บทที่ 1

บทนำ

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1 ที่มาของงานวิจัย

1.1.1 ประเทศไทยยังไม่มีการผลิตและการใช้ท่อนำเส้นประสาทสังเคราะห์ (Nerve conduit) เพื่อรักษาการบาดเจ็บของเส้นประสาทแบบขาดออกจากกัน (Neurotmesis) มีเพียงแต่การใช้เส้นประสาทจากตัวผู้ป่วยเอง (Autografts) ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการรักษากรณีเส้นประสาทขาดมาใช้เป็นท่อนำเส้นประสาท เพื่อให้เส้นประสาทเกิดการงอกใหม่ผ่าน Autografts และกลับคืนหน้าที่ตามเดิม [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539] แต่การใช้ Autografts มีข้อจำกัดหลายประการได้แก่ เนื้อเยื่อประสาทมีอยู่อย่างจำกัด, ความแตกต่างในโครงสร้างและขนาดของเส้นประสาทที่บาดเจ็บกับ Autografts ที่ใช้ และยังก่อให้เกิดความผิดปกติในการรับความรู้สึกในบริเวณที่ตัดเอา Autografts มาใช้ [ภานุพันธ์ ทรงเจริญ, 2539; Gregory D. , 2000]

1.1.2 Poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLCL) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable polymer) [Jeong S. และคณะ, 2004; Kwon K.และ Matsuda T., 2005; Xu C. และคณะ, 2004; Zhu Y. และคณะ, 2006; Zhu Y. และคณะ, 2007] อยู่ในระหว่างการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา แต่มีรายงานการวิจัยมากมายว่าไม่เป็นพิษและเข้ากับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) ได้ดีเช่น การศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์หลอดเลือดโดยใช้ Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), Smooth muscle cell (American type culture collection) และ Endothelial cell (Human coronary artery) [Kwon K.และ Matsuda T., 2005; Xu C. และคณะ, 2004] แต่เกิดปฏิกิริยาที่พึงประสงค์กับเซลล์ (Cell material interaction) เช่น การติดของเซลล์ ได้น้อยเนื่องจากขาดส่วนที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่พึงประสงค์ (Bioactive domain) นั่นคือ Arginine-glycine-aspartate (RGD) amino acid sequence [Zhu Y. และคณะ, 2006; Zhu Y. และคณะ, 2007] PLCL เป็นพอลิเมอร์ที่สลายตัวอย่างช้าๆ ดังกรณีการศึกษาโคพอลิเมอร์ของ PLCL อัตราส่วน Lactide : Caprolactone 50:50 เมื่อฝังในชั้นใต้ผิวหนัง Nude mice เป็นเวลา 15 สัปดาห์ เหลือมวลอยู่ประมาณ 81.3 % ซึ่งเป็นอัตราการสลายตัวที่ค่อนข้างช้า [Jeong S. และคณะ, 2004] นอกจากนี้ยังสามารถปรับความแข็งและความสามารถในการยืดได้โดยปรับสัดส่วนของโคพอลิเมอร์โดยถ้าส่วนของ Lactide สูงขึ้นในโคพอลิเมอร์จะทำให้โคพอลิเมอร์มีความเป็นผลึกและความทนต่อแรงดึง (Tensile strength) สูงขึ้น แสดงถึงว่ามีความแข็งสูงแต่มีความเปราะสูงกว่าและถ้าส่วนของ Caprolactone สูงขึ้นในโคพอลิเมอร์จะทำให้ค่าความทนต่อแรงดึงลดลงแสดงถึงว่ามีความแข็งน้อยกว่าแต่สามารถยืดได้ง่ายกว่า

[Lu XL. และคณะ, 2006] แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีการศึกษาการสลายตัวของโคพอลิเมอร์ PLCL อัตราส่วน Lactide : Caprolactone 75:25 ที่ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม ในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 พบว่ามีการสลายตัว 50 % ที่เวลา 6 เดือน [Burks CA. และคณะ, 2006] ในส่วนงานวิจัยที่ใช้ PLCL (ไม่ระบุสัดส่วน Lactide : Caprolactone ในโคพอลิเมอร์) เป็นท่อนำเส้นประสาทแบบกลวง โดยศึกษาในหนู Wistar พบว่าเข้ากับสิ่งมีชีวิตได้โดยไม่เป็นพิษและยังพบว่ามีการงอกของเส้นประสาทไม่แตกต่างจาก Autografts นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสลายตัวเกือบสมบูรณ์ที่เวลา 180 วันโดยการสังเกตด้วย Optical microscopy และ Electron microscopy [Nicoli N. และคณะ, 2000] คณะผู้วิจัยจึงสนใจจะศึกษาผลของท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL 75:25 โคพอลิเมอร์เพื่อให้เกิดการย่อยสลายตัวเร็วขึ้น

1.1.3 ในการศึกษานี้ต้องการบรรจุโปรตีนภายในท่อนำเส้นประสาทคือเจลาตินชนิด B เพื่อช่วยควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์คือ Nerve growth factor (NGF) ซึ่งมีรายงานพบว่าช่วยส่งเสริมการงอกใหม่ของเส้นประสาท [Gregory D., 2000; Yannas IV., 2001] โดยต้องการอาศัยสมบัติความแตกต่างระหว่างประจุ ในการศึกษานี้เลือกใช้เจลาตินชนิด B เนื่องจากเป็นอนุพันธ์ของคอลลาเจนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเส้นประสาท [Friess, W. 1998] และมีรายงานว่าเจลาตินชนิด B ซึ่งมีค่า Isoelectric point (pI) ประมาณ 5.0 และมีประจุโดยรวมเป็นลบเมื่ออยู่ในสภาวะ pH 7.4 สามารถใช้ดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ที่มีประจุตรงข้ามได้ [Tabata, Y. และคณะ, 1998ก; 1998ข; 1999; Young, S. และคณะ, 2005] ในกรณีของ NGF มีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 9.3 [Herrup, K. และ Shooter, E.M., 1993] มีประจุบวกเมื่ออยู่ในร่างกายซึ่งมี pH เท่ากับ 7.4 และยังมีงานวิจัยที่ใช้โปรตีนไฟโบรอินจากไหมซึ่งมีประจุลบช่วยควบคุมการปลดปล่อย NGF ที่มีประจุบวกสำหรับส่งเสริมการเจริญของเซลล์ประสาท [Uebersax, L. และคณะ, 2007] ในการศึกษานี้จึงต้องการใช้เจลาตินชนิด B บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาท PLCL เพื่อใช้ควบคุมการปลดปล่อย NGF โดยอาศัยสมบัติความแตกต่างระหว่างประจุ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของเส้นประสาทส่วนปลายโดยการประเมินการงอกของเส้นประสาทในระยะเวลาที่กำหนด

1.1.4 เนื่องจากโปรตีนที่บรรจุภายในท่อ (โปรตีนตัวเติม) ในที่นี้คือเจลาตินชนิด B สลายตัวเร็ว แต่ต้องการใช้สำหรับควบคุมการปลดปล่อย NGF ดังนั้นจึงต้องเชื่อมขวางเพื่อให้ควบคุมการปลดปล่อย NGF ได้ยาวนานขึ้น การศึกษานี้ได้เชื่อมขวางโปรตีนตัวเติมด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนที่อยู่ภายในท่อนำเส้นประสาทจำลอง Perfluoroalkoxy polymer (PFA) ก่อน เพื่อต้องการหาสภาวะการเชื่อมขวางของโปรตีนสำหรับนำข้อมูลไปใช้กับโปรตีนตัวเติมในท่อ PLCL ที่จะต้องทำการทดสอบสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่อไป สาเหตุที่ทำการเชื่อมขวางโดยวิธีนี้เนื่องจากไม่ต้องการให้ท่อ PLCL เสื่อมสภาพก่อนการใช้งานจากการเชื่อมขวาง

ด้วยวิธีการใช้ความร้อนสุญญากาศ (DHT) เนื่องจากความร้อนจะทำให้เกิดการหลอมเหลวของท่อ PLCL บางส่วนก่อนการใช้งานเพราะหากเชื่อมขวางโปรตีนตัวเติมที่บรรจุในท่อ PLCL โดยวิธี DHT จะมีผลทำให้ท่อเสียสภาพจากการเหลอมเหลวด้วยความร้อนเนื่องจาก Melting Temperature (T_m) ของ PLCL ประมาณ 132 องศาเซลเซียส หรือในกรณีการใช้สารเคมี เช่น กลูทาราลดีไฮด์ หรือ ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ต้องใช้น้ำเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเชื่อมขวาง ซึ่งน้ำจะทำให้เกิดการสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท PLCL ก่อนการใช้งาน โดยการสลายตัวสามารถเกิดได้ทั้งส่วนของ Caprolactone และส่วนของ Lactide โดยน้ำแทรกซึมเข้าสู่ส่วนอสัณฐานง่ายกว่ากรณีเป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากพอลิเมอร์ชนิดเดียว (Homopolymer) ของ Poly(Caprolactone) และ Poly(Lactic acid) [Jeong SI และคณะ, 2004] อีกทั้งการเชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์อาจมีการตกค้างของกลูทาราลดีไฮด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ [Ozeki M และ Tabata Y, 2005; Nagai N และคณะ, 2004] ดังนั้นจึงเลือกวิธีการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนสำหรับการเชื่อมขวางโปรตีนตัวเติมนการศึกษานี้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติท่อนำเส้นประสาทที่ผลิตจากโคพอลิเมอร์ของ Poly(L-lactide-co-caprolactone) อัตราส่วน Lactide : Caprolactone 75:25 (น้ำหนักโมเลกุล, M_w 300,000) และใช้โปรตีนตัวเติมได้แก่ คอลลาเจนและเจลาติน ซึ่งผ่านการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน สำหรับควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ของเส้นประสาท และศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการงอกใหม่ของเส้นประสาท

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ชนิด Nerve growth factor (NGF) และ (basic fibroblast growth factor (bFGF) จากโปรตีนตัวเติม ได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying) และเชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ (GA) ในหลอดทดลอง *(in vitro)* และวัดปริมาณของโกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยออกมาโดยใช้ ELISA kit

1.3.2 ศึกษาการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเติม (Filler) ได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B โดยใช้รังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนและหาระดับการเชื่อมขวางโดยใช้วิธีการ 2, 4, 6-ไตรไนโตรเบนซีนซัลโฟนิคแอซิด (TNBS)

1.3.3 ขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทจาก Poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLCL) โดยใช้วิธี Dip-coating และบรรจุโปรตีนตัวเติมภายในท่อ ได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาติน

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิด B ความเข้มข้น 0.8 %โดยน้ำหนัก และถูกเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน

1.3.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพของ PLCL ได้แก่ รูปร่างลักษณะและสมบัติเชิงกล

1.3.5 ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของ PLCL ได้แก่ ทดสอบสมบัติความเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังหนู (Biocompatibility) ในระดับห้องปฏิบัติการ, ศึกษาการสลายตัว (Biodegradability) ในสัตว์ทดลอง และทดสอบการงอกใหม่ของเส้นประสาทด้วยท่อนำเส้นประสาท PLCL บรรจุโปรตีนตัวเติมได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ความเข้มข้น 0.8 %โดยน้ำหนัก ที่ดูดซับโกรทแฟคเตอร์ คือ NGF ในหนูทดลอง