่อมขวางได้เพิ่มขึ้นแล้ว ดังเช่นที่ 7 พัลส์ ที่ความดัน 0.55 และ 1.0 มิลลิบาร์ การเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของอาร์กอนในเจลาตินชนิด B (รูปที่ 4.9) พบว่าในแต่ละชั้นของตัวอย่างมีความสม่ำเสมอของการเชื่อมขวาง การเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์ที่ความดัน 0.55 และ 1.5 มิลลิบาร์ ตั้งแต่ 1 ถึง 5 พัลส์ (รูปที่ 4.9) จะมีระดับการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นตามพัลส์แต่หลังจากนั้นจะลดลงแต่ที่ 1.0 มิลลิบาร์ให้ผลต่างจากความดันอื่นคือ ที่พัลส์เพิ่มขึ้นระดับการเชื่อมขวางมีแนวโน้มลดลงอาจเนื่องมาจากสภาวะที่เหมาะสมของการเชื่อมขวางมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ความดัน 1.0 และที่ 1 พัลส์ ส่วนที่สภาวะอื่นคาดว่าประสิทธิภาพอาจไม่เหมาะสมเพียงพอคือให้ผลในการเหนี่ยวนำการเชื่อมขวางไม่เต็มทีพอหรือคาดว่าอาจเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือรุนแรงเกินไปจึงให้ผลในเชิงกลับกันคือทำลายพันธะแทน



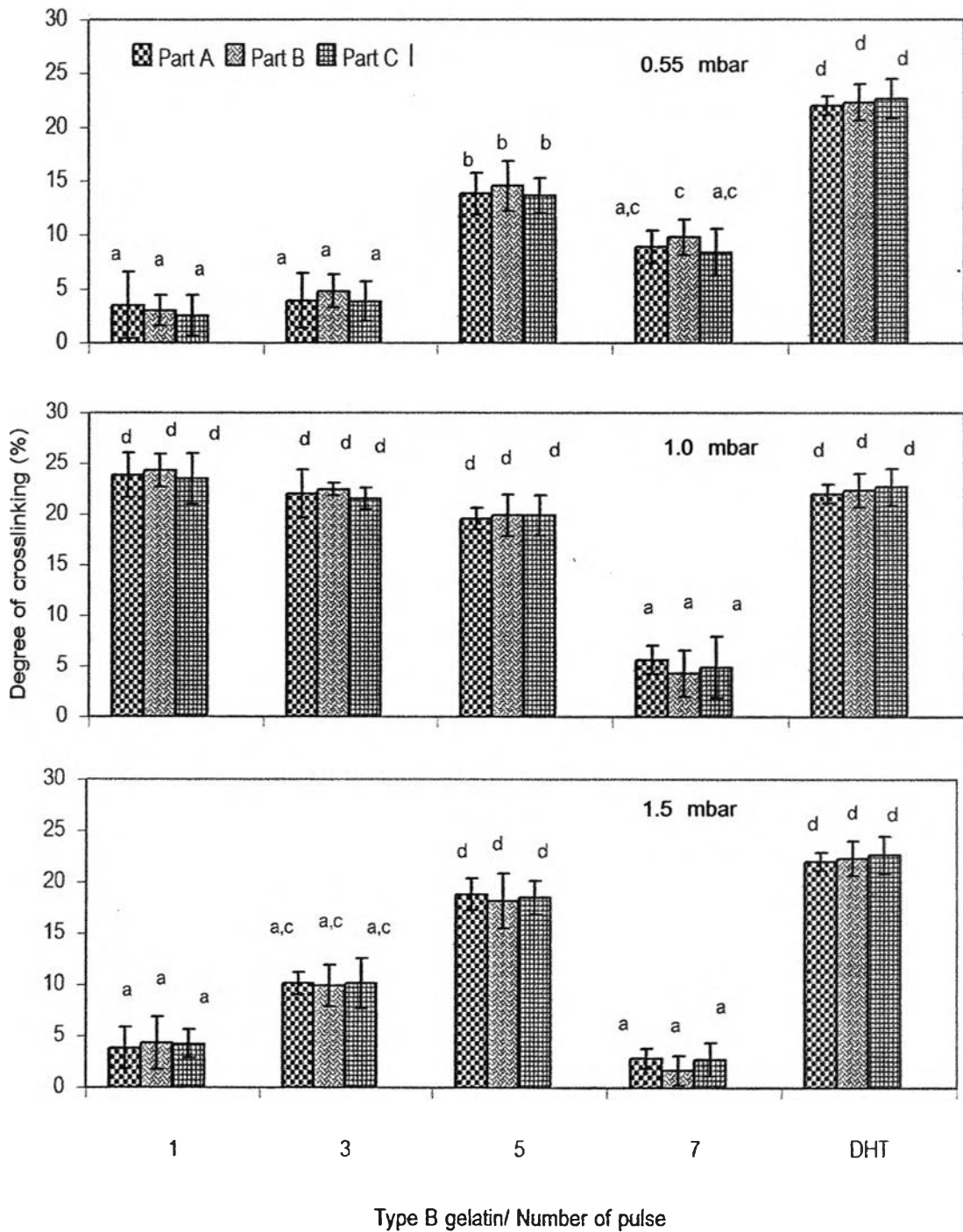
รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของระดับการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก๊ากซาร์ก่อนของคอลลาเจน 0.8% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนสุญญากาศ (DHT) โดยใช้ความดันก๊ากซาร์ก่อน 0.55, 1.0 และ 1.5 มิลลิบาร์ (n=4) โดยตัวอย่างความยาวประมาณ 6.5 ซม. (ขนาดประมาณ 0.204 ลบ. ซม.) ของแต่ละสภาวะจะถูกตัดเป็นท่อน A, B และ C ยาวท่อนละ 2 ซม. (ขนาด 0.063 ลบ. ซม.)

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการเชื่อมขวางที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$



รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของระดับการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก้ำชาอาร์กอนของเจลาตินชนิด A 0.8% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนสุญญากาศ (DHT) โดยใช้ความดันก้ำชาอาร์กอน 0.55, 1.0 และ 1.5 มิลลิบาร์ ( $n=4$ ) โดยตัวอย่างความยาวประมาณ 6.5 ซม. (ขนาดประมาณ 0.204 ลบ. ซม.) ของแต่ละสภาวะจะถูกตัดเป็นท่อน A, B และ C ยาวท่อนละ 2 ซม. (ขนาด 0.063 ลบ. ซม.)

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการเชื่อมขวางที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$



รูปที่ 4.9 ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของระดับการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก้ำซาร์กอนของเจลาตินชนิด B 0.8% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนสูญญากาศ (DHT) โดยใช้ความดันก้ำซาร์กอน 0.55, 1.0 และ 1.5 มิลลิบาร์ (n=4) โดยตัวอย่างความยาวประมาณ 6.5 ซม. (ขนาดประมาณ 0.204 ลบ. ซม.) ของแต่ละสภาวะจะถูกตัดเป็นท่อน A, B และ C ยาวท่อนละ 2 ซม. (ขนาด 0.063 ลบ. ซม.)

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการเชื่อมขวางที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$

การเชื่อมขวางของพันธะโปรตีนตัวเดิมด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงอุณหภูมิ (DHT) เกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัว (Condensation) ของหมู่เอมีน ( $-NH_2$ ) และหมู่คาร์บอกซิล ( $-COOH$ ) ของโปรตีนตัวเดิมเนื่องจากการดึงน้ำออกจากตัวอย่างในสภาวะอุณหภูมิสูง [Ueda, H. และคณะ, 2002] ในส่วนของการเชื่อมขวางโปรตีนด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนยังไม่พบงานวิจัยมาก่อนโดยวิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาแรก โดยคาดว่าเกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวของหมู่เอมีน ( $-NH_2$ ) และหมู่คาร์บอกซิล ( $-COOH$ ) เช่นกัน ผลการทดลองในรูป 4.7-4.9 แสดงการเชื่อมขวางโดยวิธีทางกายภาพทั้งวิธี DHT และรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนโดยให้ระดับการเชื่อมขวางที่ค่อนข้างต่ำเนื่องมาจากการเชื่อมขวางด้วยวิธีทางกายภาพเหล่านี้เกิดขึ้นระหว่างหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ใกล้ชิดกันแบบสุ่ม เฉพาะบริเวณที่มีหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ติดกันทำให้เกิดปฏิกิริยาจำกัด แต่การเชื่อมขวางด้วยสารเคมีจะใช้น้ำเป็นตัวพาสารเชื่อมขวาง (Crosslinking agent) เข้าไปภายในอนุภาคโปรตีนอย่างทั่วถึงจึงทำให้ระดับการเชื่อมขวางสูงกว่า

การเชื่อมขวางโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนต้องการสภาวะแตกต่างกันไปเพื่อให้ได้ระดับการเชื่อมขวางสูงสุดใกล้เคียงกับวิธี DHT แม้ว่าการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมามีลักษณะเป็นช่วงที่ไม่ต่อเนื่องและใช้เวลาในการเชื่อมขวางสั้นกว่าแต่สามารถให้ระดับการเชื่อมขวางในบางสภาวะใกล้เคียงวิธี DHT แสดงถึงการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์ใช้พลังงานที่สูงกว่าจึงสามารถเชื่อมขวางได้ใกล้เคียงกับวิธี DHT แม้ใช้เวลาสั้นกว่า

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวางของคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B บริษัท Nitta Gelatin Inc. ประเทศญี่ปุ่น วิเคราะห์โดยวิธี TNBS [Nagai, N., และคณะ, 2004]

	คอลลาเจนชนิดที่ I	เจลาตินชนิด A	เจลาตินชนิด B
ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเริ่มต้น (ไมล/กรัมของโปรตีน)	$1.701 \times 10^{-6} \pm 3.57 \times 10^{-6}$	$2.360 \times 10^{-6} \pm 4.50 \times 10^{-6}$	$2.107 \times 10^{-6} \pm 7.87 \times 10^{-6}$

เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนตัวเดิมทั้ง 3 ชนิด พบว่าโดยรวมคอลลาเจนจะมีระดับการเชื่อมขวางต่ำสุดอาจเนื่องมาจากมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่ำกว่าโปรตีนตัวเดิมชนิดอื่น (ตารางที่ 4.2) เพราะคอลลาเจนมีโครงสร้างเป็นแบบสายเกลียว 3 สายพันกันอยู่ (Triple helix) [Gelse K. และคณะ, 2003] และเจลาตินทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างเป็น Random coil เกิดจากการทำให้

โครงสร้าง Triple helix ของคอลลาเจนคลายเกลียวออกและเสียสภาพโดย Hydrolysis ด้วยกรดหรือเบส ดังนั้นเจลาตินจึงประกอบไปด้วยโปรตีนสายสั้นกว่าคอลลาเจน ดังนั้นจึงมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าคอลลาเจน และจากลักษณะโครงสร้าง Random coil ของเจลาตินที่น้ำสามารถเข้าสัมผัสได้ง่ายกว่าคอลลาเจนที่มีโครงสร้างเป็น Triple helix จึงทำให้สามารถตรวจพบปริมาณอะมิโนอิสระได้สูงกว่าด้วย นอกจากนี้การที่ระดับการเชื่อมขวางของคอลลาเจนต่ำกว่าเจลาตินทั้ง 2 ชนิดไม่ได้แสดงถึงว่าการสลายตัวของคอลลาเจนต้องเร็วกว่าเจลาตินเพราะโดยโครงสร้างที่เป็น Triple helix จึงมีความแข็งแรงกว่าและสลายตัวช้ากว่าเจลาติน แต่ระดับการเชื่อมโยงของคอลลาเจนโดยภาพรวมต่ำกว่ากว่าเจลาตินทั้ง 2 ชนิดเนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่ำกว่าเจลาตินจึงเชื่อมขวางได้น้อยกว่าเจลาติน ดังนั้นระดับการเชื่อมขวางจึงต่ำกว่าเจลาตินด้วย และนอกจากนี้การเชื่อมขวางด้วยโปรตีนต่างชนิดกันจะให้ระดับการเชื่อมขวางต่างกันอย่างมาจากการความสามารถในการดูซับรังสีเอ็กซ์หรือพลังงานจากความร้อนได้ต่างกันจึงมีผลต่อระดับการเชื่อมขวางที่ต่างกันด้วย

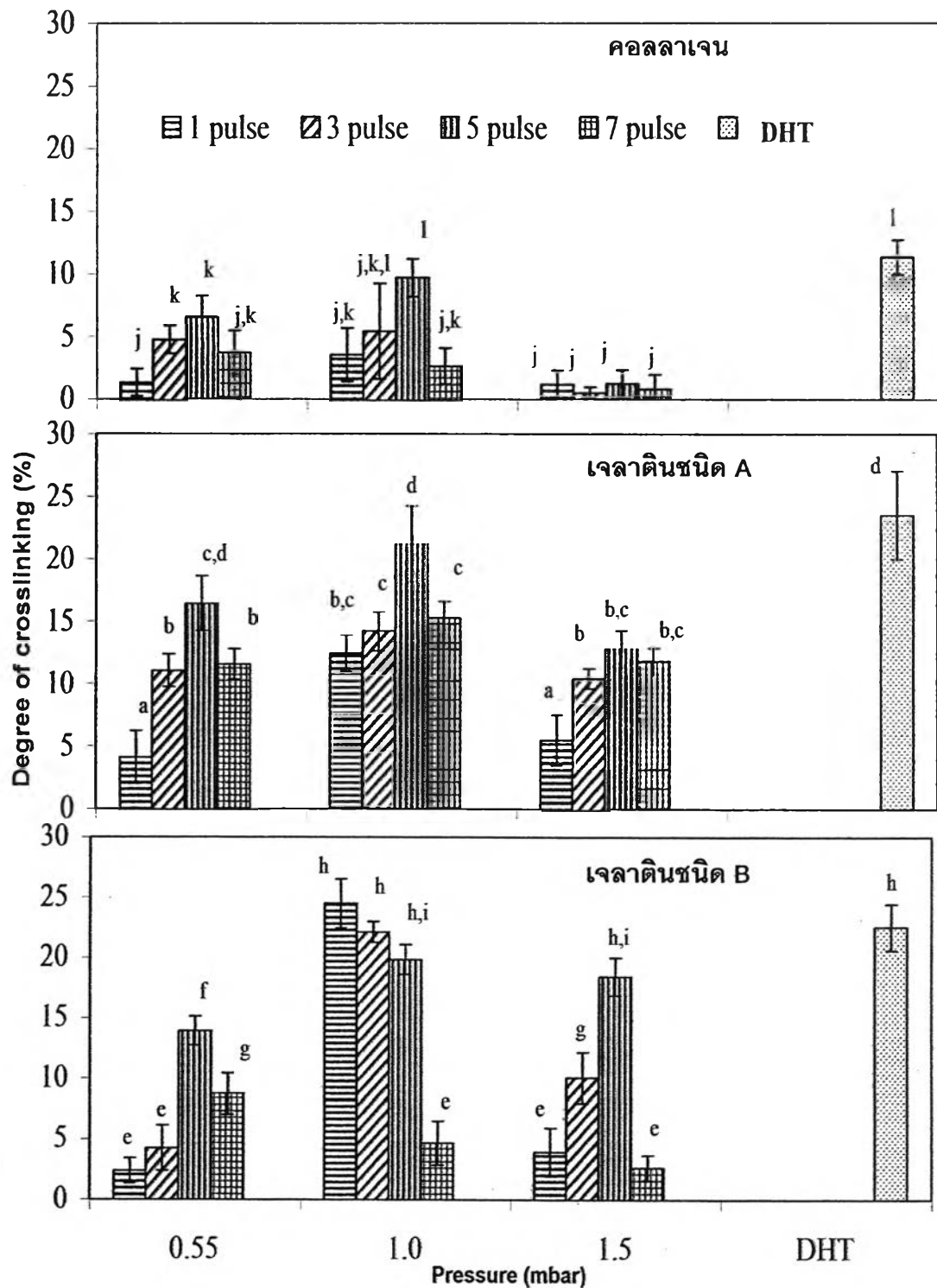
#### 4.2.2 การหาสภาวะเพื่อระดับการเชื่อมขวางสูงสุดของโปรตีนตัวเต็ม

จากการทดสอบความสม่ำเสมอของภายในตัวอย่างขึ้นเดียวกันที่ตัดเป็น 3 ท่อนพบว่าในแต่ละชิ้นมีความสม่ำเสมอของการเชื่อมขวางจากการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติก จึงทดสอบซ้ำว่าที่สภาวะต่างๆ (รูปที่ 4.10) คือ ที่ความดัน ความดันก๊าซอาร์กอน 0.55, 1.0 และ 1.5 มิลลิบาร์ จำนวนพัลส์ที่ 1, 3, 5 และ 7 พัลส์ เปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม (คือ ระดับการเชื่อมขวางที่สูง) ในที่นี้เป็นการศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับการเชื่อมขวางของโปรตีนโดยใช้รังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก๊าซอาร์กอน ในงานวิจัยอื่นๆ พบเพียงการใช้พลาสติกจากก๊าซเฉื่อยเช่น อาร์กอน และฮีเลียม เป็นต้น สำหรับเชื่อมขวางระหว่างพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ปรับพื้นผิวให้มีหมู่คาร์บอกซิลเชื่อมขวางกับหมู่เอมีนของ DNA [Kuzuya, M. และคณะ, 2005] โดยปฏิกิริยาการรวมตัว (Condensation reaction) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าในการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มด้วยรังสีเอ็กซ์ของพลาสติกจากอาร์กอนเกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวเช่นกัน จากการทดสอบเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม ในกรณีของคอลลาเจน พบว่ามีระดับการเชื่อมขวางต่ำกว่าเจลาตินทั้งสองชนิดและที่ความดันก๊าซอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ ที่ 3 และ 5 พัลส์ มีระดับการเชื่อมขวางไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เชื่อมขวางด้วยวิธี DHT (มีระดับการเชื่อมขวาง  $11.39 \pm 1.39$ ) อย่างมีนัยสำคัญแต่ที่ 5 พัลส์ (ซึ่งมีระดับการเชื่อมขวาง  $9.79 \pm 1.50$ ) จะมีค่าใกล้เคียงกว่าจึงเลือกที่สภาวะ 1.0 มิลลิบาร์ 5 พัลส์ เป็นสภาวะที่ใช้สำหรับเชื่อมขวางคอลลาเจนที่อยู่ภายในท่อ PLCL นอกจากนี้ยังพบว่าที่ 0.55 และ 1.0 มิลลิบาร์ ที่ 1 ถึง 3 พัลส์ จะมีระดับการ

เชื่อมขวางเพิ่มขึ้นตามพัลส์ แต่ที่ 7 พัลส์ปรากฏว่าระดับการเชื่อมขวางลดลง ส่วนที่ความดัน 1.5 มิลลิบาร์ ในทุกพัลส์ พบว่ามีระดับการเชื่อมขวางน้อยมากโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละพัลส์และระดับการเชื่อมขวางค่อนข้างต่ำกว่าที่สภาวะอื่น สาเหตุของระดับการเชื่อมโยงของพันธะที่ต่ำลงอาจเนื่องมาจากสภาวะนั้นเกินจุดที่เหมาะสมจึงอาจกลายเป็นการทำลายพันธะระหว่างสายโมเลกุล ระดับการเชื่อมขวางของเจลลาตินชนิด A ที่ความดัน 0.55 ,1.0 และ 1.5 มิลลิบาร์ ตั้งแต่ 1 ถึง 5 พัลส์จะมีระดับการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นโดยลำดับหลังจากนั้นการเชื่อมขวางจะลดลง แต่ที่ 1.5 มิลลิบาร์ระดับการเชื่อมขวางโดยรวมในทุกพัลส์น้อยกว่าที่ความดัน 1.0 มิลลิบาร์ สาเหตุของระดับการเชื่อมโยงของพันธะที่ต่ำลงอาจเนื่องมาจากสภาวะนั้นเกินจุดที่เหมาะสมจึงอาจกลายเป็นการทำลายพันธะระหว่างสายโมเลกุลและที่ 1.0 มิลลิบาร์ 5 พัลส์ เจลาตินชนิด A มีระดับการเชื่อมขวาง  $21.22 \pm 3.03$  ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกับวิธี DHT ( $23.54 \pm 1.50$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจึงเลือกที่สภาวะนี้สำหรับเชื่อมขวางของเจลลาตินชนิด A ในท่อ PLCL การเชื่อมขวางของเจลลาติน B พบว่าที่ 0.55 และ 1.5 มิลลิบาร์ มีแนวโน้มของระดับการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นตามจำนวนพัลส์ที่เพิ่มขึ้น และที่จำนวนพัลส์เท่ากันจะมีระดับการเชื่อมขวางต่ำกว่าที่ 1.0 มิลลิบาร์ แต่ที่ความดันอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ มีแนวโน้มของระดับการเชื่อมขวางแตกต่างจากที่ความดันอื่นโดยมีระดับการเชื่อมขวางต่ำลงเมื่อจำนวนพัลส์เพิ่มขึ้น และที่ความดันก๊าซอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ ที่ 1 ถึง 5 พัลส์ พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เชื่อมขวางด้วย DHT ( $21.22 \pm 3.03$ ) โดยที่ 1 พัลส์ จะมีระดับการเชื่อมขวาง  $24.51 \pm 2.03$  ซึ่งสูงที่สุดในกลุ่มของเจลลาตินชนิด B ที่ทำการเชื่อมขวางด้วยวิธีเดียวกันและใช้จำนวนพัลส์น้อยที่สุด เพราะฉะนั้นจึงเลือกสภาวะความดันอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ ที่ 1 พัลส์ สำหรับเชื่อมขวางของเจลลาตินชนิด B ในท่อ PLCL

โดยรวมพบว่าระดับการเชื่อมขวางของคอลลาเจนต่ำกว่าเจลลาตินทั้ง 2 ชนิดอาจเนื่องมาจากปริมาณกรดอะมิโนอิสระของคอลลาเจนน้อยกว่าเจลลาตินดังอธิบายในหัวข้อ 4.2.1 และระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มที่ได้จากการทดสอบนี้ยังสอดคล้องกับหัวข้อ 4.2.1 คือให้ลักษณะแนวโน้มของระดับการเชื่อมขวางแบบเดียวกัน นอกจากนี้การเชื่อมขวางด้วยโปรตีนต่างชนิดกันจะให้ระดับการเชื่อมขวางต่างกัน อาจมาจากความสามารถในการดูดซับรังสีเอ็กซ์หรือพลังงานจากความร้อนได้ต่างกันจึงมีผลต่อระดับการเชื่อมขวางที่ต่างกันด้วย





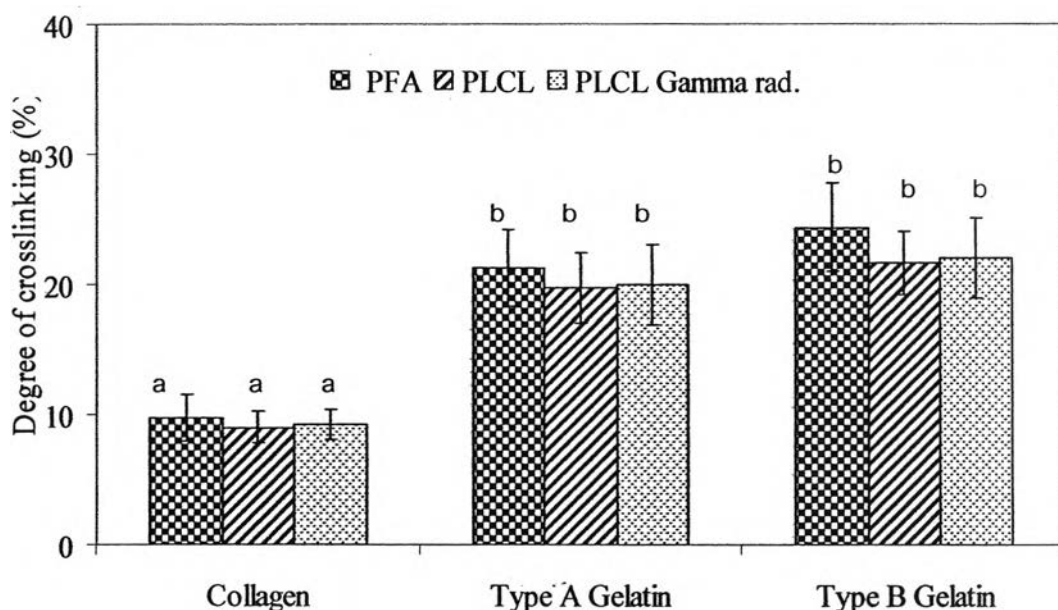
รูปที่ 4.10 ระดับการเชื่อมขวางของคอลลาลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ความเข้มข้น 0.8% โดยน้ำหนัก (ขนาดประมาณ 0.204 ลบ. ซม.) ที่เชื่อมขวางโดยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก๊าซอาร์กอน ด้วยความดันก๊าซอาร์กอน 0.55, 1.0 และ 1.5 มิลลิบาร์ จำนวนพัลส์ที่ 1, 3, 5 และ 7 พัลส์ เปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางด้วยวิธี DHT (n=4)

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-j แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการเชื่อมขวางที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$

ดังนั้นสรุปได้ว่าการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนโดยส่วนใหญ่ ต้องอาศัยสภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกันไปของโปรตีนแต่ละชนิดและยังสามารถได้ระดับการเชื่อมขวางใกล้เคียงกับวิธี DHT แม้ว่า การเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมามีลักษณะเป็นช่วงที่ไม่ต่อเนื่องและใช้เวลาในการเชื่อมขวางสั้นกว่าแต่สามารถให้ระดับการเชื่อมขวางในบางสภาวะใกล้เคียงวิธี DHT แสดงถึงการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์ใช้พลังงานที่สูงกว่าและมีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางจึงสามารถเชื่อมขวางได้ใกล้เคียงกับวิธี DHT แม้ใช้เวลาสั้นกว่า

#### 4.2.3 ระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มในท่อนำเส้นประสาท PLCL

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมของการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของอาร์กอนของโปรตีนตัวเต็มที่ได้จากท่อนำเส้นประสาทจำลอง PFA แล้วจึงผลิตท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มโดยผ่านเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนตามสภาวะเหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2.2 และเปรียบเทียบว่าโปรตีนตัวเต็มที่ทำกรเชื่อมขวางด้วยวิธีดังกล่าวที่ได้จากท่อ PFA , ในท่อ PLCL และในท่อ PLCL ที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา (ที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ ด้วยเครื่อง Gammacell 220 Excel ที่ความแรงรังสี 13779 คูลี 0.16 kGy/นาที่ อุณหภูมิประมาณ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 138 นาที) ว่ามีระดับการเชื่อมขวางเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่เมื่ออยู่ในท่อ PLCL จริง ในตอนแรกการฆ่าเชื้อได้ใช้วิธีการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์แต่พบว่าโปรตีนตัวเต็มเจลาตินทั้ง 2 ชนิดโดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.8% โดยน้ำหนัก มีการหดตัวพบเพียงท่อ PLCL เปล่าซึ่งคาดว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อสูงเกินไปจึงทำให้โปรตีนเสียรูป จึงเปลี่ยนเป็นฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาแทน และจากการทดสอบ (ดูรูปที่ 4.11) พบว่าระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มในท่อ PLCL มีแนวโน้มลดลงในโปรตีนตัวเต็มทุกชนิดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ได้จากท่อ PFA และเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาพบว่าเพิ่มขึ้นจากที่อยู่ในท่อ PLCL ที่ไม่ฆ่าเชื้อ แต่น้อยกว่าที่ได้จากท่อ PFA อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นจึงถือได้ว่าท่อ PLCL และการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาไม่ได้มีผลกระทบต่อกระบวนการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็ม



รูปที่ 4.11 ระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มผ่านการเชื่อมขวางรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก๊าซอาร์กอนจากท่อนำเส้นประสาทจำลอง (Perfluoroalkoxy polymer (PFA), โปรตีนตัวเต็มในท่อนำเส้นประสาท PLCL และโปรตีนตัวเต็มในท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา โดยคอลลาเจน และเจลาตินชนิด A ใช้ความดันอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ 5 พัลส์ ส่วนเจลาตินชนิด B ใช้ความดันอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ ที่ 1 พัลส์

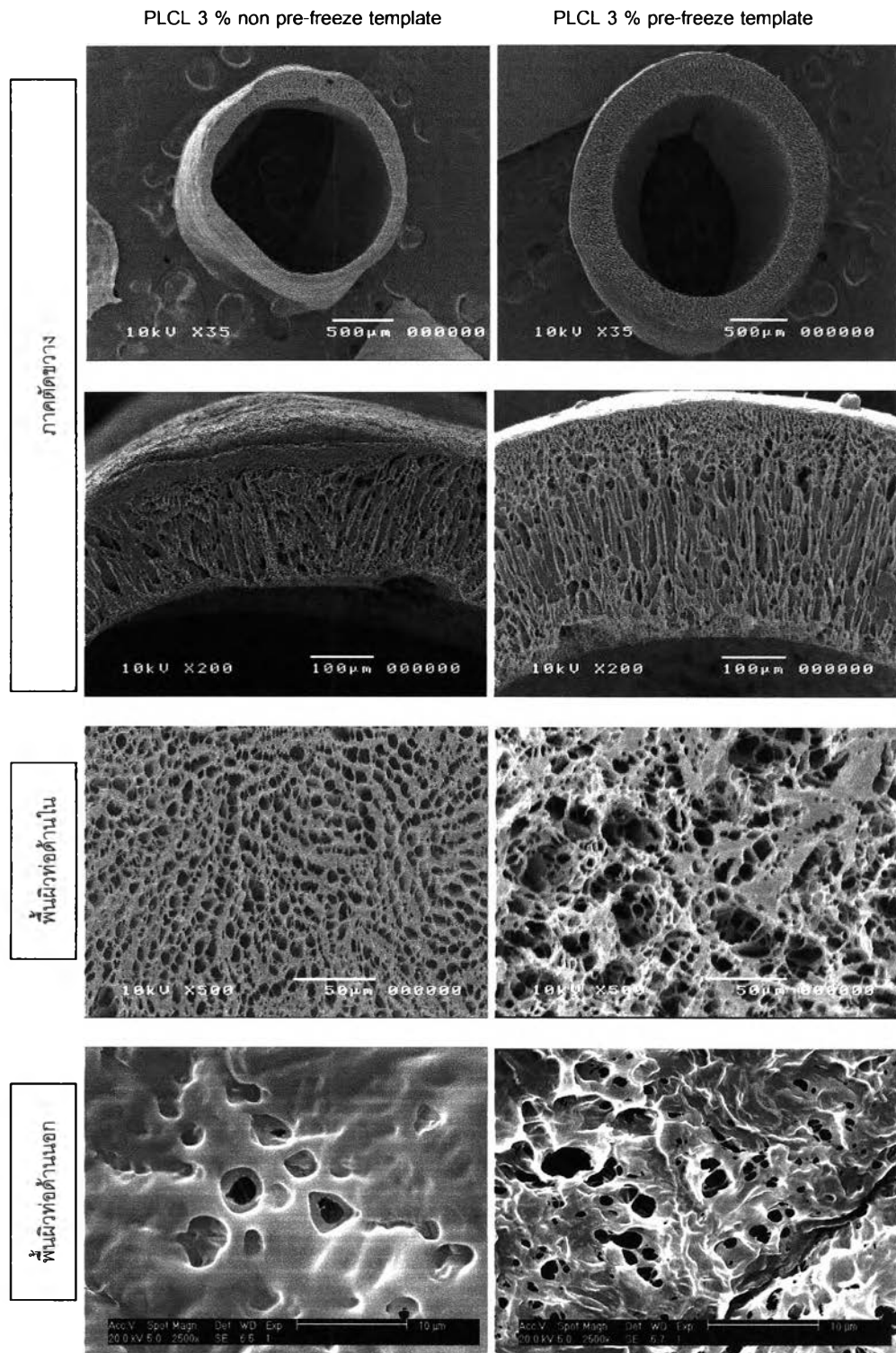
หมายเหตุ: ตัวอักษร a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการเชื่อมขวางที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$

PFA หมายถึง โปรตีนตัวเต็มที่ได้จากท่อ PFA, PLCL หมายถึง โปรตีนตัวเต็มที่ได้จากท่อนำเส้นประสาท PLCL และ PLCL Gamma rad. หมายถึง โปรตีนตัวเต็มที่ได้จากท่อนำเส้นประสาท PLCL ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา

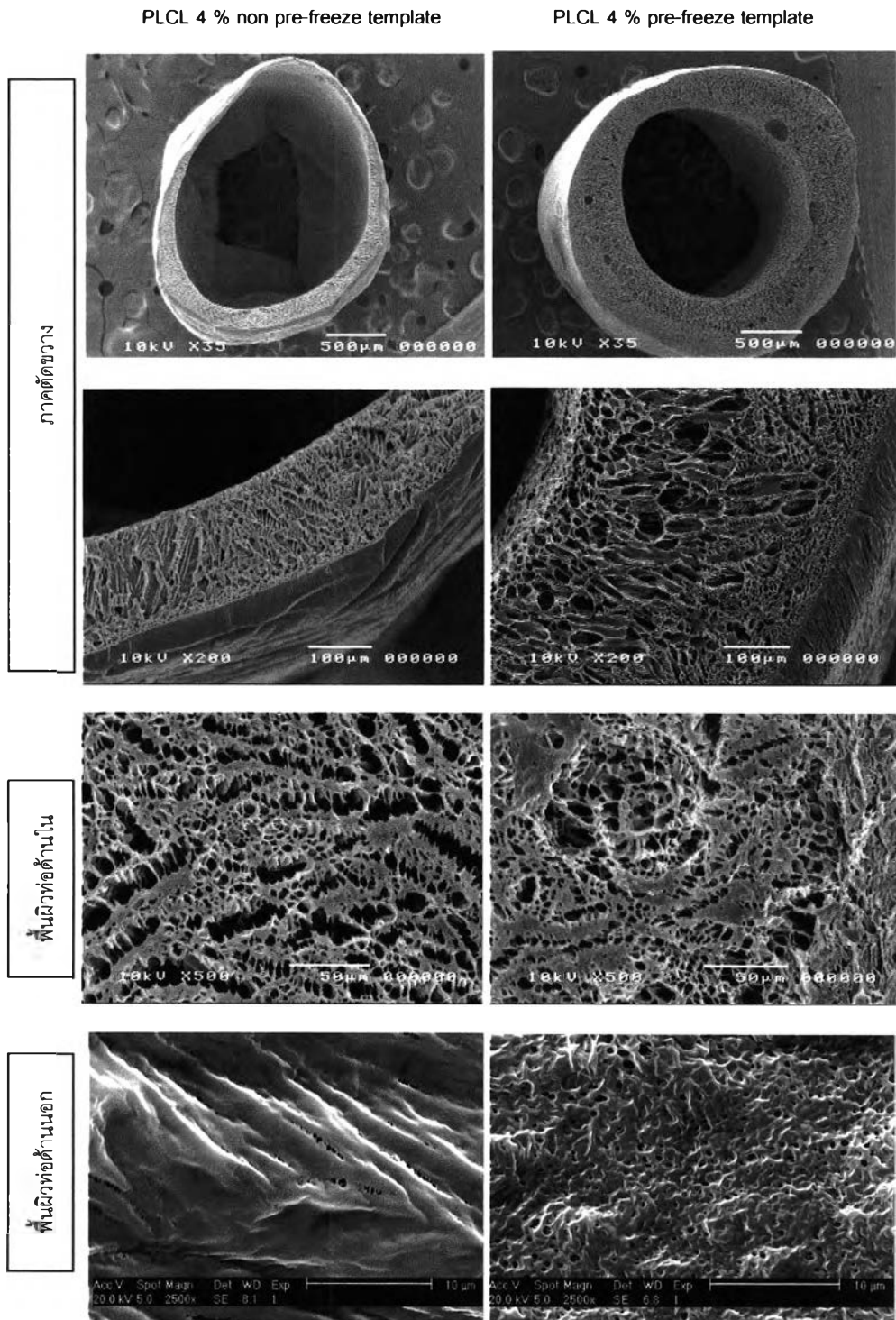
#### 4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาท PLCL

ท่อนำเส้นประสาท PLCL ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.6 มม. จากสารละลาย PLCL ในสารละลาย 1,4-dioxane เข้มข้น 3 และ 4 % โดยน้ำหนัก (จากรูปที่ 4.12 และ 4.13) โดยมีวิธีขึ้นรูป 2 แบบคือ วิธีไม่จุ่มท่อ PFA (template) ลงในโตรเจนเหลวก่อนจุ่มลงในสารละลาย PLCL (non pre-freeze template) จะให้ผนังท่อค่อนข้างบาง (จาก PLCL 3% และ 4% หนา  $0.13 \pm 0.04$  มม. และ  $0.12 \pm 0.06$  มม. ตามลำดับ) และไม่ค่อยสม่ำเสมออีกทั้งสารละลาย PLCL จะติดท่อ PFA ไม่ทั่วและไม่สม่ำเสมอ ในขณะที่วิธีจุ่มท่อ PFA (template) ลงในโตรเจนเหลวก่อนจุ่มลงในสารละลาย PLCL (pre-freeze template) ท่อนำเส้นประสาทที่เตรียมจาก PLCL ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก ผนังค่อนข้างหนา ( $0.60 \pm 0.06$  มม.) ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคในการเย็บเชื่อมต่อเส้นประสาท และความหนาไม่สม่ำเสมอเพราะสารละลายมีความหนืดสูงจึงควบคุมความหนาของปลายแต่ละด้านให้เสมอกันลำบาก แต่ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL ความเข้มข้น 3%

ผนังค่อนข้างสม่ำเสมอโดยมีความหนา  $0.31 \pm 0.03$  มม. ซึ่งไม่หนามากหรือน้อยเกินไป จากข้อมูลของท่อนำเส้นประสาทที่จำหน่ายในท้องตลาดไม่ระบุข้อมูลความหนา แต่จากงานวิจัยในสัตว์ทดลองศึกษาในเส้นประสาท sciatic ที่ขาด พบว่ามีความหนาหลากหลายตั้งแต่ 0.1- 0.8 มม. [Bunting, S., และคณะ, 2005; Chang, C., และคณะ, 2006; Evans, G., และคณะ, 1999; Keihoff, G., และคณะ, 2003; Nie, Y., และคณะ, 2007; Stang, F., และคณะ, 2005] เพราะฉะนั้นท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตขึ้นในการศึกษานี้อยู่ในขนาดที่ใช้กันโดยทั่วไปในงานศึกษาวิจัยจึงเหมาะสำหรับการนำมาใช้ศึกษาในสัตว์ทดลอง



รูปที่ 4.12 รูปถ่าย SEM ของท่อ PLCL ( $M_w = 300,000$ ) 3 % โดยน้ำหนัก โดยการเปรียบเทียบวิธีการเตรียม Template ต่างกันคือ ไม่จุ่มท่อ PFA (Template) ลงในไตรเจนเหลวก่อนจุ่มลงในสารละลาย PLCL (non pre-freeze template) และจุ่มท่อ PFA ลงในไตรเจนเหลวก่อนจุ่มลงในสารละลาย PLCL (pre-freeze template)



รูปที่ 4.13 รูปถ่าย SEM ของท่อ PLCL ( $M_w = 300,000$ ) 4 % โดยน้ำหนัก โดยการเปรียบเทียบวิธีการเตรียม Template ต่างกันคือ ไม่จุ่มท่อ PFA (Template) ลงในโตรเจนเหลวก่อนจุ่มลงในสารละลาย PLCL (non pre-freeze template) และจุ่มท่อ PFA ลงในโตรเจนเหลวก่อนจุ่มลงในสารละลาย PLCL (pre-freeze template)

ตารางที่ 4.3 ขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านใน (n=200) และพื้นผิวด้านนอก (n=50) ของท่อ PLCL (น้ำหนักโมเลกุล 300,000) ที่เตรียมขึ้นด้วยความเข้มข้น 3 และ 4 % โดยน้ำหนักและวิธีการเตรียม Template ต่างกัน

ตัวอย่าง		ขนาดรูพรุนเฉลี่ย $\pm$ SD ( $\mu\text{m}$ )	
ความเข้มข้น (% wt)	การเตรียม Template	พื้นผิวด้านใน	พื้นผิวด้านนอก
3%	non pre-freeze	9.21 $\pm$ 3.52 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup>
	pre-freeze	9.70 $\pm$ 3.44 <sup>ab</sup>	1.24 $\pm$ 0.77 <sup>d</sup>
4%	non pre-freeze	9.62 $\pm$ 3.31 <sup>ab</sup>	0.30 $\pm$ 0.11 <sup>e</sup>
	pre-freeze	10.20 $\pm$ 3.51 <sup>b</sup>	0.47 $\pm$ 0.20 <sup>f</sup>

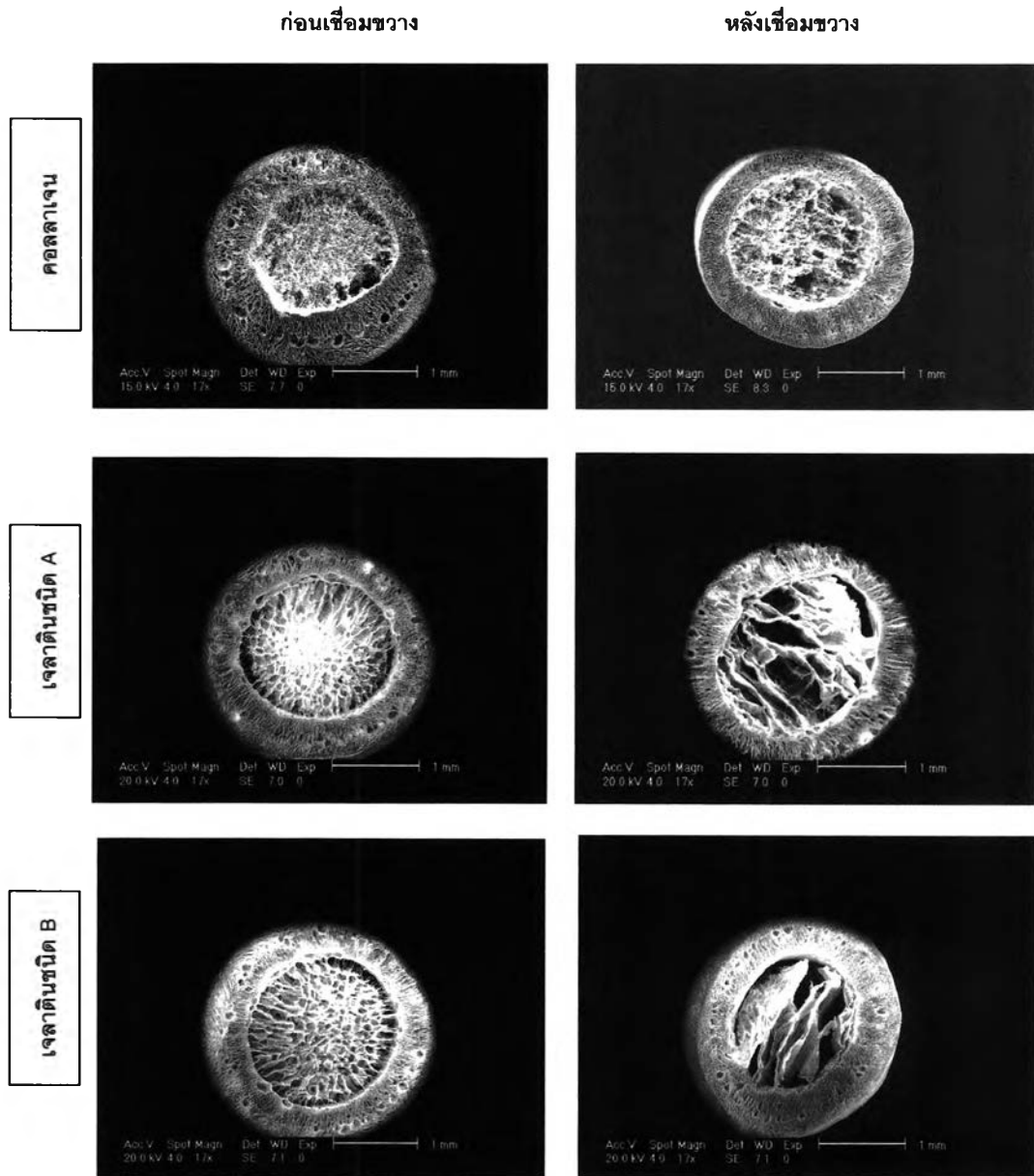
หมายเหตุ : ตัวอักษร a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านใน ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$

ตัวอักษร c-f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านนอก ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$

ในส่วนของขนาดรูพรุนของผนังท่อนั้น (ตาราง 4.3) ในทุกตัวอย่างมีพื้นผิวด้านนอกมีรูพรุนขนาดเล็กมากและมีจำนวนรูพรุนค่อนข้างน้อย ส่วนพื้นผิวด้านในจะมีรูพรุนขนาดใหญ่กว่าพื้นผิวด้านนอกและมีรูพรุนจำนวนมาก ท่อ PLCL ที่เตรียมทั้งจากวิธี non pre-freeze template และ pre-freeze template จากสารละลาย PLCL 3 และ 4 % มีขนาดรูพรุนของพื้นผิวด้านในใกล้เคียงกัน โดยวิธี non pre-freeze template ของ PLCL ความเข้มข้น 3 และ 4% มีขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านใน 9.21 $\pm$ 3.52 และ 9.62 $\pm$ 3.31 ตามลำดับ และวิธี pre-freeze template ของ PLCL ความเข้มข้น 3 และ 4% มีขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านใน 9.70 $\pm$ 3.44 และ 10.20 $\pm$ 3.51 ตามลำดับ ส่วนพื้นผิวด้านนอกท่อ PLCL ที่เตรียมจากสารละลาย PLCL 3 % มีขนาดรูพรุน (ที่เตรียมจากวิธี non pre-freeze template และวิธี pre-freeze template มีขนาด 0.95 $\pm$ 0.54 และ 1.24 $\pm$ 0.77 ตามลำดับ) ใหญ่กว่าท่อ PLCL ที่เตรียมจากสารละลาย PLCL 4 % (ที่เตรียมจากวิธี non pre-freeze template และวิธี pre-freeze template มีขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านนอก 0.30 $\pm$ 0.11 และ 0.47 $\pm$ 0.20 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งท่อที่เตรียมโดยวิธี pre-freeze template จะมีขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านในใหญ่กว่าที่เตรียมโดยวิธี non pre-freeze template อย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นถ้าพิจารณาจากการเตรียม, ลักษณะรูปร่างและขนาดรูพรุน ซึ่งขนาดรูพรุนด้านนอกไม่ควรใหญ่เกินไปเพราะเนื้อเยื่อพังผืดอาจแทรกเจริญเข้ามาได้ ในขณะเดียวกันขนาดควรใหญ่พอที่จะให้หลอดเลือดเจริญ (หลอดเลือดฝอยขนาด 8 ไมโครเมตร) เข้ามาภายในเพื่อแลกเปลี่ยน

ก๊าซออกซิเจนได้) จึงเลือกใช้ท่อ PLCL ที่เตรียมจากสารละลาย PLCL 3% โดยน้ำหนัก และใช้วิธี pre-freeze template ในการขึ้นรูปสำหรับใช้ในการศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่อไป แม้ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL ความเข้มข้น 3 % โดยน้ำหนัก มีขนาดเล็กกว่า 8 ไมโครเมตร แต่มีรูพรุนบางส่วนที่ใหญ่กว่า



รูปที่ 4.14 ภาพถ่าย SEM กำลังขยาย 15 เท่า ของท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนัก ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็ม (0.8% โดยน้ำหนัก) ก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอกซ์จากพลาสติกของอาร์กอนที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา



เมื่อขึ้นรูปท่อ PLCL ด้วยสารละลาย PLCL 3% โดยน้ำหนัก และบรรจุโปรตีนตัวเต็มลงไป แล้วทำการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอกซ์จากพลาสมาของอาร์กอน (รูปที่ 4.14) แล้ววัดขนาดรูพรุน (ตารางที่ 4.4) ของท่อนำเส้นประสาท PLCL โดยพบว่าขนาดรูพรุนของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุโปรตีนต่างชนิดกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และรูพรุนเฉลี่ยของพื้นผิวด้านในจะมีขนาดใหญ่กว่าด้านนอก ดังนั้นชนิดของโปรตีนตัวเต็มและการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มไม่ได้มีผลเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนพื้นผิวด้านในและนอกของท่อนำเส้นประสาท PLCL และพื้นผิวด้านนอกแม้จำนวนน้อยและรูพรุนส่วนใหญ่ขนาดเล็กแต่มีรูพรุนบางรูที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้น คาดว่าหลอดเลือดจะแทรกเข้าภายในท่อ PLCL ตามรูพรุนบางรูที่มีขนาดใหญ่กว่าหลอดเลือดฝอย (ขนาด 8 ไมโครเมตร) เพราะฉะนั้นคาดว่าหลอดเลือดสามารถเจริญเข้าภายในท่อนำเส้นประสาท เพื่อส่งสารอาหารไปเลี้ยงเส้นประสาทได้ แม้โดยความจริงแล้วหลอดเลือดที่เจริญมาจากส่วนต้นที่ขาดของเส้นประสาทสามารถเจริญมายังส่วนของท่อนำเส้นประสาทและส่งสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นประสาทที่งอกใหม่อยู่แล้วก็ตาม นอกจากนี้การที่ขนาดรูพรุนเฉลี่ยของพื้นผิวด้านนอกท่อ PLCL มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กมากจึงคาดว่าอาจมีส่วนช่วยป้องกันการแทรกของพังผืดเข้าภายในท่อไม่ให้รบกวนการงอกใหม่ของเส้นประสาทได้

ตารางที่ 4.4 ขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านในและนอกของท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนัก ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มและทำการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอกซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน

		ขนาดรูพรุนของท่อ PLCL ( $\mu\text{m}$ )		
		บรรจุคอลลาเจน	บรรจุเจลาตินชนิด A	บรรจุเจลาตินชนิด B
ก่อนเชื่อมขวาง	พื้นผิวด้านใน	10.93 $\pm$ 3.90	10. $\pm$ 3.78	9.04 $\pm$ 6.15
	พื้นผิวด้านนอก	1.29 $\pm$ .66	1.39 $\pm$ 0.77	1.41 $\pm$ 0.77
หลังเชื่อมขวาง	พื้นผิวด้านใน	11.39 $\pm$ 3.34	11.18 $\pm$ 3.27	11.85 $\pm$ 3.83
	พื้นผิวด้านนอก	1.11 $\pm$ 0.52	1.13 $\pm$ 0.66	1.21 $\pm$ 0.50

เมื่อกล่าวถึงท่อนำเส้นประสาทที่มีจำหน่ายในท้องตลาดพบว่าหลายชนิดกล่าวอ้างถึงข้อดีของท่อนำเส้นประสาทที่มีความพรุนเช่น NeuraWrap™ Nerve protector [Integra Lifesciences Corp. USA , แผ่นพับ] ผลิตจากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สกัดได้จากเอ็นของวัว กล่าวว่าผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีชั้นด้านนอกที่มีรูพรุนและชั้นในเป็นเยื่อเลือกผ่านให้น้ำและสารที่จำเป็นสามารถผ่านเข้าออกได้, NeuraGen™ nerve guide [Integra Lifesciences Corp. USA] ผลิตจากคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สกัดได้จากเอ็นของวัว กล่าวว่ามีความพรุนและตัวท่อนำเส้นประสาทสามารถคืนตัวอยู่ในสภาพเดิมโดยไม่เสียรูปซึ่งจำทำให้เส้นประสาทสามารถเจริญผ่านภายในท่อได้ และ GEM Neurotube® [Synnovis Micro Companies Alliance. USA, แผ่นพับ] ผลิตจาก Polyglycolic acid ที่กล่าวว่ามีความพรุนซึ่งเป็นทางแลกเปลี่ยนก๊าซสำหรับการงอกใหม่ของเส้นประสาท ในที่นี้อาจหมายถึงหลอดเลือดสามารถเจริญเข้าภายในสำหรับแลกเปลี่ยนก๊าซและสารอาหารแก่เส้นประสาทที่งอกใหม่ได้และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เหล่านี้กับท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มพบว่าท่อ PLCL มีความพรุนตลอดทั่วทั้งท่อซึ่งสามารถให้หลอดเลือดเจริญเข้าภายในสำหรับส่งผ่านสารอาหารและก๊าซที่จำเป็นต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท

#### 4.3.1 ขนาดรูพรุนของโปรตีนตัวเต็มก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอกซ์จากพลาสติกของก๊าซอาร์กอน

โปรตีนตัวเต็มแต่ละชนิดผ่านการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอกซ์จากพลาสติกของอาร์กอนแล้วทำการวัดขนาดรูพรุน (ตารางที่ 4.5) พบว่าโปรตีนตัวเต็มทุกชนิดหลังจากเชื่อมขวางมีขนาดรูพรุนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนเชื่อมขวาง อาจเนื่องมาจากการเชื่อมขวางทำให้มีการเชื่อมกันของพันธะระหว่างโมเลกุลโปรตีนสูงขึ้น ส่งผลให้ขนาดของรูพรุนใหญ่ขึ้นจากการหดตัวเข้าหากันของโปรตีนที่เชื่อมขวางกันขนาดของรูพรุนจึงเพิ่มขึ้น ขนาดรูพรุนของโปรตีนตัวเต็มที่เตรียมจากท่อนำเส้นประสาทจำลอง Perfluoroalkoxypolymer (PFA) และจากท่อนำเส้นประสาท PLCL พบว่ามีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งของคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A แต่ขนาดรูพรุนของเจลาตินชนิด B ที่เตรียมจากท่อนำเส้นประสาทจำลอง Perfluoroalkoxypolymer (PFA) และจากท่อนำเส้นประสาท PLCL ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ขนาดรูพรุนของเจลาตินทั้งสองชนิดยังมีรูพรุนขนาดใหญ่กว่าคอลลาเจนทั้งก่อนและหลังเชื่อมขวางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของคอลลาเจนเป็น Triple helix ซึ่งมีความแข็งแรงจึงสามารถยึดเหนี่ยวกันได้ดีและเมื่อเชื่อมขวางด้วยรังสีเอกซ์จากพลาสติกซึ่งใช้พลังงานสูงแต่ก็ไม่ได้มีผลในการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกเท่ากับเจลาตินทั้งสองชนิดที่มีโครงสร้างเป็น Random coil ซึ่งอาจเป็นสายเดี่ยวบ้างสายคู่บ้างและสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะได้ง่ายกว่าเมื่อเชื่อมขวางด้วยรังสี

เอ็กซ์จากพลาสติกซึ่งใช้พลังงานสูง แต่โดยรวมขนาดของรูพรุนของโปรตีนตัวเต็มชนิดหนึ่งๆ ไม่ว่าจะอยู่ในท่อนำเส้นประสาทจำลอง PFA หรือ ท่อนำเส้นประสาท PLCL จะมีขนาดรูพรุนแนวโน้มเช่นเดียวกันคือ เมื่อเชื่อมขวางแล้วมีขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้น

ตารางที่ 4.5 ขนาดรูพรุน ( $n=200$ ) ของโปรตีนตัวเต็ม 0.8% โดยน้ำหนัก จากท่อนำเส้นประสาทจำลอง Perfluoroalkoxy polymer (PFA) และจากท่อ PLCL 3% โดยน้ำหนัก ทั้งก่อนและหลังเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์ที่สภาวะต่างๆ คือ คอลลาลเจนและเจลาติน A ที่ความดันอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ 5 พัลส์ และเจลาตินชนิด B ที่ความดันอาร์กอน 1.0 มิลลิบาร์ 1 พัลส์

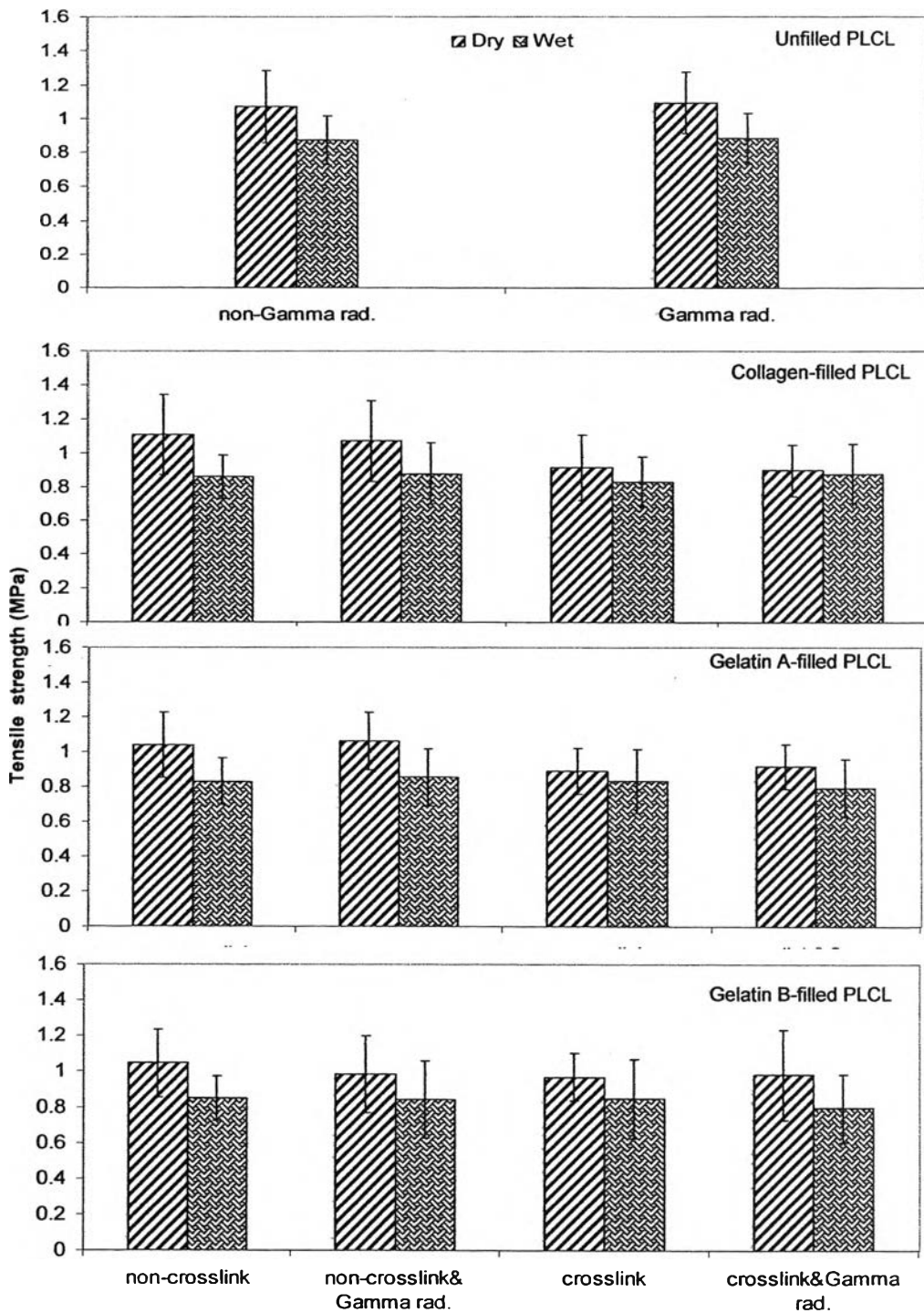
ขนาดรูพรุนโปรตีนตัวเต็ม		คอลลาลเจน	เจลาตินชนิด A	เจลาตินชนิด B
จาก PFA	ก่อนเชื่อมขวาง	19.78±11.08 <sup>a</sup>	88.88±31.30 <sup>c</sup>	66.56±22.39 <sup>e</sup>
	หลังเชื่อมขวาง	25.14±9.21 <sup>b</sup>	107.56±23.40 <sup>d</sup>	100.20±24.59 <sup>f,j</sup>
จากท่อ PLCL	ก่อนเชื่อมขวาง	15.19±3.68 <sup>g</sup>	82.15±29.42 <sup>i</sup>	70.82±22.06 <sup>e</sup>
	หลังเชื่อมขวาง	43.43±18.48 <sup>h</sup>	102.73±21.78 <sup>f</sup>	95.54±24.08 <sup>j</sup>

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-j แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของขนาดรูพรุนโปรตีนตัวเต็มแต่ละชนิดจากท่อนำเส้นประสาทจำลอง PFA และท่อนำเส้นประสาท PLCL ทั้งก่อนและหลังการเชื่อมขวาง ที่ระดับนัยสำคัญ  $p<0.05$

#### 4.3.2 สมบัติเชิงกลของท่อ PLCL

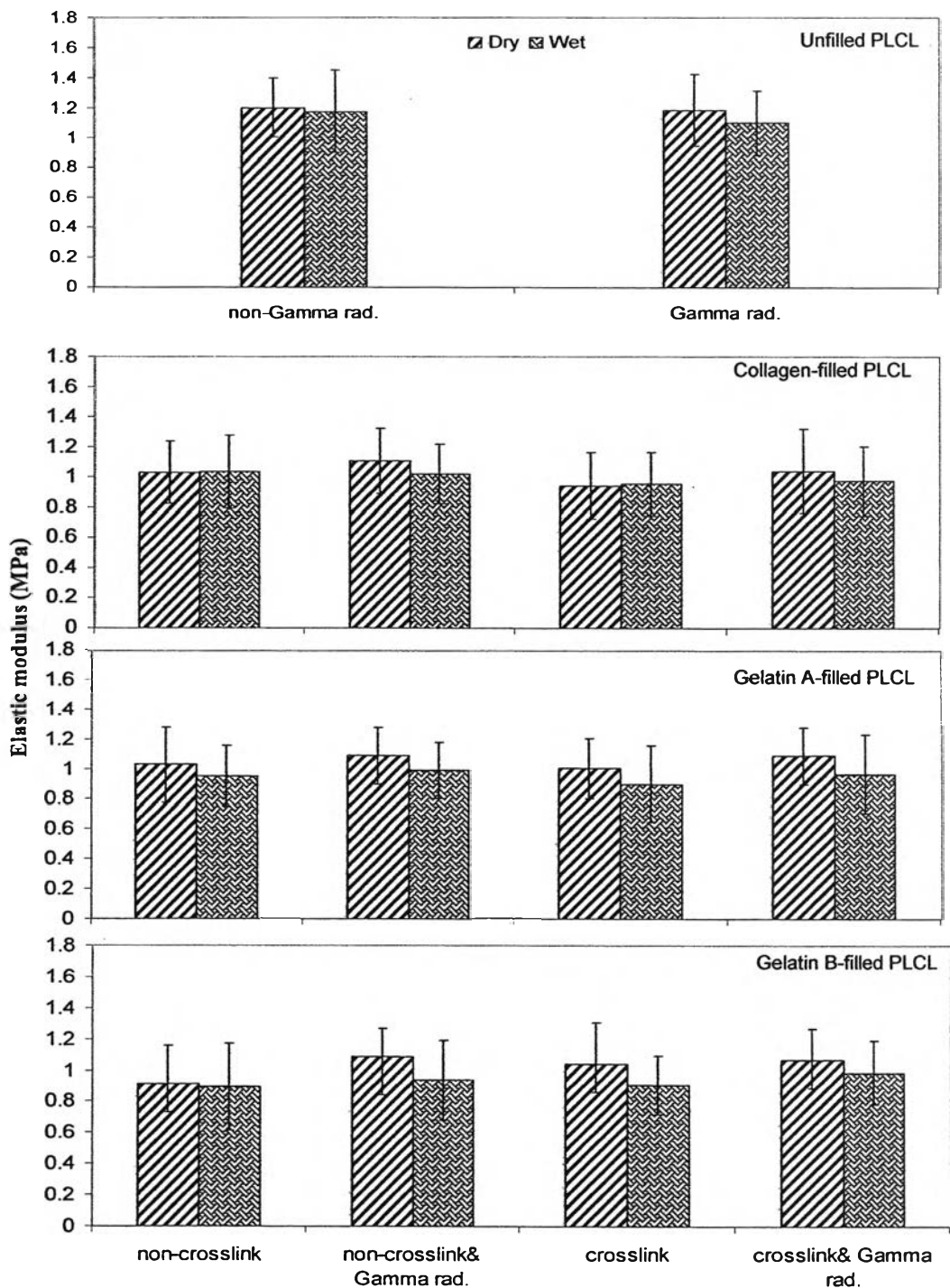
การหาสมบัติเชิงกลของเส้นประสาทโดยการทดสอบด้วยการดึงและแปรผลออกมาเป็นค่าความทนแรงดึง (Tensile strength), โมดูลัสของความยืดหยุ่น (Elastic modulus) และเปอร์เซ็นต์ความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด (% Elongation at break) พบว่าค่า Tensile strength (รูปที่ 4.15) ของท่อนำเส้นประสาทแบบต่างๆ (ท่อ PLCL กลวง, ท่อ PLCLบรรจุคอลลาลเจน, ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด A และ ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด B) อยู่ในช่วง 0.80-1.11 MPa และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมถึงการทดสอบแบบแห้งและแบบเปียกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แนวโน้มโดยทั่วไปพบว่ากลุ่มที่ทดสอบแบบเปียกจะมีค่า Tensile strength ต่ำกว่ากลุ่มที่ทดสอบแบบแห้ง ส่วนค่า Elastic modulus (จากรูปที่ 4.16) พบว่าซึ่งอยู่ในช่วง 0.90-1.20 MPa และให้ผลในทำนองเดียวกับ ค่าความทนแรงดึง คือ ท่อนำเส้นประสาทแบบต่างๆไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า Elastic modulus และการทดสอบแบบแห้งและแบบเปียกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแม้ว่ากลุ่มที่ทดสอบแบบเปียกจะมี

ค่า Elastic modulus ต่ำกว่ากลุ่มที่ทดสอบแบบแห้ง ผลของค่า Elastic modulus แสดงให้เห็นว่าโปรตีนตัวเต็มไม่มีผลต่อสมบัติทางกลของท่อนำเส้นประสาท เนื่องจากมีค่าโมดูลัสต่ำมากเมื่อเทียบกับค่าโมดูลัสของ PLCL ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ Elongation at break ของท่อนำเส้นประสาท PLCL อยู่ในช่วง 101.83-126.33 % (จากรูปที่ 4.17) โดยพบว่าท่อนำเส้นประสาทมีการยืดจากเริ่มต้นมากกว่าสองเท่าและแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ รวมทั้งการทดสอบแบบแห้งและแบบเปียกไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Borschel, G., และคณะ ในปี 2003 ซึ่งทำการทดสอบความทนแรงดึงในเส้นประสาท sciatic ของหนู F344 (F344 rat) ซึ่งมีค่า Elastic modulus ประมาณ 0.576 MPa ค่า Tensile strength ประมาณ 1.4 MPa พบว่าค่า Elastic modulus ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้มีค่ามากกว่าส่วนค่า Tensile strength ของท่อนำเส้นประสาท PLCL มีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL มีความทนต่อแรงดึงที่ดีแสดงถึงความแข็งแรงและทนทานต่อแรงดึงซึ่งเหมาะสำหรับใช้เป็นท่อนำเส้นประสาท รวมถึงยังสามารถยึดได้มากกว่าสองเท่าจึงน่าจะไม่ขาดและน่าจะคงรูปรวมทั้งไม่แฟบเมื่อเชื่อมต่อกับเส้นประสาทภายในร่างกาย เนื่องจากเมื่อทำการเชื่อมต่อกับเส้นประสาทที่ขาดกับท่อนำเส้นประสาทอาจมีการดึงรั้งและกดทับจากอวัยวะข้างเคียงทำให้วัสดุเสียรูป ดังนั้นวัสดุที่ใช้ขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทควรมีความทนทาน



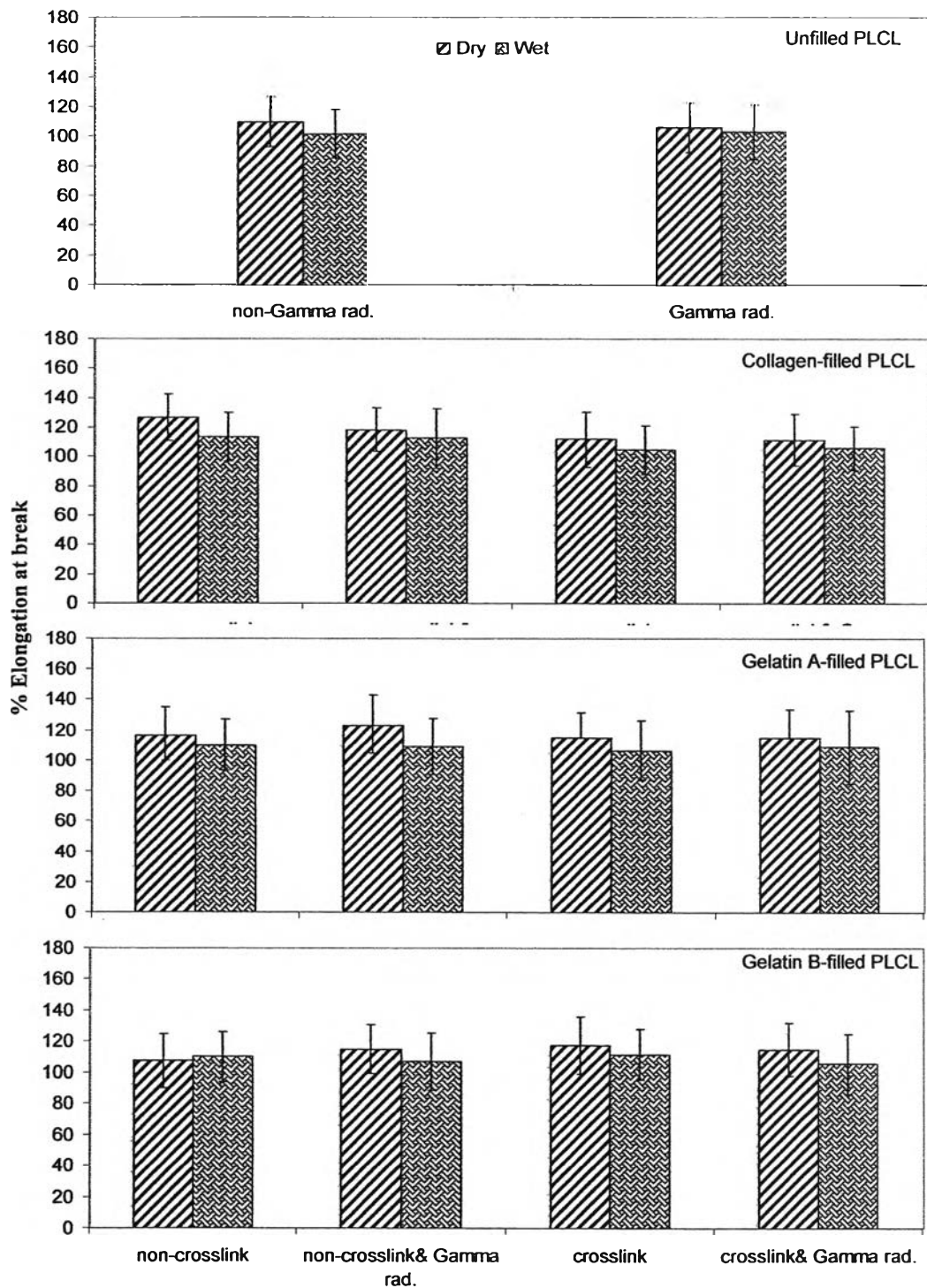
รูปที่ 4.15 ความทนแรงดึงแบบแห้งและแบบเปียก (n=4) ของ ท่อ PLCL กลวง ( Unfilled PLCL), ท่อ PLCL บรรจุคอลลาเจน (Collagen-filled PLCL), ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด A (Gelatin A-filled PLCL) และ ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด B (Gelatin B-filled PLCL)

หมายเหตุ : non-Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL กลวงที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, Gamma rad. หมายถึง ท่อกลวงที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, non-crosslink หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติก, non-crosslink & Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกแต่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, crosslink หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติก, crosslink & Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกและฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา



รูปที่ 4.16 แสดงกราฟโมดูลัสของความยืดหยุ่น ( $n=4$ ) ของท่อ PLCL กลวง ( Unfilled PLCL), ท่อ PLCLบรรจุคอลลาเจน (Collagen-filled PLCL), ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด A (Gelatin A-filled PLCL) และ ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด B (Gelatin B-filled PLCL)

หมายเหตุ : non-Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL กลวงที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, Gamma rad. หมายถึง ท่อกลวงที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, non-crosslink หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติก, non-crosslink & Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกแต่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, crosslink หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติก, crosslink & Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกและฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา



รูปที่ 4.17 แสดงกราฟเปอร์เซ็นต์ความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด (n=4) ของท่อ PLCL กลวง ( Unfilled PLCL), ท่อ PLCLบรรจุคอลลาเจน (Collagen-filled PLCL), ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด A (Gelatin A-filled PLCL) และ ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด B (Gelatin B-filled PLCL)

หมายเหตุ : non-Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL กลวงที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, Gamma rad. หมายถึง ท่อกลวงที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, non-crosslink หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมา, non-crosslink & Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาแต่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา, crosslink หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมา, crosslink & Gamma rad. หมายถึง ท่อ PLCL บรรจุโปรตีนที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาและฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา

#### 4.4 สมบัติทางชีวภาพของท่อนำเส้นประสาท PLCL

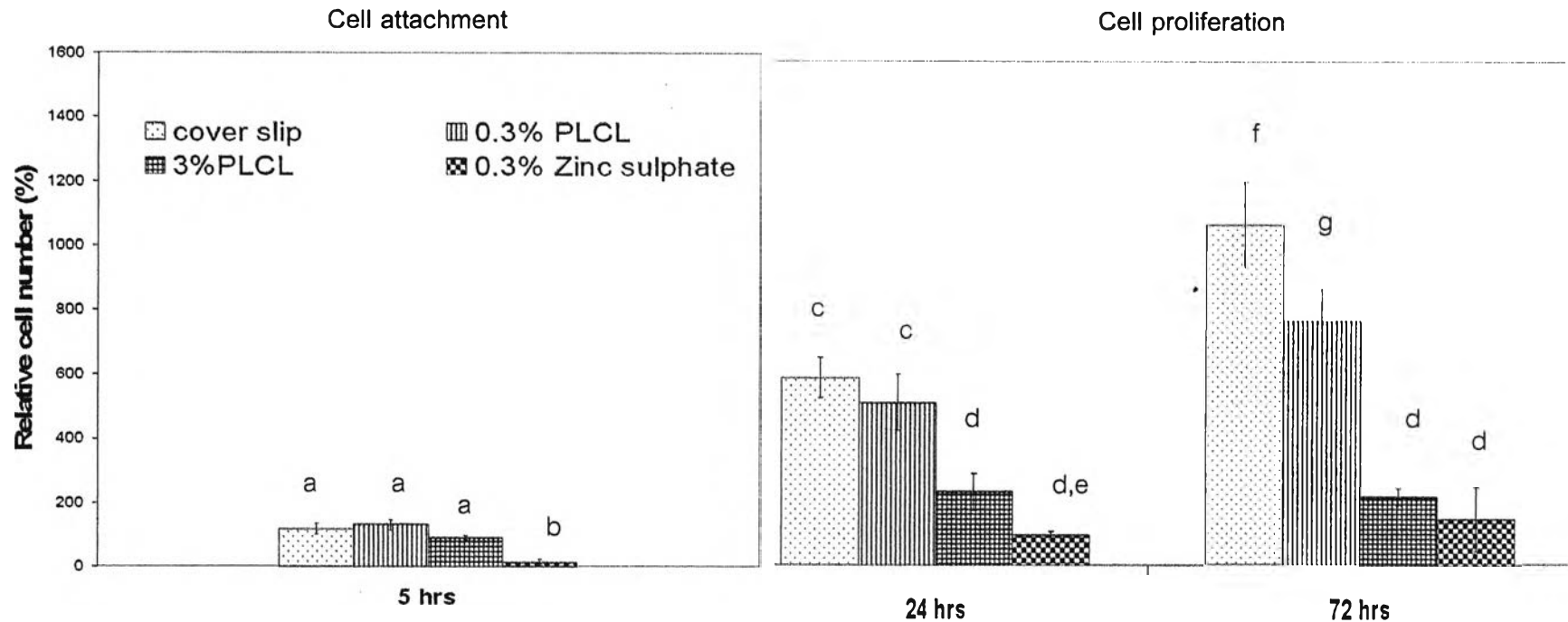
##### 4.4.1 ความเข้ากันได้ของวัสดุผลิตท่อนำเส้นประสาทกับเซลล์ผิวหนังหนู

การศึกษานี้ต้องการทราบว่า PLCL สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ (Biocompatibility) โดยใช้เซลล์ไลน์มาตรฐานของผิวหนังหนูเลี้ยงบน PLCL ความเข้มข้น 0.3 และ 3 % โดยนำหนักในสารละลาย 1,4-dioxane ขึ้นรูปเป็นฟิล์มบน cover slip เปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุมบวกคือ กระจกปิดสไลด์ (Cover slip), กลุ่มควบคุมลบคือ สารละลาย Zinc sulphate ความเข้มข้น 0.3% โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ [International Standard ISO 10993-12, 2002]

จากรูป 4.18 พบว่าปริมาณเซลล์สัมผัสที่ 5 ชั่วโมง ของฟิล์ม PLCL จากสารละลาย PLCL 0.3% และ 3% โดยน้ำหนัก มีการติดของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์สัมผัสของแต่ละตัวอย่างเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยฟิล์มจาก PLCL 0.3 % มีปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมบวกที่เลี้ยงเซลล์บน Cover slip แต่ฟิล์มจาก PLCL 3% มีการเจริญของเซลล์ค่อนข้างน้อยและที่เวลา 72 ชั่วโมงปริมาณเซลล์สัมผัสของฟิล์มจาก PLCL 0.3 % เพิ่มขึ้นจากที่เวลา 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนฟิล์มจาก PLCL 3% และกลุ่มควบคุมลบมีปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างจากที่ 24 ชั่วโมง

โดยรวมพบว่าในส่วนของฟิล์มที่เตรียมจาก PLCL 0.3 % โดยน้ำหนัก จะมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละเวลาที่เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีบนฟิล์ม PLCL ที่ความเข้มข้นนี้แต่ฟิล์มจาก PLCL 3% ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงมีปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจากที่เวลา 5 ชั่วโมงแสดงว่าเซลล์ยังสามารถเจริญได้บนฟิล์ม PLCL ที่ความเข้มข้นนี้แต่ปริมาณไม่สูงมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกและฟิล์มจาก PLCL 0.3% อย่างไรก็ตามผลโดยรวมทำให้ทราบว่าเซลล์ไลน์มาตรฐานของผิวหนังหนูสามารถเจริญได้ดีบน PLCL ที่ขึ้นรูปเป็นฟิล์มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ด้วย ถ้าความเข้มข้นสูงไปอาจมีการเจริญและเพิ่มจำนวนน้อยกว่าความเข้มข้นต่ำและการที่เซลล์เจริญบนฟิล์มจาก PLCL 3% ได้น้อยอาจมาจากตัวคุณสมบัติของ PLCL เองที่ค่อนข้างเฉื่อยและไม่มีส่วนของ Arginine-glycine-aspartate (RGD) amino acid sequence ซึ่งทำให้เซลล์ติด (Cell attachment) หรือเซลล์เคลื่อนย้าย (Cell migration) ดังนั้นจึงมีผลทำให้ปริมาณเซลล์สัมผัสค่อนข้างต่ำแม้เวลานานขึ้นแสดงให้เห็นว่าควรใช้เวลาในการศึกษาเพิ่มขึ้น เพื่อให้เวลาสำหรับการเจริญของเซลล์บน PLCL ฟิล์ม [Zhu Y. และคณะ, 2006; Zhu Y. และคณะ, 2007] นอกจากนี้สามารถดูรูปถ่ายเซลล์บนตัวอย่างที่เวลาต่างๆในรูปที่ 4.19 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับการหาปริมาณเซลล์สัมผัสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT

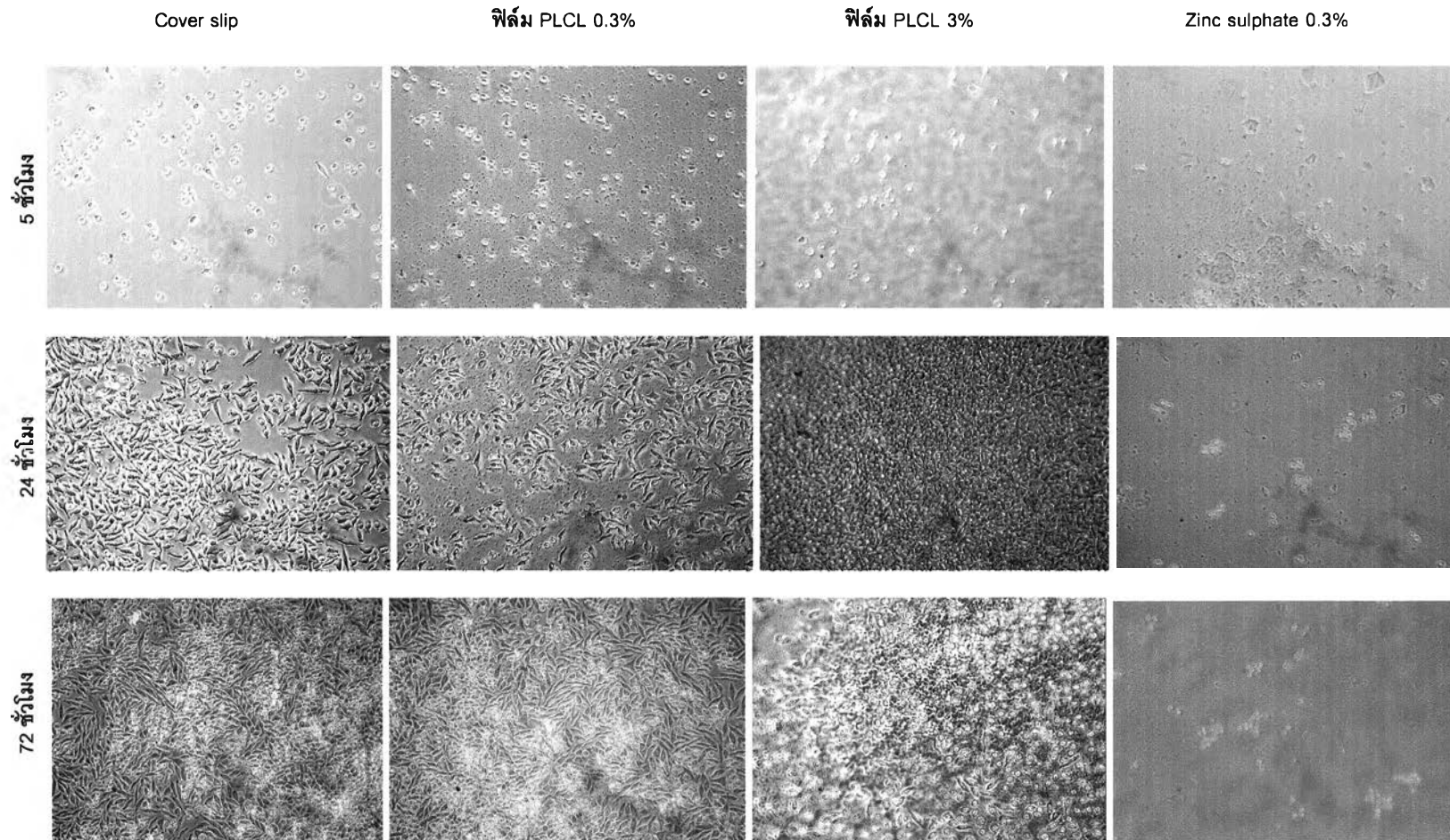




รูปที่ 4.18 ปริมาณเซลล์สัมผัสของเซลล์ไลน์มาตรฐานของผิวหนังหนู บน Cover slip, फिल्मจาก PLCL 0.3% โดยน้ำหนัก, फिल्मจาก PLCL 3% โดยน้ำหนัก และ Zinc sulphate 0.3 % โดยน้ำหนักในน้ำที่แห้งบน Cover slip เวลา 5, 24 และ 72 ชั่วโมง (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 20,000 เซลล์/ตัวอย่าง) โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณเซลล์สัมผัสที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$

Cover slip คือ กลุ่มควบคุมบวก ที่เลี้ยงเซลล์บน Cover slip, 0.3% PLCL คือ กลุ่มทดลองที่เลี้ยงเซลล์บนฟิล์มที่เตรียมจาก PLCL 0.3% โดยน้ำหนัก, 3% PLCL คือ กลุ่มทดลองที่เลี้ยงเซลล์บนฟิล์มที่เตรียมจาก PLCL 3% โดยน้ำหนัก, 0.3% Zinc sulphate คือ กลุ่มควบคุมลบที่เตรียมจากสารละลาย Zinc sulphate 0.3% โดยน้ำหนัก ปล่อยให้แห้งบน Cover slip



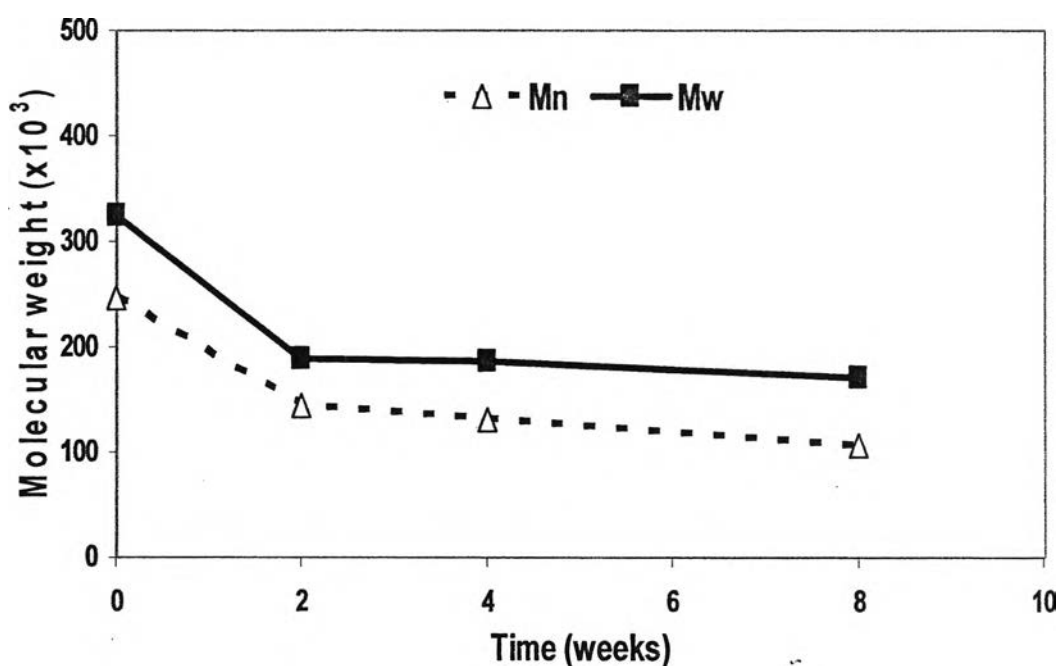
รูปที่ 4.19 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า ของเซลล์ไลเนียร์มาตรฐานผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblasts) บน Cover slip, ฟิล์มจาก PLCL 0.3% โดยน้ำหนัก, ฟิล์มจาก PLCL 3% โดยน้ำหนัก และ Zinc sulphate 0.3 % โดยน้ำหนัก ในน้ำที่แห้งบน Cover slip เวลา 5, 24 และ 72 ชั่วโมง

#### 4.4.2 การสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท PLCL ในสัตว์ทดลอง

4.4.2.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล การศึกษาการสลายตัวในสัตว์ทดลองของท่อนำเส้นประสาท PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ Lactic acid : Caprolactone 75:25 และ  $M_w$  ประมาณ 300,000 ต้องการศึกษว่า PLCL มีการสลายตัวเป็นอย่างไรในสัตว์ทดลอง โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของวัสดุหลัก PLCL โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) [Jeong, Si. และคณะ, 2004] พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุลและ Polydispersity index (PDI) ที่เวลาเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.20) แสดงว่ามีการสลายตัวของ PLCL ที่เวลาต่างๆ โดยแนวโน้มของ  $M_n$  และ  $M_w$  จะลดลงเมื่อเวลาในการฝังเพิ่มขึ้นแต่จะลดลงไม่มาก โดยที่เวลา 8 สัปดาห์เมื่อเทียบกับที่เวลา 0 สัปดาห์ ค่า  $M_n$  ลดลง 57% ค่า  $M_w$  ลดลง 47% ส่วนค่า PDI ซึ่งแสดงการกระจายตัวของสายพอลิเมอร์ที่ขนาดต่างๆ ยังมีค่า PDI เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีการกระจายของขนาดที่แตกต่างกันมากขึ้น

ตารางที่ 4.6 ผลวิเคราะห์การสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท PLCL 75:25 โคพอลิเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุล 300,000) ที่ฝังได้ฉนวนหนังหนู Wistar ที่ เวลา 2, 4 และ 8 สัปดาห์ แล้วนำออกมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) (n=3)

เวลาในการฝัง (สัปดาห์)	$M_n(x10^3)$ เฉลี่ย (ร้อยละ)	$M_w(x10^3)$ เฉลี่ย (ร้อยละ)	PDI ( $M_w/M_n$ ) เฉลี่ย
0	246.16 (100%)	325.07 (100%)	1.29
2	144.61 (58.75%)	189.08 (58.17%)	1.32
4	130.31 (52.94%)	187.38 (57.64%)	1.44
8	106.81 (43.39%)	170.82 (52.55%)	1.61



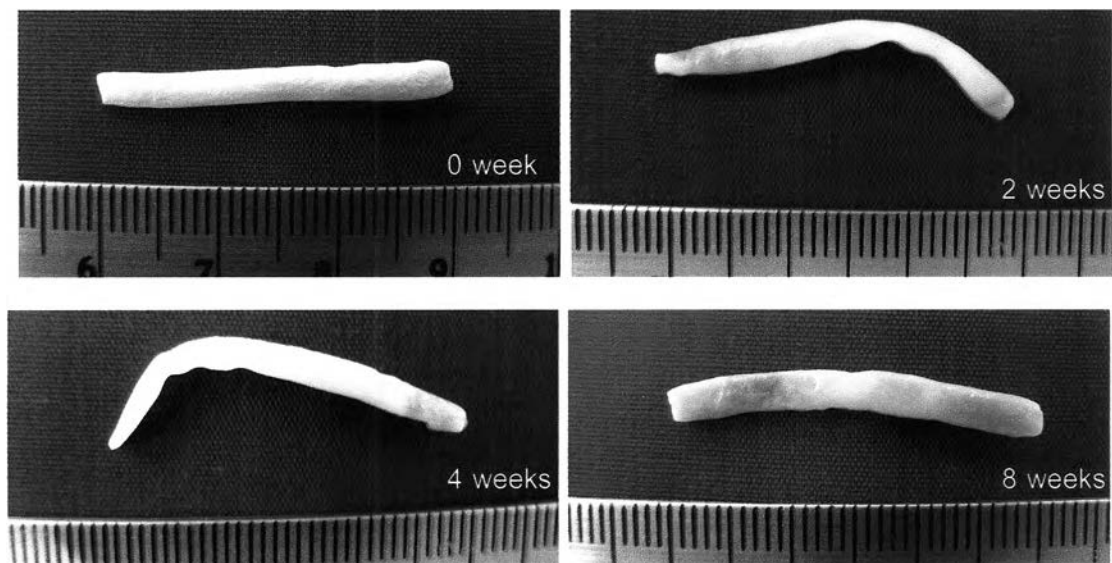
รูปที่ 4.20 กราฟการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของท่อนำเส้นประสาท PLCL จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) ที่เวลา 0, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ (n=3)

$M_n$  จะแสดงถึงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลตามจำนวนของสายพอลิเมอร์ซึ่งจะแสดงค่าเฉลี่ยตามเลขคณิตศาสตร์โดยทั่วไปและยังหมายถึงค่าน้ำหนักโมเลกุลที่มีจำนวนสูงสุดได้ด้วย ส่วนค่า  $M_w$  นั้นเป็นค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลตามน้ำหนักและจะมีค่ามากกว่า  $M_n$  เสมอ ในการลดลงของ  $M_n$  และ  $M_w$  เกิดจากมีการสลายตัวของ PLCL โดยพบว่าที่ 8 สัปดาห์เมื่อเทียบกับ 0 สัปดาห์มี  $M_n$  ลดลง 56.61% ค่า  $M_w$  ลดลง 47.45% ส่วนค่า PDI เพิ่มขึ้นจาก 1.29 เป็น 1.61 อาจเนื่องมาจากการที่มีการสลายตัวของ PLCL จึงทำให้มีการกระจายของพอลิเมอร์หลายขนาดขึ้น ค่า PDI จึงเพิ่มขึ้นตามไปด้วยแม้เพิ่มเพียงเล็กน้อย (PDI มาจาก  $M_w$  หารด้วย  $M_n$ ) เพราะฉะนั้นยิ่งมีการเพิ่มขึ้นของ PDI มากจะแสดงถึงว่ามีการกระจายขนาดของสายพอลิเมอร์มากขึ้นด้วยจึงพออนุมานได้ว่าการสลายตัวของ PLCL จึงทำให้มีการกระจายขนาดของสายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นแม้จะมีการสลายตัวเพียงเล็กน้อยก็ตาม อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตลักษณะจากภายนอกด้วยตาเปล่าและภาพถ่าย SEM ยังมียังคงลักษณะรูปร่างเช่นเดิม แสดงถึงการสลายตัวช้าดังนั้นควรมีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนโคพอลิเมอร์เพื่อให้ท่อนำเส้นประสาทสลายตัวได้เร็วขึ้นโดยอาจเลือกใช้อัตราส่วน Lactide:caprolactone ที่สูงขึ้นเนื่องจาก Poly(L-lactide) มีความเป็นผลึกประมาณ 37% ส่วน Polycaprolactone มีความเป็นผลึกประมาณ 50% Polycaprolactone มีความยืดหยุ่นสูงและมีค่า Modulus ต่ำ และอัตราการสลายตัวช้ากว่า Poly(L-lactide) [Hakkarainen, M.,

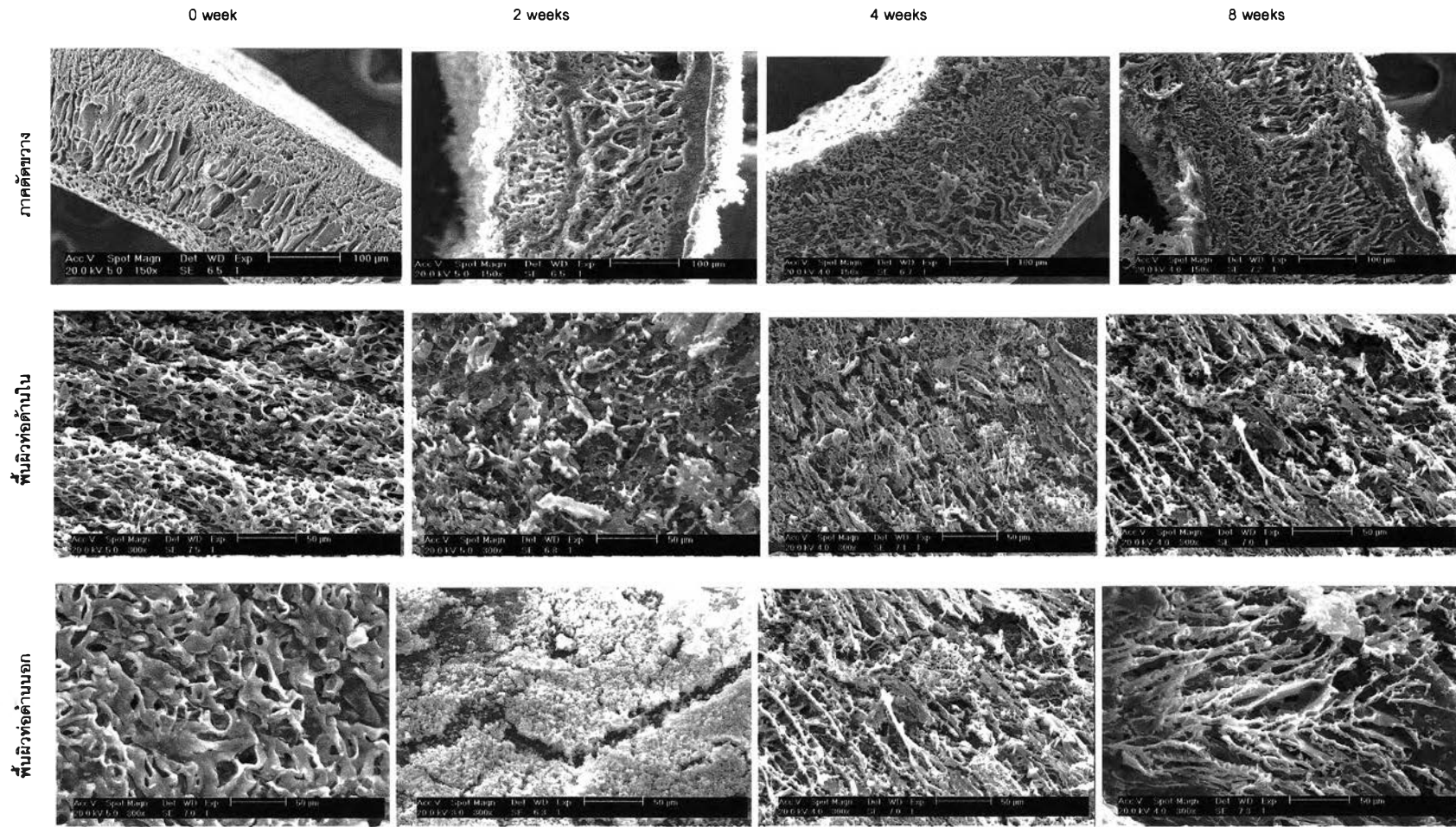
2002; Barbucci, R., 2002] เมื่อพอลิเมอร์มีความเป็นผลึกสูงการแทรกซึมของน้ำเข้าสู่สายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์ยากขึ้นเพราะฉะนั้นควรเลือกสัดส่วนของ Lactide : caprolactone สูงขึ้นเพื่อให้ท่อนำเส้นประสาทที่มีการสลายตัวเร็วขึ้นจากการลดส่วนของ Caprolactone ซึ่งมีความเป็นผลึกสูงกว่าลง

#### 4.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้าง

จากรูปที่ 4.21 และ 4.22 พบว่าโดยทั่วไปส่วนของท่อนำเส้นประสาทยังมีลักษณะดั้งเดิมแม้มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลโดยลดลงประมาณ 50% ในที่นี้ไม่ได้หมายความว่าไม่มีการสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท PLCL แต่ในระหว่างที่ทำการฝังยังมีการแทรกตัวของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่บริเวณของท่อนำเส้นประสาทดังนั้นจึงดูเหมือนยังคงไว้ซึ่งโครงสร้างและลักษณะของท่อนำเส้นประสาทดั้งเดิมแม้มีการสลายตัวเกิดขึ้นก็ตาม และการงอของท่อนำเส้นประสาท PLCL ในรูป 4.21 ที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์เกิดจากท่อนำเส้นประสาท PLCL ยาวทำให้เมื่อฝังได้ผิวหนังเกิดการพับงอขึ้นตั้งแต่ผ่าฝัง นอกจากนี้ยังพบเศษสิ่งแปลกปลอมติดอยู่กับท่อนำเส้นประสาทซึ่งอาจเป็นเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ติดอยู่กับตัวอย่างเมื่อนำตัวอย่างไปทำให้แห้งจึงกลายเป็นอนุภาคของแข็งติดอยู่ที่ตัวอย่างลักษณะพื้นผิวจึงดูเปลี่ยนแปลงไปคล้ายมีวัตถุอื่นเคลือบอยู่ ที่เวลานานขึ้นพบว่าลักษณะพื้นผิวมีการผุกร่อนไปจากเดิมโดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 8 พบว่ามีการผุกร่อนและดูมีลักษณะพรุณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องมาจากการสลายตัวของ PLCL ซึ่งไปด้วยกันกับผลของ GPC ที่พบว่ามีการลดลงของ  $M_n$  และ  $M_w$  และมีการเพิ่มขึ้นของ PDI



รูปที่ 4.21 รูปถ่ายท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ปลูกถ่ายบนหลังหนู Wistar เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ก่อนถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย SEM และ GPC

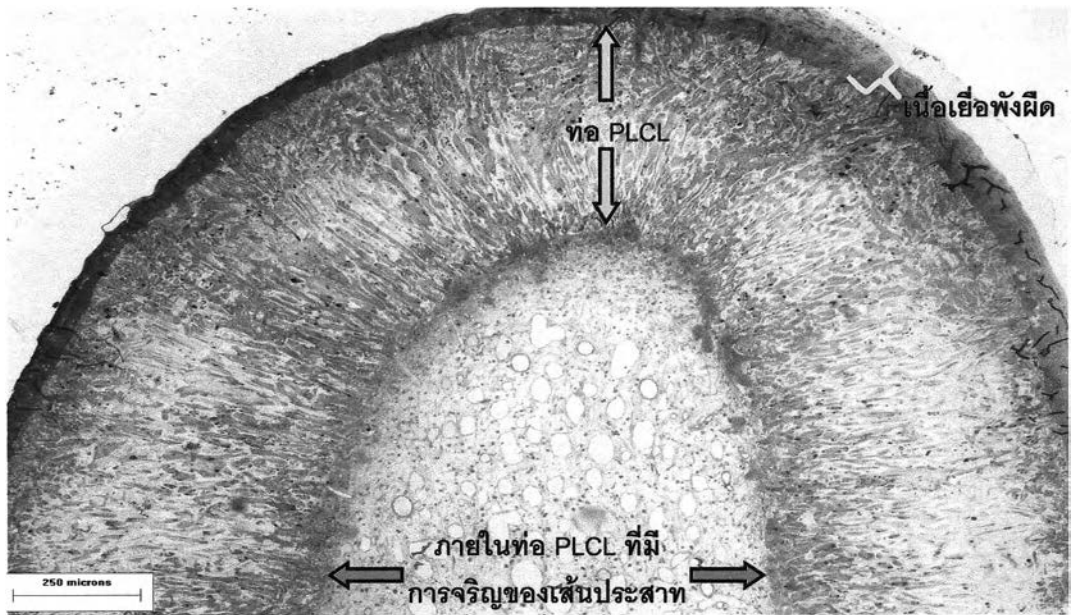


รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายภายใต้กล้อง Scanning electron microscope (SEM) ของท่อ PLCL ที่ปลูกถ่ายบนหลังหนู Wistar เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 8 สัปดาห์

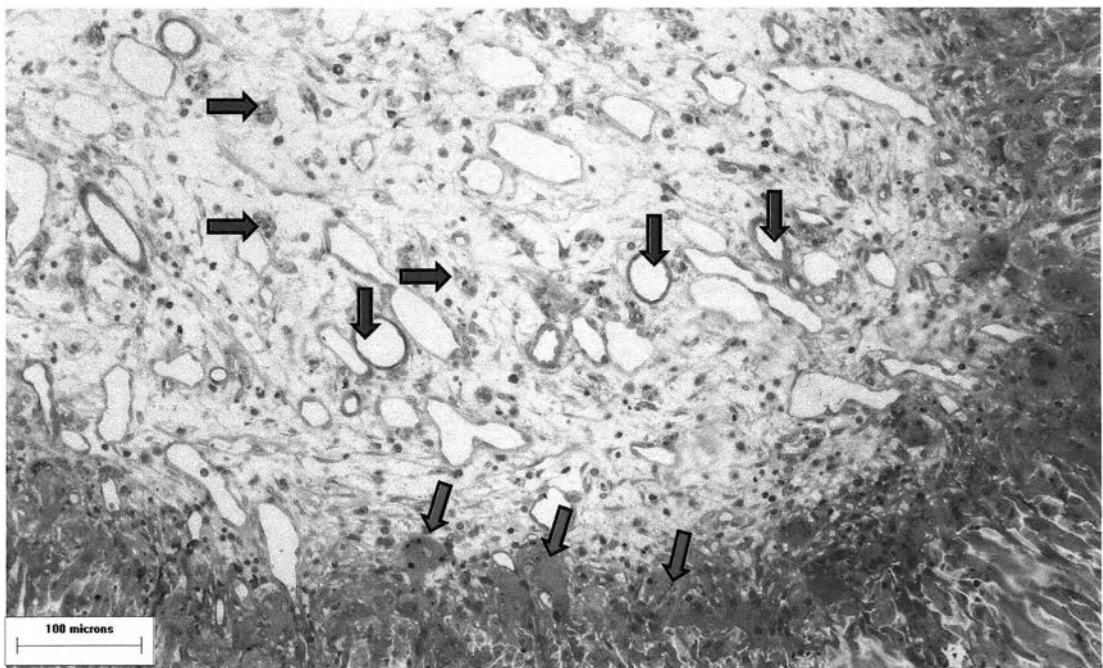
#### 4.4.3 ผลการทดสอบการเจริญของเส้นประสาทในท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบมีโปรตีนตัวเต็มในสัตว์ทดลอง

ท่อนำเส้นประสาท PLCL เส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 1.6 mm หนาประมาณ 0.3 mm ยาว 1.4 cm ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มและทำการเชื่อมขวางโปรตีนตัวเต็มด้วยรังสีเอกซ์จากพลาสติกจากก๊าซอาร์กอน โดยคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A ที่สภาวะความดันก๊าซอาร์กอน 1 มิลลิบาร์ ที่ 5 พัลส์ และเจลาตินชนิด B ที่ความดันก๊าซอาร์กอน 1 มิลลิบาร์ ที่ 1 พัลส์ ภายหลังจากได้นำมาดูดซับด้วยโกรทแฟคเตอร์คือ NGF และนำมาเชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar ที่มีระยะห่างระหว่างปลายขาด 1 เซนติเมตร เพื่อทดสอบการเจริญของเส้นประสาทที่เวลา 1 เดือน โดยต้องการใช้คุณสมบัติของความแตกต่างระหว่างประจุของโกรทแฟคเตอร์และโปรตีนตัวเต็มเพื่อช่วยในการควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ซึ่งในที่นี้คือ NGF (ประจุบวก) [Herrup, K. และ Shooter, E.M., 1993] จากเจลาตินชนิด B ซึ่งมีประจุลบ แต่ต้องการใช้คอลลาเจนและเจลาตินชนิด A ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นบวก [Tabata, Y. และคณะ, 1998a; 1998b; 1999; Young, S. และคณะ, 2005] เป็นกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับเจลาตินชนิด B เพื่อศึกษาผลในการช่วยควบคุมปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ที่มีต่อการงอกของเส้นประสาท

จากการศึกษาพบว่าท่อนำเส้นประสาทสามารถคงรูปของท่ออยู่, ไม่ยุบแฟบหรือหักงอแต่อย่างใด และเมื่อนำผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างและย้อมสีสำหรับส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าท่อนำเส้นประสาทยังคงลักษณะเช่นเดิม แสดงถึงการสลายตัวค่อนข้างช้าและโดยรอบท่อนำเส้นประสาท PLCL มีเนื้อเยื่อพังผืดหุ้มโดยรอบท่อ (รูปที่ 4.23) อันเนื่องมาจากท่อนำเส้นประสาท PLCL เป็นสิ่งแปลกปลอมที่นำมาฝังภายในร่างกายจึงเกิดปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกายต่อท่อนำเส้นประสาท



รูปที่ 4.23 รูปท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนัก บรรจุคอลลาเจน 0.8% โดยน้ำหนัก (กำลังขยาย 4 เท่า) ที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้หนักประมาณ 250 กรัม ที่เวลา 1 เดือน (ย้อมด้วยสี Toluidine blue) โดยพบเนื้อเยื่อพังผืด (ปีกกาสีเหลือง) หุ้มภายหลัง, ลูกครีสีเหลืองแสดงขอบเขตของท่อ PLCL และลูกครีสีฟ้าแสดงด้านภายในท่อที่บรรจุโปรตีนซึ่งมีการเจริญของเส้นประสาท



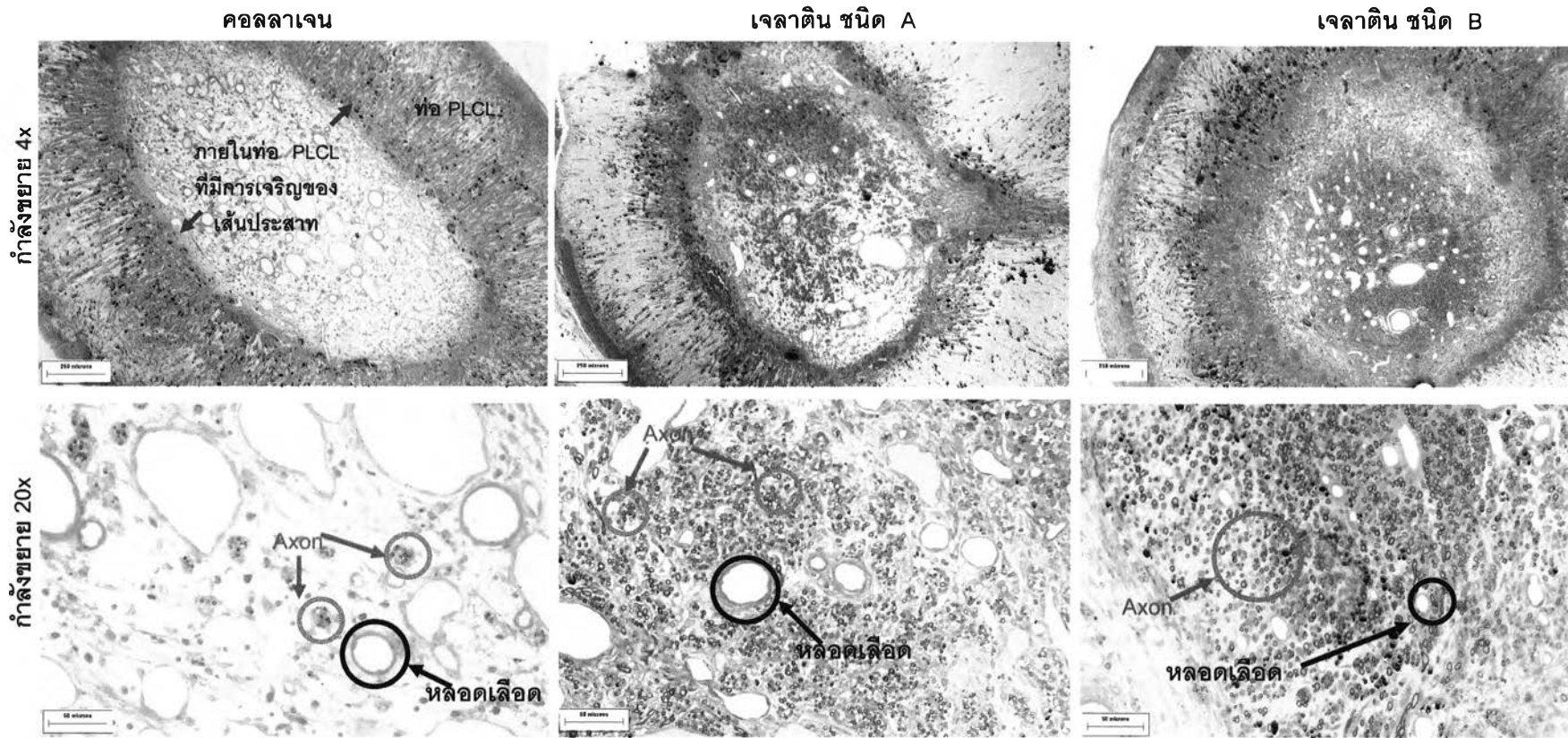
รูปที่ 4.24 ท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนัก บรรจุคอลลาเจน 0.8% โดยน้ำหนัก (กำลังขยาย 10 เท่า) ที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้หนักประมาณ 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน (ย้อมด้วยสี Methylene blue) ที่มี Multinucleate giant cells (ชี้ด้วยลูกครีสีแดง), ลูกครีสีน้ำเงินและลูกครีเขียวชี้แสดง หลอดเลือดและเส้นประสาทที่เกิดขึ้น ตามลำดับ



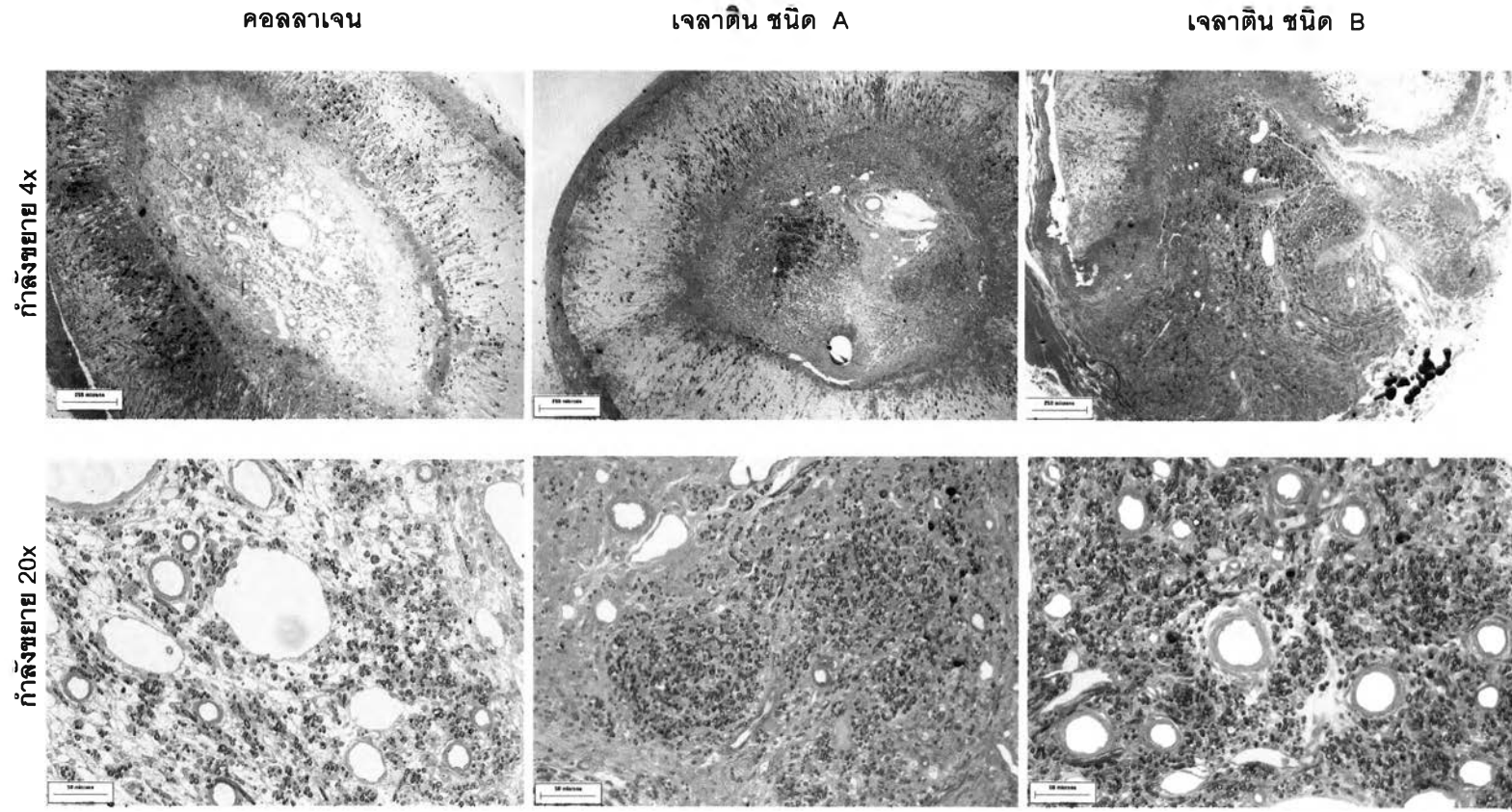
นอกจากนี้ยังมีการเกิดของหลอดเลือดภายในบริเวณที่บรรจุโปรตีนตัวเดิมโดยพบตลอดความยาวของท่อนำเส้นประสาท แสดงถึงว่าไม่มีปัญหาด้านการขาดหลอดเลือดเพื่อส่งสารอาหารมาหล่อเลี้ยงเส้นประสาทที่กำลังเจริญโดยคาดว่าหลอดเลือดเหล่านี้มาจากหลอดเลือดในส่วนต้นของเส้นประสาทที่ขาด (Proximal stump) และอีกส่วนน่าจะมาจากด้านนอกแล้วแทรกเข้ามาในผนังของท่อนำเส้นประสาท PLCL และยังพบว่ามี Multinucleate giant cells อยู่โดยทั่ว (รูปที่ 4.24) ในบริเวณรอยต่อระหว่างท่อนำเส้นประสาท PLCL กับเนื้อเยื่อเส้นประสาทซึ่งเป็นการตอบสนองปกติของร่างกายที่มีต่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกาย เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกายเพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อส่วนต่างๆของร่างกายด้วย ซึ่งในส่วนนี้ยังเป็นการช่วยกำจัด PLCL ตามกลไกของร่างกายนอกเหนือจากการย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพภายในร่างกาย (*In vivo* biodegradation) อย่างไรก็ตามกลุ่มก้อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวพบในปริมาณไม่มากทั้งในเนื้อเยื่อเส้นประสาทหรือในวัสดุ PLCL

ในส่วนของการงอกใหม่ของเส้นประสาทที่เวลา 1 เดือน ภายหลังจากเชื่อมต่อเส้นประสาทด้วยท่อนำเส้นประสาท PLCL จากการสังเกตสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุตัวเดิมทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 4.25 ถึง 4.33) มีการงอกใหม่ของเส้นประสาทขนาดเล็กอยู่และเมื่อตัดตัวอย่างในส่วนของท่อนำเส้นประสาทออกเป็นท่อนสั้นๆ ท่อนละ 2 มม. พบว่าหลังจากท่อนที่ 3 จะไม่พบเส้นประสาทแสดงว่าเส้นประสาทงอกไปได้อย่างน้อย 6 มม. เพราะฉะนั้นเพื่อให้เห็นความชัดเจนจึงได้เปรียบเทียบภาพในท่อนที่ 1 ถึง 3 ซึ่งพบว่าท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินทั้ง 2 ชนิดทำให้เกิดการงอกใหม่ของเส้นประสาทโดยรวมใกล้เคียงกันและท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุคอลลาเจน 2 ใน 3 ของจำนวนตัวอย่าง (n=3) มีการงอกใหม่ของเส้นประสาทหนาแน่นน้อยกว่าเจลาตินทั้ง 2 ชนิดอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้แม้ว่าเจลาตินชนิด A ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมลบ แต่กลับให้ผลในการส่งเสริมการเจริญของเส้นประสาทใกล้เคียงกับเจลาตินชนิด B อาจเนื่องมาจากกระบวนการในขั้นตอนการเชื่อมขวางโดยรังสีเอ็กซ์จากพลาสติกของก๊าศอาร์กอนที่อาจมีผลต่อประจุของเจลาตินชนิด A แต่ยังไม่สามารถหาสาเหตุที่แท้จริงได้ และเมื่อสังเกตการงอกใหม่ของหลอดเลือดภายในบริเวณที่บรรจุโปรตีนตัวเดิมทุกชนิดซึ่งมีการเจริญของหลอดเลือดเป็นจำนวนมาก แสดงว่าท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุโปรตีนตัวเดิมทั้ง 3 ชนิดสามารถส่งเสริมการงอกใหม่ของหลอดเลือดได้ทั้ง 3 ชนิด อย่างไรก็ตามผลการศึกษาการเจริญของเส้นประสาทในท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบบรรจุโปรตีนตัวเดิมที่ควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์นี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพราะฉะนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของระยะเวลา เพื่อให้เห็นความแตกต่างของความหนาแน่นเส้นประสาทที่งอกใหม่อย่างชัดเจนในท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเดิมต่างชนิดกัน นอกจากนี้ควรจะทำการศึกษาเปรียบเทียบ

ในเชิงปริมาณของคุณภาพใยประสาทที่งอกใหม่ เช่น จำนวนและขนาดใยประสาท ความหนาแน่นใยประสาท เป็นต้น ซึ่งในการศึกษานี้ไม่สามารถทำได้เพราะที่ระยะเวลา 1 เดือน ขนาด Axon ยังเล็กเกินกว่าจะทำการวัดเชิงปริมาณได้



รูปที่ 4.25 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างตอนที่ 1 หนูตัวที่ 1 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน (แสดง Axon ในวงกลมสีเขียว และหุ้มเซลล์ในวงกลมสีดำ)

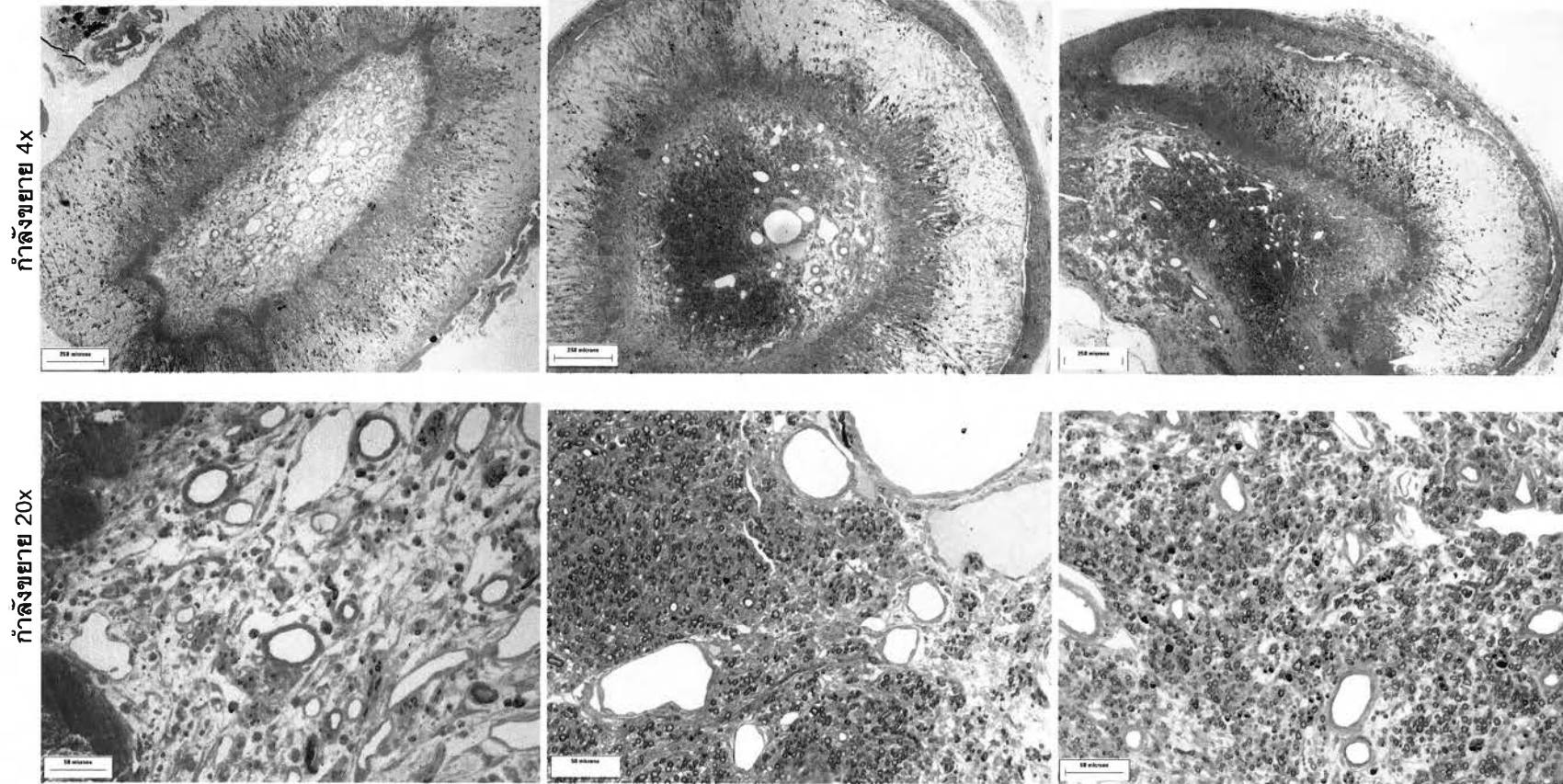


รูปที่ 4.26 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่าของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างท่อนที่ 1 หนูตัวที่ 2 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน

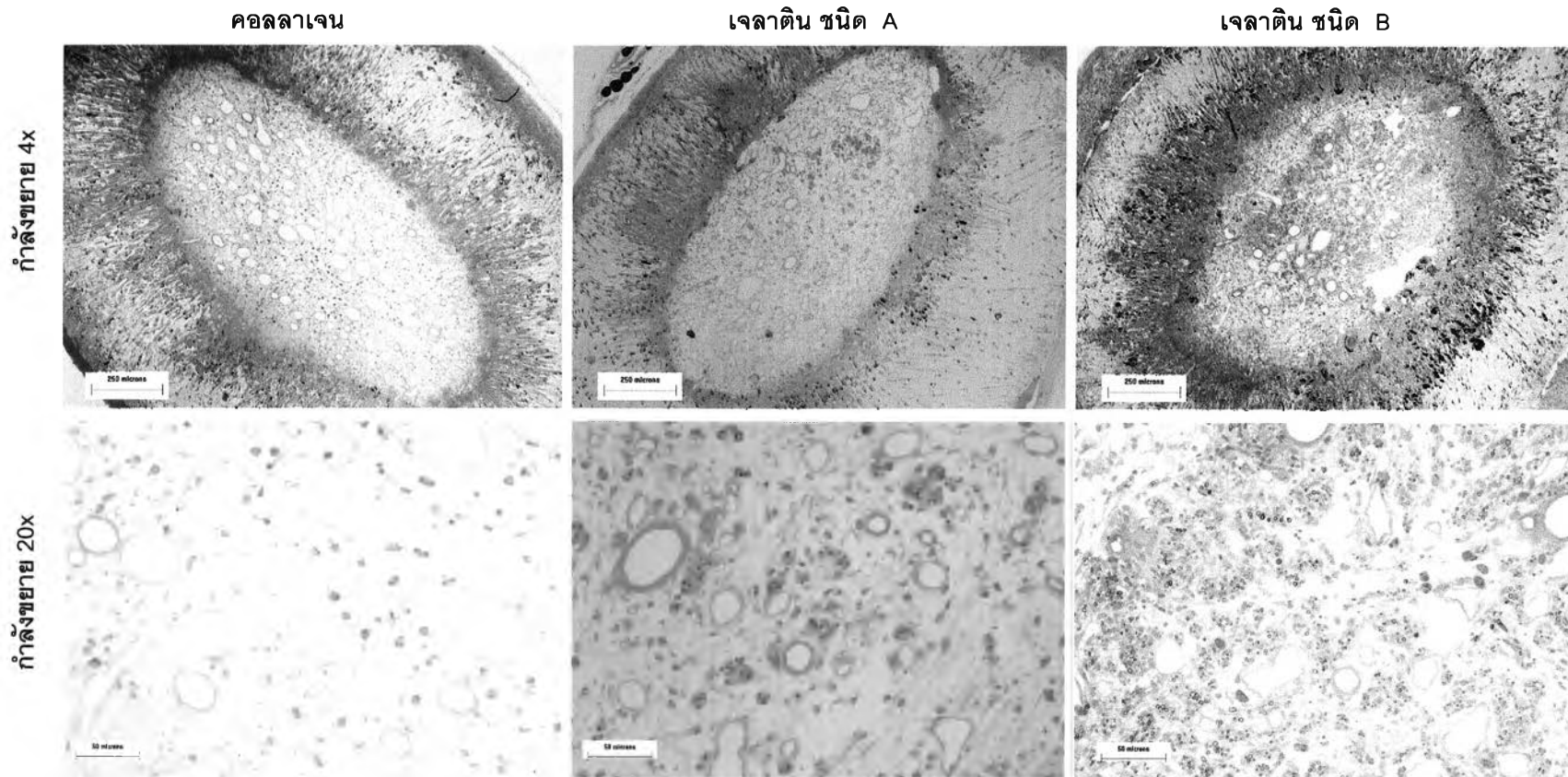
คอลลาเจน

เจลาติน ชนิด A

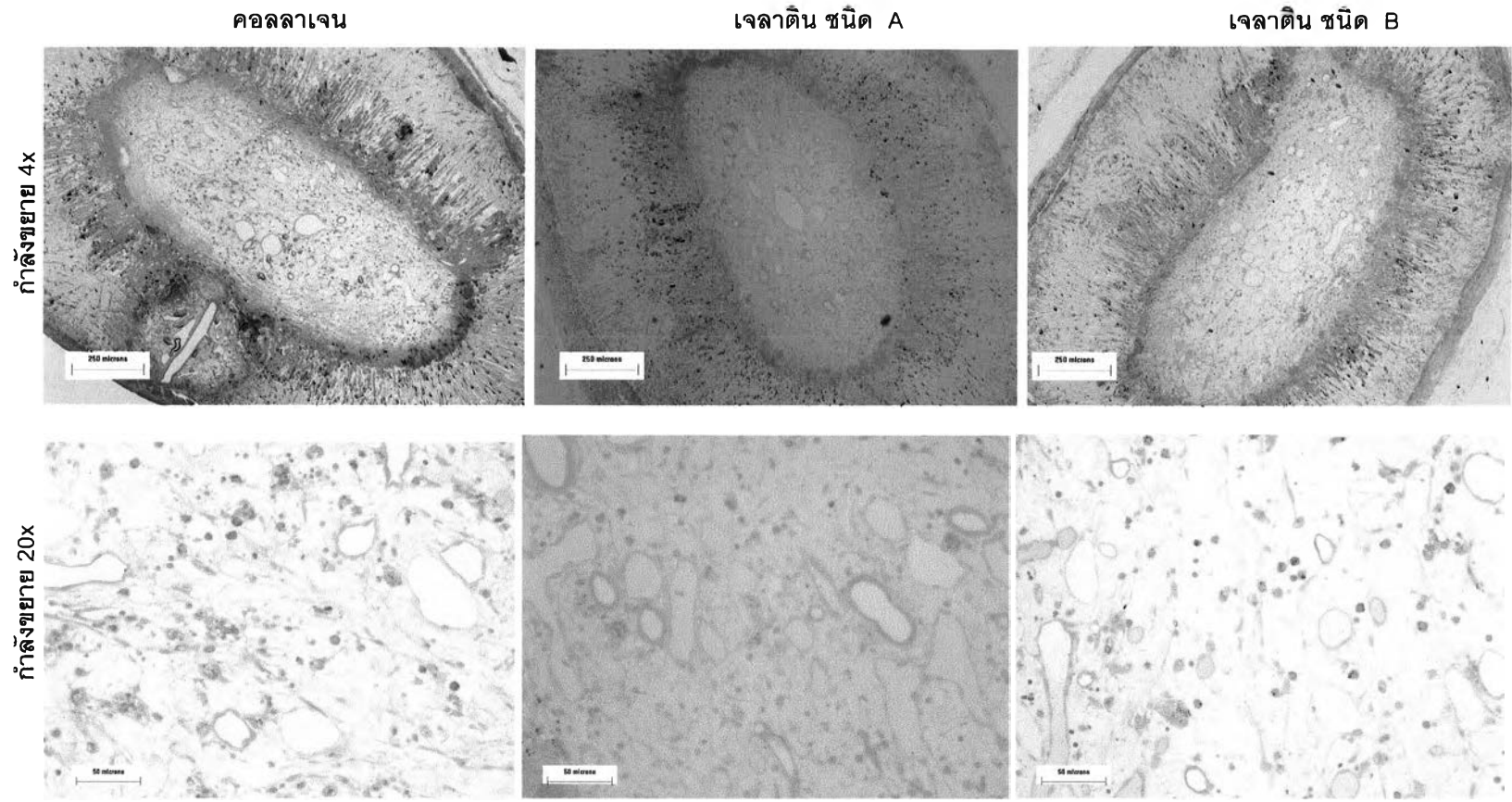
เจลาติน ชนิด B



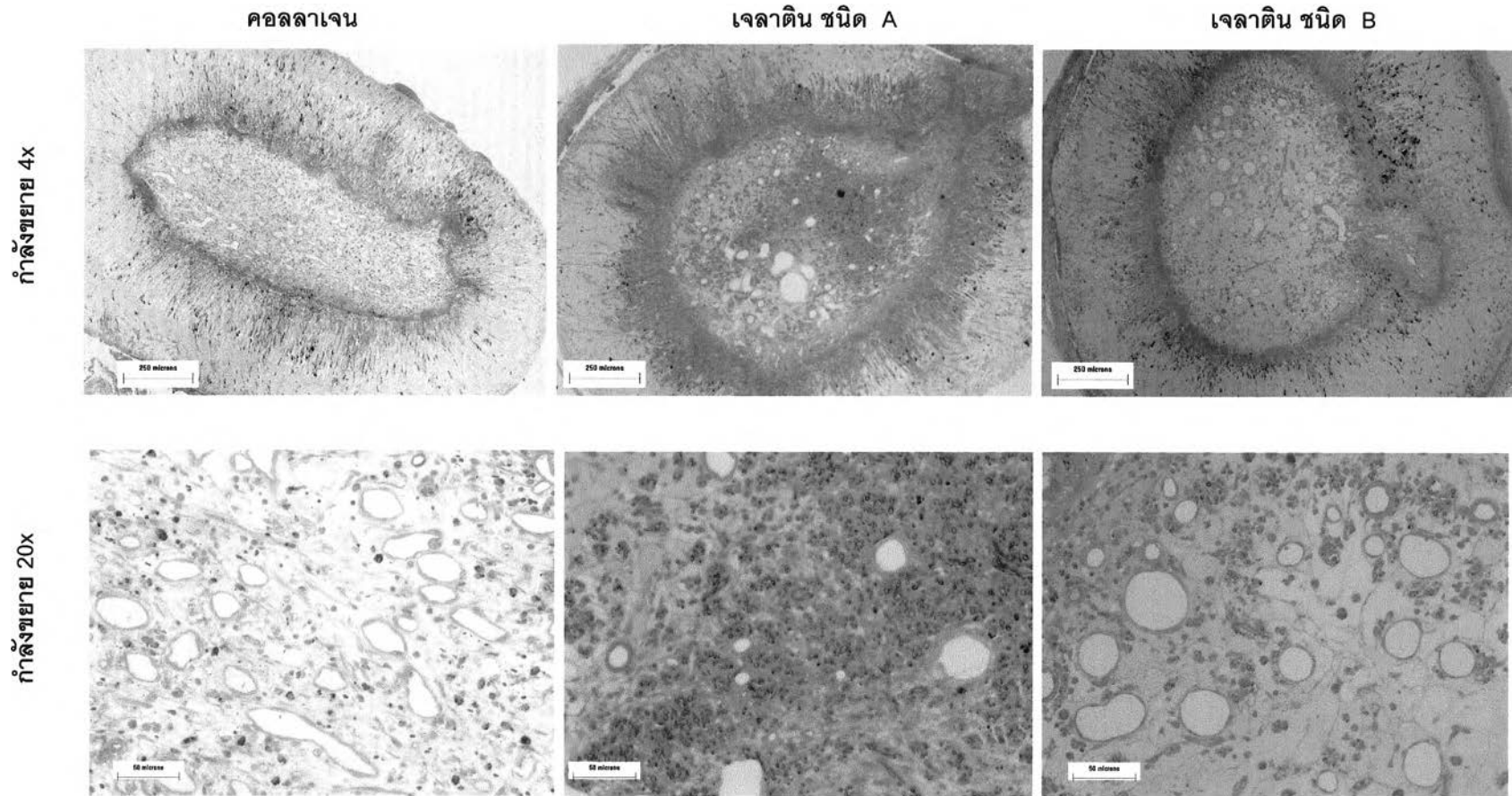
รูปที่ 4.27 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่า ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างตอนที่ 1 หนูตัวที่ 3 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.28 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่า ของท่อ PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างท่อนที่ 2 หนูตัวที่ 1 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน

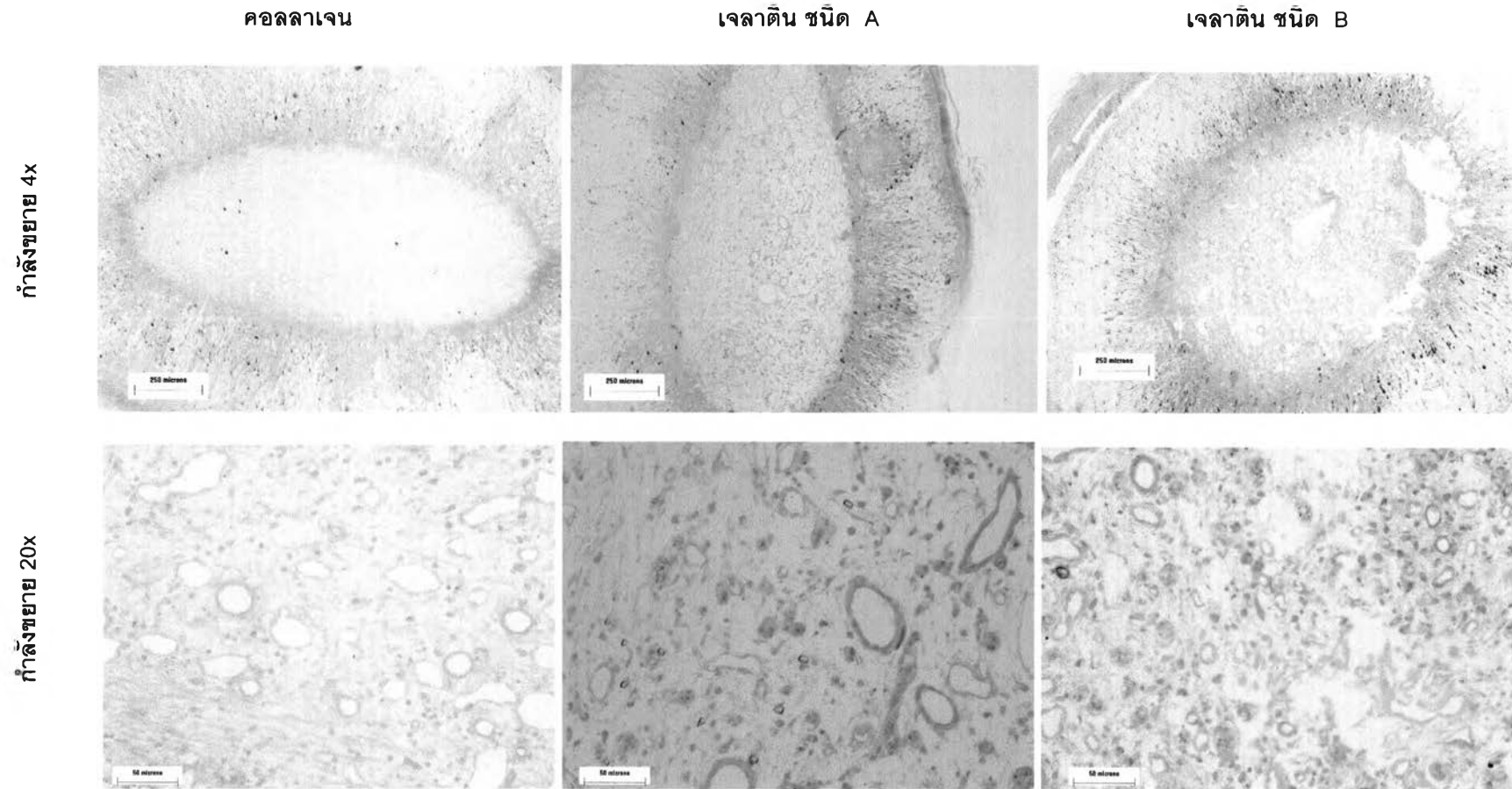


รูปที่ 4.29 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่า ของท่อ PLCL ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างท่อนที่ 2 หนูตัวที่ 2 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน

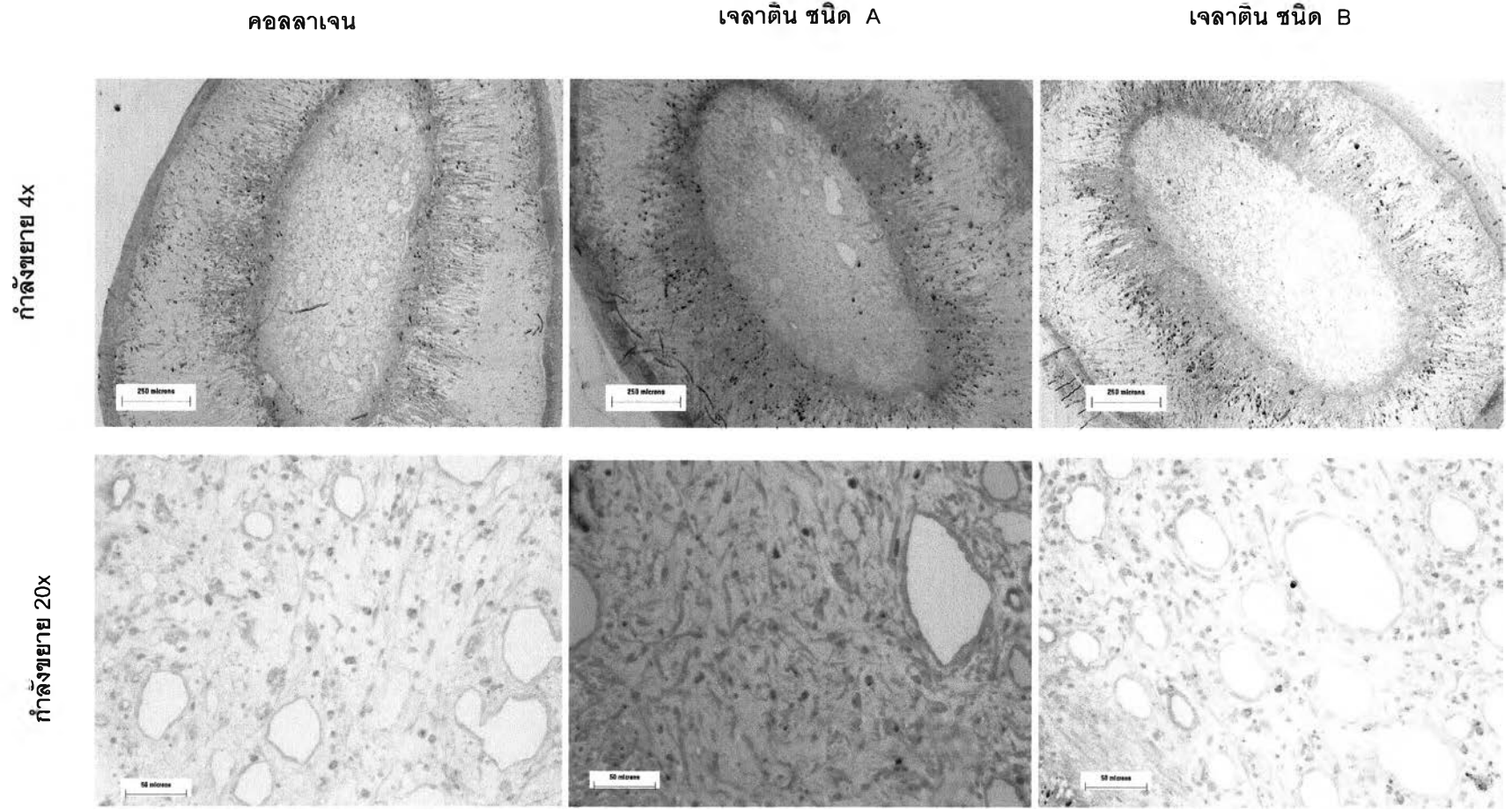


รูปที่ 4.30 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่า ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างท่อนที่ 2 หนูตัวที่ 3 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน

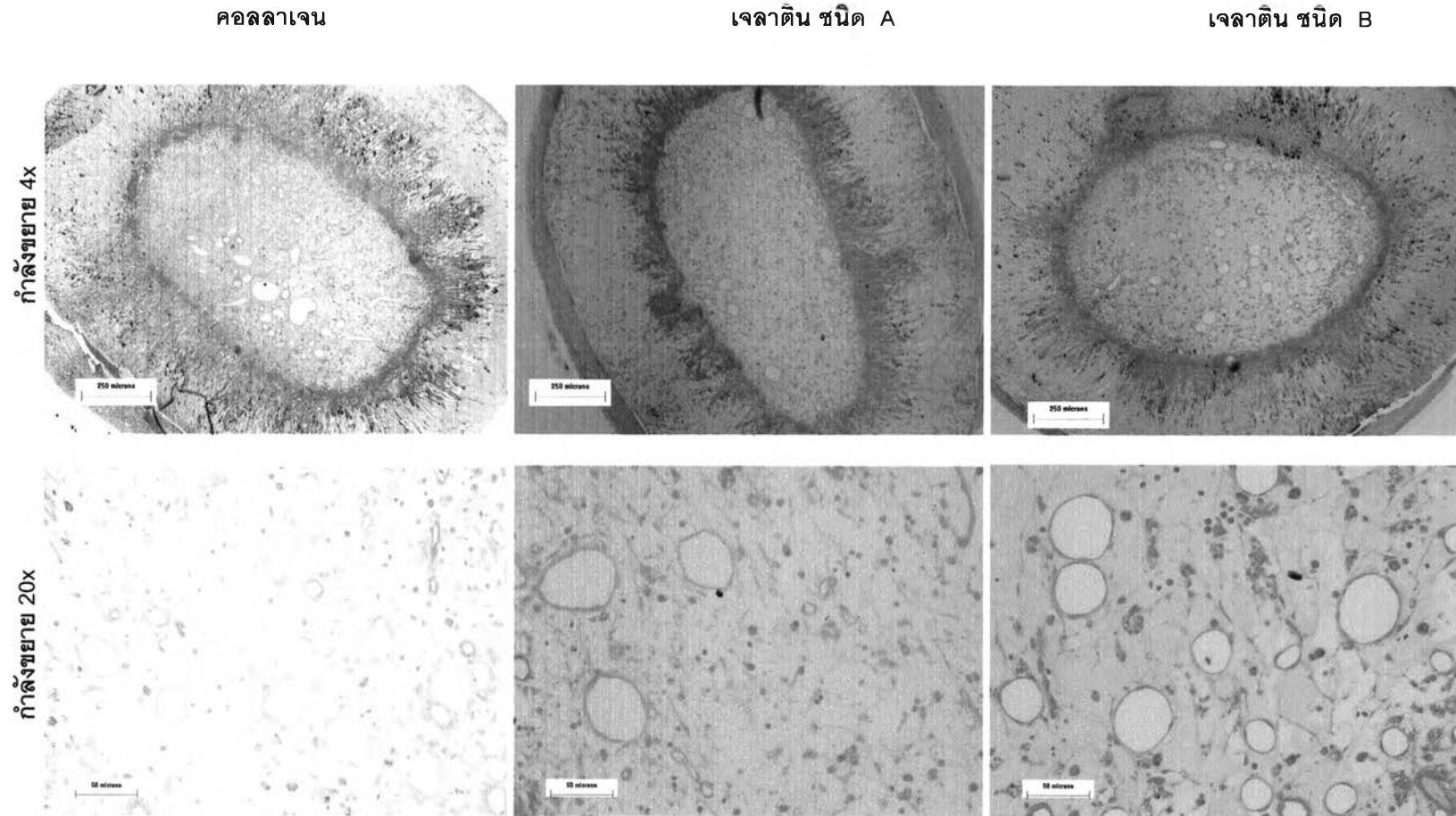




รูปที่ 4.31 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่า ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างท่อนที่ 3 หนูตัวที่ 1 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน

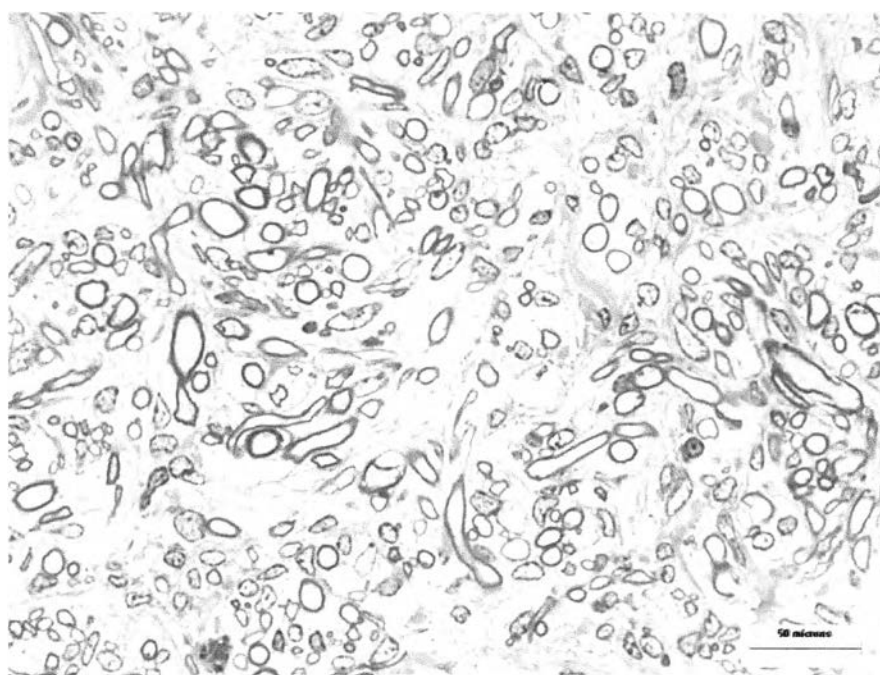


รูปที่ 4.32 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่า ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างท่อนที่ 3 หนูตัวที่ 2 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.33 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 เท่า ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูด้วย NGF 440 ng จากตัวอย่างท่อนที่ 3 หนูตัวที่ 3 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษานี้กับรายงานผลการศึกษาของ สิทธิพร แอททอง และคณะ (ปี 2549) ในเชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar ด้วยท่อนำเส้นประสาทแบบกลวงของ PLCL สัดส่วน Lactide : caprolactone 50:50 พบว่าเส้นประสาทที่งอกใหม่จำนวนมากมีลักษณะไม่ทอดยาวตามแนวของท่อนำเส้นประสาทแต่จะอยู่ตามแนวขวาง (รูป 4.34) ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเจริญไปสู่อวัยวะส่วนปลายที่เส้นประสาทเคยควบคุมอยู่ ดังนั้นการศึกษานี้จึงไม่เลือกใช้การเชื่อมต่อด้วยท่อนำเส้นประสาท PLCL เปล่าที่ไม่มีโปรตีนตัวเติม เนื่องจากทำให้ทิศทางการงอกของ Axon ไม่เป็นระเบียบทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการไม่มี Scaffold คอยพยุง Axon ที่งอกใหม่ในช่วงแรกๆ



รูปที่ 4.34 ภาพเส้นประสาทย้อมด้วยสี Toluidine blue (กำลังขยาย 20 เท่า) ภายในท่อนำเส้นประสาท PLCL สัดส่วน Lactide : caprolactone 50:50 ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ในหนู Wistar เป็นเวลา 2 เดือน ซึ่งมีการงอกของเส้นประสาทตามแนวขวางเป็นจำนวนมาก

[ที่มา : สิทธิพร แอททอง และคณะ, 2549]

เมื่อเปรียบเทียบการศึกษากการเชื่อมต่อเส้นประสาทของวิทยานิพนธ์นี้กับงานวิจัยที่ใช้ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL ของ Nicoli Aldini N. ปี 1996 และ 2000 ซึ่งใช้ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL สัดส่วนโคพอลิเมอร์ Lactide : Caprolactone 50:50 เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.3 มม. หนา 175 ไมโครเมตร ยาว 1.2 ซม. เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar ที่มีระยะห่างระหว่างปลายขาดเท่ากับ 10 มม. โดยท่อนำเส้นประสาท PLCL ให้คุณสมบัติเชิงกลที่ดีสามารถทำการเย็บได้โดยง่ายโดยท่อนำเส้นประสาทไม่แตก โดยที่เวลา 30 วัน มีการเจริญของ Schwann cell

และเส้นประสาทที่งอกใหม่ ที่เวลา 180 วัน พบการงอกของเส้นประสาท, Axon ที่มี Myelin หุ้ม และการกลับคืนหน้าที่ของเส้นประสาทไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเส้นประสาทของตัวหนู Wistar เอง (Autologous nerve grafts) และตัวท่อนำเส้นประสาทมีการสลายตัว (สังเกตด้วย Light microscopy และ Electron microscopy) เกือบสมบูรณ์ที่ 180 วัน นอกจากนี้พบว่ามี Multinucleate giant cell ที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยรอบท่อนำเส้นประสาทแต่ไม่พบการอักเสบเกิดขึ้นและท่อนำเส้นประสาทไม่ก่อให้เกิดพิษ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยดังกล่าวกับผลการศึกษากการเชื่อมต่อท่อนำเส้นประสาท PLCL กับเส้นประสาท sciatic ที่ 1 เดือน ของวิทยานิพนธ์นี้พบว่าสิ่งที่พบเช่นเดียวกันคือ Multinucleate giant cell แต่อยู่ในเนื้อ PLCL และไม่มีอาการอักเสบเกิดขึ้น รวมถึงท่อนำเส้นประสาทยังคงสภาพอยู่เช่นเดิมเช่นเดียวกันและยังสังเกตเห็น Axon ที่งอกใหม่และ Schwann cell เช่นเดียวกัน

จากรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการใช้สิ่งต่างๆบรรจุภายในท่อนำเส้นประสาทพบการใช้คอลลาเจนบรรจุภายในท่อนำเส้นประสาท ดังในการศึกษาของ Matsumoto K. และคณะ (ปี 2000) ที่ใช้คอลลาเจนแบบฟองน้ำซึ่งเชื่อมขวางด้วย ความร้อนสุญญากาศ บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาท Poly(glycolic acid) และเชื่อมต่อเส้นประสาท Peroneal ใน Beagle dog ที่มีระยะขาด 80 มม. พบว่าที่เวลา 12 เดือน เส้นประสาทงอกผ่านส่วนที่ขาดและที่เวลา 10-12 เดือนสัตว์ทดลองสามารถเดินได้เกือบเป็นปกติ ซึ่งในการศึกษานี้เปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มควบคุมลบ (ตัดเส้นประสาทแล้วไม่ได้เชื่อมต่อ) เท่านั้น ในส่วนของการใช้เจลาตินนั้นยังไม่พบการใช้เจลาตินบรรจุภายในท่อนำเส้นประสาท แต่พบของ Chen Y และคณะ (ปี 2005) ซึ่งใช้ท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตจากเจลาตินและเชื่อมขวางด้วย Gepinin และนำไปเชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ที่มีระยะขาด 10 มม. ในหนู Sprague-Dawley พบว่ามีการเจริญของเส้นประสาทผ่านส่วนที่ขาดที่เวลา 6 สัปดาห์รวมถึงที่เวลา 8 สัปดาห์ยังมีพื้นที่ของเส้นประสาทรวม (Total nerve area) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ 4 และ 6 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้กลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่น

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Doug youn L และคณะ (ปี 2006) ที่ใช้ท่อนำเส้นประสาท Poly (L-lactide-co-glycolic acid) ซึ่งภายในท่อเคลือบด้วยคอลลาเจน แล้วนำมาเชื่อมต่อเส้นประสาท Peroneal ในกระต่าย ที่มีระยะขาด 15 มม. พบว่ามีจำนวนเส้นใยประสาทที่มี Myelin หุ้มและค่าคลื่นไฟฟ้าของกล้ามเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้หลอดเลือด Jugular เชื่อมต่อ

การศึกษาวิจัยที่ใช้เซลล์ที่ส่งเสริมการเจริญของเส้นประสาทบรรจุภายในท่อนำเส้นประสาท ดังกรณีการศึกษาของ Keilhoff G และคณะ (ปี 2003) และ Stang F และคณะ (ปี 2005) ที่ใช้ Schwann cell บรรจุในท่อนำเส้นประสาทคอลลาเจนแล้วเชื่อมต่อเส้นประสาท

sciatic ที่มีระยะขาด 20 มม. ในหนู Wistar พบว่ามีการเจริญของเส้นประสาทมากกว่ากลุ่มที่ไม่มี Schwann cell

ในงานวิจัยที่ใช้ท่อนำเส้นประสาทแบบที่มีการควบคุมการปลดปล่อย พบว่ามีการศึกษาของ Lee A และคณะ (ปี 2003) ที่ใช้โปรตีน Fibrin ช่วยในการควบคุมการปลดปล่อย NGF ในท่อนำเส้นประสาทซิลิโคนที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ที่มีระยะขาด 13 มม. ในหนู Wistar พบว่าการเจริญของเส้นประสาทขึ้นกับขนาดของปริมาณ NGF ที่มากขึ้นและจำนวนเส้นใยประสาททั้งส่วนกลางและส่วนปลายที่เจริญภายในท่อนำเส้นประสาทไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ใช้เส้นประสาท sciatic มาเชื่อมต่อ และยังมีการศึกษาของ Xu X และคณะ (ปี 2003) ที่ใช้ออนุภาคขนาดเล็ก (Microsphere) ของ Poly(phosphoester) (PPE) ในการควบคุมการปลดปล่อย NGF ภายในท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตจาก PPE เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic ในหนู Wistar พบว่ากลุ่มที่ใช้ท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุ Microsphere จาก PPE ช่วยในการควบคุมการปลดปล่อย NGF มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นประสาทใหญ่กว่าและหนาแน่นกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้ Microsphere ที่ไม่มี NGF

ในส่วนของการใช้เจลาตินควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ภายในท่อนำเส้นประสาท ยังไม่พบข้อมูลแต่พบเพียงการศึกษาที่ใช้เจลาตินควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ในโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) ชนิดอื่น ดังในกรณีการศึกษาวิจัยของ Chen P. และคณะ ในปี 2005 ที่ใช้เจลาติน (ไม่ระบุชนิด) ควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์โดยการจับกันระหว่างโกรทแฟคเตอร์และเจลาติน โดยใช้สารเคมีช่วยในการเชื่อมขวาง ซึ่ง Scaffold จากเจลาตินที่ผสม Tricalcium phosphate ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ความเข้มข้น 1 % แล้วจึงนำมาเชื่อมขวางกับ NGF โดยใช้ 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) ซึ่งเป็นสารเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซีที่อยู่บนพื้นผิวของเจลาตินและหมู่เอมีนของ NGF โดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ การสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์จะช่วยปลดปล่อย NGF ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Differentiation) ของ PC12 cell (ใน *In vitro* ที่เวลา 7 วัน) ส่วนการปลดปล่อย NGF (ใช้เวลาดทดสอบ 2 เดือน) พบว่า NGF จะถูกปลดปล่อยออกมาแบบการแพร่ (Diffusion) ซึ่งปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกและหลังจากนั้นการปลดปล่อยจะเกิดจากการสลายตัวของพื้นผิว (Surface degradation) ของ Scaffold เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า เป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อย ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากกลูทาราลดีไฮด์ที่ใช้เชื่อมขวาง

ในงานวิจัยที่ใช้เจลาตินกับวิศวกรรมเนื้อเยื่ออื่นนอกเหนือจากเส้นประสาทพบการศึกษาของ Tabata Y และคณะ (ปี 1999) ที่ศึกษาการปลดปล่อย bFGF แบบ *In vitro* และการสลายตัวใน *In vivo* (Mice) ของ bFGF โดยใช้ Scaffold จากเจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ และนอกจากนี้ยังศึกษาการสร้างหลอดเลือดโดยประเมินจากการ

ตรวจวัด เม็ดเลือดแดงจากเนื้อเยื่อบริเวณรอบๆที่ฝัง Scaffold ภายในชั้นใต้ผิวหนังของหนู Mice จากการศึกษาคพบว่า bFGF ถูกปลดปล่อยออกมาจากเจลาตินชนิด B ได้ในวันแรกและหลังจากนั้น การปลดปล่อยจะค่อนข้างคงที่และเป็นปริมาณน้อยอาจเนื่องมาจากผลของการเกิดการจับกันของ ประจุระหว่าง bFGF และเจลาตินชนิด B โดยการปลดปล่อยของ bFGF ที่คงที่หลังจากวันแรกเกิด จากการสลายตัวของเจลาตินชนิด B ในส่วนของเจลาตินชนิด A นั้น bFGF จะถูกปลดปล่อย ออกมาเกือบ 100 % เลยในช่วงแรก โดยพบว่าการปลดปล่อยเป็นแบบการแพร่ธรรมดา เป็นดังนี้ เนื่องจากไม่เกิดการจับกันของประจุระหว่าง bFGF และเจลาตินชนิด A ในส่วนของการสลายตัว พบว่าเจลาตินชนิด B และเจลาตินชนิด A ซึ่งซึมซับ bFGF ที่มีปริมาณการดูดซับน้ำ (Water content) สูงจะมีการสลายตัวเร็วกว่า Scaffold ที่มีปริมาณการดูดซับน้ำต่ำและเมื่อศึกษาการเกิด หลอดเลือดใหม่พบว่า bFGF ที่ซึมซับด้วยเจลาตินชนิด B จะมีการสร้างหลอดเลือดในระยะเวลานี้ นานกว่าส่วน bFGF ที่ซึมซับด้วย เจลาตินชนิด A จะมีการสร้างหลอดเลือดช่วงต้นเนื่องจากมีการ ปลดปล่อย bFGF ออกมาเกือบทั้งหมดในช่วงต้น งานวิจัยเหล่านี้จะควบคุมการปลดปล่อยโกรท แฟคเตอร์จากเจลาตินโดยการเชื่อมขวางด้วยสารเคมีหรืออาจใช้คุณสมบัติของความแตกต่าง ระหว่างประจุในการช่วยควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ ในงานวิทยานิพนธ์นี้ต้องการ ใช้คุณสมบัติของความแตกต่างระหว่างประจุช่วยในการควบคุมการปลดปล่อย NGF (ประจุบวก) [Herrup, K. และ Shooter, E.M., 1993] จากเจลาตินชนิด B ซึ่งมีประจุลบ แต่ต้องการใช้คอลลา เจนและเจลาตินชนิด A ซึ่งมีประจุโดยรวมเป็นบวก [Tabata, Y. และคณะ, 1998a; 1998b; 1999; Young, S. และคณะ, 2005] เป็นกลุ่มควบคุมผลที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับเจลาตินชนิด B พบว่า ผลการศึกษาการเจริญของเส้นประสาทในหนู Wistar ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic เป็นเวลา 1 เดือน ในท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ให้ผลในการงอก ใหม่ของเส้นประสาท (สังเกตจากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์) ใกล้เคียงกันและสูงกว่าท่อนำ เส้นประสาท PLCL ที่บรรจุคอลลาเจนอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาการ ปลดปล่อย NGF จากโปรตีนตัวเต็มแบบฟองน้ำที่เจลาตินชนิด B มีการปลดปล่อย NGF ออกมา น้อยที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาการเจริญของเส้นประสาทในหนู Wistar ที่เจลาติน ชนิด B มีการงอกใหม่ของเส้นประสาทจำนวนมากแต่กรณีของเจลาตินชนิด A ที่ให้ผลดีในการงอก ของเส้นประสาทใกล้เคียงกับเจลาตินชนิด B อาจเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงประจุของเจลาติน ชนิด A ในระหว่างกระบวนการผลิตและขั้นตอนศึกษาโปรตีนตัวเต็มซึ่งอาจต้องทำการศึกษา เพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้พบว่าสามารถผลิตท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL สัดส่วน Lactide: caprolactone 75:25 จากความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายใน 1.6 มม. หนาประมาณ 0.3 มม. ซึ่งอยู่ในช่วงของขนาดที่ใช้ในงานศึกษาวิจัยหรือที่

จำหน่ายในทางการค้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในอยู่ในช่วง 1.5- 10 มม. และความหนาอยู่ในช่วง 0.1- 0.8 มม. และขนาดรูพรุนพื้นผิวภายนอกเฉลี่ยประมาณ 1 ไมครอน ซึ่งเป็นขนาดเล็กกว่าขนาดหลอดเลือด (8 ไมครอน) แต่อย่างไรก็ตามยังมีบางรูพรุนที่มีขนาดใหญ่กว่าซึ่งจากการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าหลอดเลือดสามารถเจริญเข้าสู่ภายในท่อได้ แต่ขณะเดียวกันรูพรุนขนาดเล็กนี้ก็เป็ประโยชน์ในการป้องกันเนื้อเยื่อพังผืดไม่ให้เจริญแทรกเข้ามาภายในท่อนำเส้นประสาทซึ่งทำให้ขัดขวางการเจริญของเส้นประสาทได้ ในด้านการสลายตัวพบว่าท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตขึ้นสลายตัวค่อนข้างช้าจึงควรมีการปรับสัดส่วนของ Lactide: caprolactone ให้สูงขึ้นเพื่อไม่ให้สลายตัวเร็วเกินไป และในส่วนของการศึกษาการเจริญของเส้นประสาทในท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุโปรตีนตัวเต็ม (ที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลสมาของก๊าซอาร์กอน) ซึ่งช่วยควบคุมการปลดปล่อย NGF พบว่าเส้นประสาทสามารถเจริญในท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุด้วยเจลาตินทั้งสองชนิดมากกว่าท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุคอลลาเจนอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนในการเจริญของเส้นประสาทควรศึกษาโดยใช้ระยะเวลาเพิ่มเติมขึ้น