บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

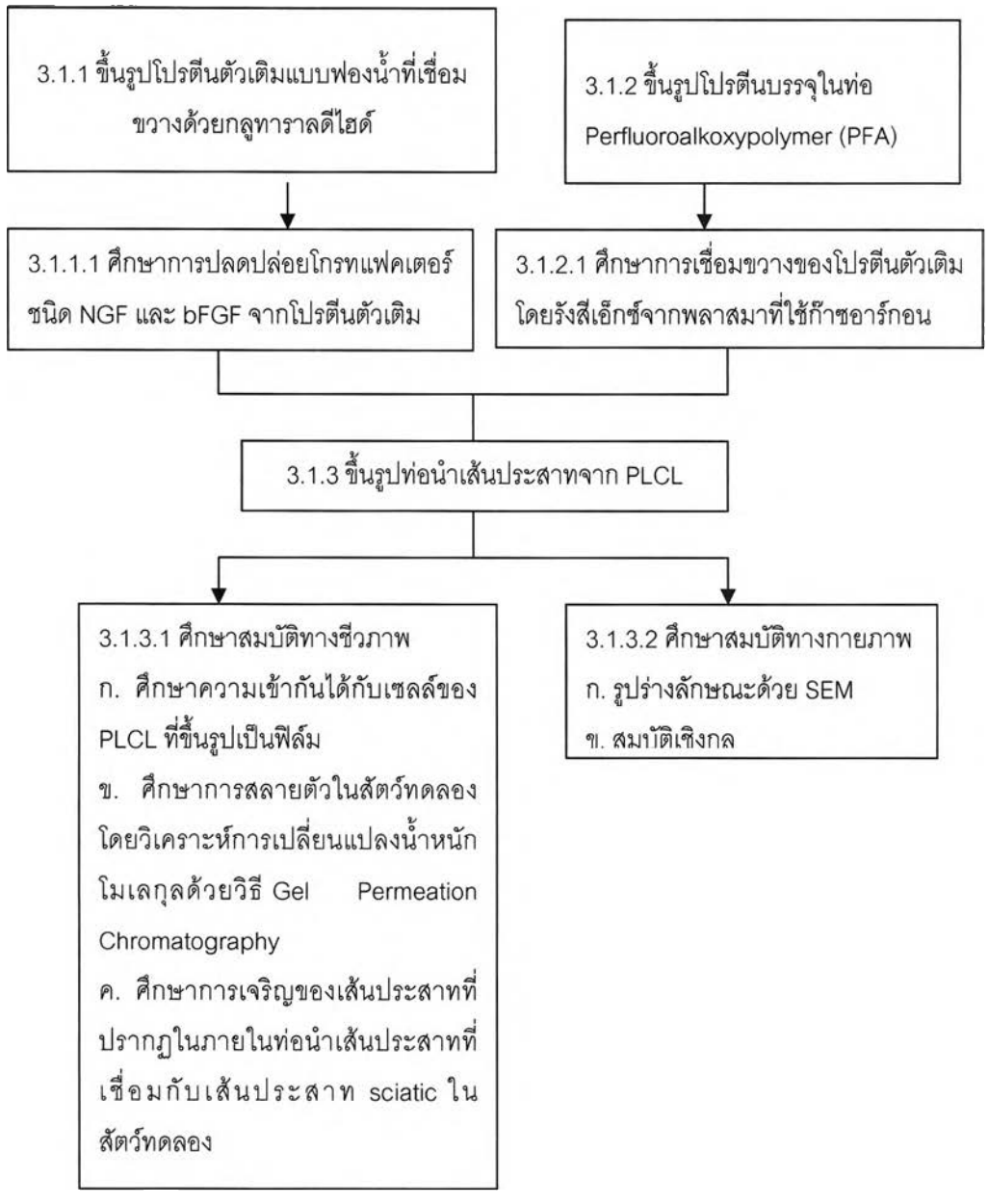
งานวิจัยประกอบด้วย 3 ส่วนหลักคือ

ก) การศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีนตัวเติม

ข) การศึกษาการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเติมโดยใช้รังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของอาร์กอน

ค) การผลิตและทดสอบท่อนำเส้นประสาทแบบบรรจุโปรตีนตัวเติมเพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพ, สมบัติทางชีวภาพ, ความเข้ากันได้ของวัสดุผลิตท่อนำเส้นประสาทกับเซลล์ผิวหนังหนูและการเจริญของเส้นประสาทในสัตว์ทดลอง

แผนการดำเนินงานวิจัยสามารถแสดงเป็นแผนผังดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินการวิจัย

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ก) สารเคมี

- เจลาตินชนิด A (300 bloom, pI 9, food grade, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- เจลาตินชนิด B (300 bloom, pI 5, food grade, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- สารละลายคอลลาเจน 0.3%w/w ในกรดไฮโดรคลอริก pH 3 (Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- poly(L-lactide-co-caprolactone) 75:25 copolymer (Absorbable polymer, Japan)
- น้ำกลั่น (double-distilled water)
- 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (nacalai tesque, Japan)
- beta-Alanine (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)
- Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$ 99%, Fluka, Buchs, Germany)
- Glycine ultrapure (Usb Corporation , USA)
- Mouse skin fibroblasts (L929 or murine fibroblasts)
- Dulbecco's modified eagle medium, DMEM (10%medium + L-glutamine + AB, Hyclone, Utah, USA)
- Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with EDTA•Na, Gibco BRL, Canada)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (USB corporation, Cleveland, OH, USA)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen Corp., Paisley, UK)
- Dimethylsulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, Germany)
- Hydrochloric acid (HCl 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, USA)
- Ethanol (99.7-100%, VWR International Ltd., Poole Dorset, United Kingdom)
- Glutaraldehyde (Ajax Finechem, Newzealand)
- Sodium chloride (Usb corporation, USA)
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Merck, Darmstadt, Germany)
- Sodium phosphate dibasic heptahydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, Sigma Co., St. Louis, USA)
- Acetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Beta nerve growth factor recombinant human (R&D Systems, USA)

- Recombinant human basic fibroblast growth factor (Chemicon International, USA)

ข) อุปกรณ์

- ตู้อบสุญญากาศ (Vacuum drying oven and pump) รุ่น VD23 ของ บริษัท Binder ประเทศเยอรมัน
- Universal Testing Machine (No. 5567, Instron, USA)
- Perfluoroalkoxy polymer (NICHIAS Corporation, Japan)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digit balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (5-digit balance) รุ่น AE 240 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- แท่งกวนแม่เหล็กและแผ่นให้ความร้อน (Magnetic stirrer/hot plate) รุ่น RCT Basic ของบริษัท Ika labortechnik, Germany
- เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave) รุ่น HVE 25/50 ของบริษัท Hirayama, Japan
- เครื่อง 2.3 kJ Plasma focus (แบบ UNU/ICTP)
- เครื่องทำความเย็น -40°C รุ่น Heto, PowerDry LL3000 ประเทศอเมริกา
- Lyophilizer รุ่น Heto, PowerDry LL3000 ประเทศอเมริกา
- Fine coat (JFC-1100E, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
- Scanning Electron Microscopy (JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
- Laminar Flow (Safe/Maxi Safe 2010,Holten, USA)
- CO_2 incubator (New Brunwick Scientific, Innova CO170, USA)
- Polystyrene tissue culture discs (NUNC, Denmark)
- 24-well polystyrene tissue culture plates (NUNC, Denmark)
- Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
- กระดาษไม่มีขุย
- โถดูดความชื้น (Desiccators, SR Lab, Thailand)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath,1235 PC, Shel-Lab)
- กล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast microscope)
- Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)
- Laminar flow hood (BH 18, Labcaire)

- Spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning)
- Microplate reader (New Brunwick Scientific, Innova CO170, USA)
- เครื่องฉายรังสี Gammacell 220 Excel (MDS Nordion, Canada)
- เครื่องอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (SteriVac™gas sterilizer, 3M, USA)
- ชุดตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Nerve growth factor (NGF E_{max}® ImmunoAssay System, Promega, USA)
- ชุดตรวจวิเคราะห์ปริมาณ basic fibroblast growth factor (Quantikine®, R&D Systems, USA)
- เครื่อง Gel Permeation Chromatography (Waters 600 Controller,USA)
- เครื่อง Halothane vol 19.3 (บริษัท Dragenwerk AG,เยอรมัน)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การขึ้นรูปโปรตีนตัวเติมแบบฟองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์

โปรตีนแบบฟองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์เตรียมขึ้นสำหรับการใช้ศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ เนื่องจากการเชื่อมขวางโดยกลูทาราลดีไฮด์จะให้ระดับการเชื่อมขวางที่สูงดังนั้นการสลายตัวจึงเกิดช้าเพื่อมุ่งหวังใช้ศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีนตัวเติมแต่ละชนิด โดยการขึ้นรูปโปรตีนแบบฟองน้ำ (Sponge) จากไฮโดรเจลตามแบบวิธีของ M. Yamamoto และคณะ (2003) ใช้โปรตีนดังต่อไปนี้คือ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก พร้อมกับเชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์ 0.65% ของน้ำหนักของโปรตีน สำหรับการใช้ความเข้มข้นของโปรตีนตัวเติม 5% โดยน้ำหนักใช้ความเข้มข้นตามการเตรียมโปรตีนสำหรับดูดซับโกรทแฟคเตอร์ตามแบบวิธี Y. Tabata และคณะ (1998) เนื่องจากเกิดปัญหาเมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนตัวเติมที่ 0.8% โดยน้ำหนักภายหลังฆ่าเชื้อด้วยการอบเอทิลีนออกไซด์แล้วพบว่าโปรตีนแบบฟองน้ำเสียรูปจึงทำการศึกษาดังกล่าวนี้โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีน 5% โดยน้ำหนัก ซึ่งแม้มีการหดตัวหลังจากฆ่าเชื้อแต่สามารถพองตัวดังเดิมเมื่อแช่ในสารละลาย PBS pH 7.4

การทดลองนี้มีขั้นตอนการเตรียมโดยสังเขปคือ

(1) เตรียมสารละลายเจลาตินทั้งชนิด A และ B ในน้ำกลั่นให้ได้ 5 %โดยน้ำหนัก และเตรียมสารละลายกลูทาราลดีไฮด์ 2.5% โดยน้ำหนัก ขั้นตอนการละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะตั้งบนอุปกรณ์แท่นให้ความร้อนที่มีระบบปั่นกวนด้วยแม่เหล็ก โดยแช่เจลาตินปั่นกวนไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงหลังจากนั้นปรับอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส ปั่นกวนจนได้สารละลายใส และหยุดปั่นกวนแต่ตั้งไว้บนอุปกรณ์ต่อโดยให้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ฟองอากาศ กรณีของคอลลาเจนเตรียมโดยใช้ขั้นตอนเช่นเดียวกันแต่ต่างกันที่คอลลาเจนที่ใช้จะนำมาจากสารละลายคอลลาเจน 0.5 % ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งแล้วจึงนำมาละลายในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์

(2) คำนวณปริมาณสารละลายกลูทาราลดีไฮด์ให้ได้ 0.65% ของน้ำหนักโปรตีน และค่อยๆหยดลงไปในสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้พร้อมกับปั่นกวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เวลาประมาณ 5 นาที (ขณะปั่นกวนให้ห่อภาชนะที่บรรจุสารละลายด้วยกระดาษฟลอยด์)

(3) ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายใส่ถาดเทฟลอนโดยให้มีความหนาของเนื้อสารละลาย 2 มิลลิเมตร แล้วปิดถาดเทฟลอนด้วยกระดาษฟลอยด์และนำไปให้ความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

(4) ล้างกลูทาราลดีไฮด์ส่วนเกินออกด้วยแช่ตัวอย่างในสารละลายไกลซีนเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นวันละ 5 ครั้งทุก 3

ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วันหลังจากนั้นนำตัวอย่างมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส และทำให้แห้งด้วยกระบวนการแห้งเยือกแข็งที่ -50 องศาเซลเซียส และนำไปใช้สำหรับศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ในหัวข้อ 3.3.1.1

3.3.1.1 **การศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีน**

ก) นำโปรตีนที่ขึ้นรูปโดยวิธีในข้อ 3.3.1 มาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าน้ำหนัก 2 มิลลิกรัม และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการอบก๊าซเอทิลินออกไซด์ (n=3) และนำมาดูดซับโกรทแฟคเตอร์แบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ NGF และ bFGF 100 นาโนกรัม ในสารละลาย PBS pH 7.4 / 0.1% Bovine serum albumin (BSA) 10 ไมโครลิตร ภายในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์ขนาด 1 มิลลิลิตร โดยตั้งทิ้งไว้ (ประมาณ 2 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

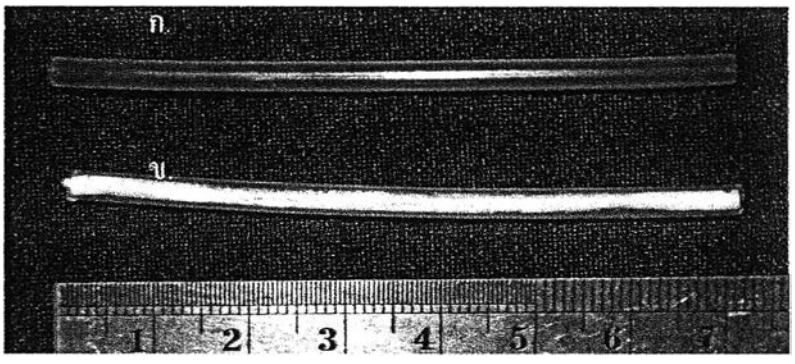
ข) ย้ายโปรตีนตัวเติมที่ดูดซับโกรทแฟคเตอร์ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์อันใหม่ขนาด 1 มิลลิลิตร และใส่สารละลาย PBS pH 7.4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และทำการบ่มไว้ที่ตู้อบควบคุมอุณหภูมิโดยตั้งอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างสารละลาย 0.5 มิลลิตรและใส่สารละลาย PBS pH 7.4 ใหม่กลับคืนลงไป 0.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 3 วัน, 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วันตามลำดับ

ค) เก็บสารละลายตัวอย่างที่ได้มาแช่แข็งเพื่อรักษาสภาพไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รอจนเก็บสารละลายตัวอย่างครบทุกช่วงเวลาแล้วนำมาตรวจสอบหาปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้ชุดตรวจสอบโกรทแฟคเตอร์ที่จำเพาะ โดยใช้วิธี Enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA) ดังคำอธิบายในภาคผนวก ก

3.3.2 **การขึ้นรูปโปรตีนบรรจุในท่อนำเส้นประสาท** PFA

การขึ้นรูปโปรตีนในท่อนำเส้นประสาทจำลอง Perfluoroalkoxypolymer (PFA) นั้นเพื่อใช้ศึกษาการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนสำหรับใช้กับโปรตีนที่บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาท PLCL ต่อไปและสาเหตุที่ไม่ใช้การเชื่อมขวางด้วยการใช้สารเคมีเช่น กลูทาราลดีไฮด์ เนื่องจากมีการใช้น้ำเข้าร่วมในการทำปฏิกิริยาดังนั้นอาจทำให้เกิดการสลายตัวของท่อ PLCL ก่อนการใช้งานจริง ส่วนสาเหตุที่ไม่ใช้การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment, DHT) กับท่อ PLCL เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงก่อให้เกิดการสลายตัวของท่อ PLCL ด้วยความร้อน แต่การเชื่อมขวางด้วย DHT ใช้สำหรับโปรตีนตัวเติมในท่อ PFA เท่านั้นเพื่อเปรียบเทียบระดับการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของอาร์กอน ดังนั้นการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเติมบรรจุในท่อ PLCL จะใช้รังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของอาร์กอนเท่านั้น สำหรับโปรตีน 3 ชนิดที่ใช้ศึกษา ได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B โดยกรณีของเจลาตินทั้งสองชนิด

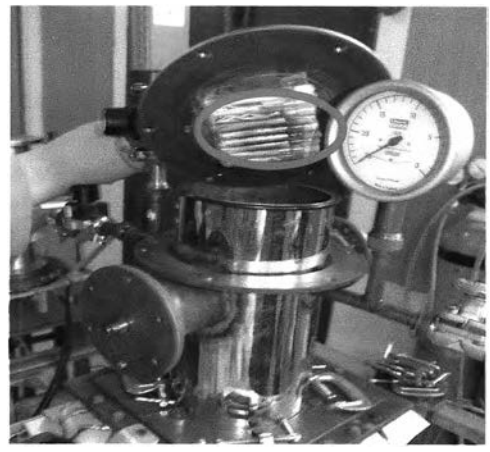
ละลายเจลาตินลงในน้ำกลั่น pH 7.0 ได้ความเข้มข้น 0.8% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเมื่อละลายแล้วตั้งทิ้งอีกประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อไล่ฟองอากาศที่เหลืออยู่และนำไปบรรจุภายในท่อนำเส้นประสาทจำลอง PFA ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.2 ก.) และปิดด้วยพาราฟิล์มเพื่อกันการรั่ว ส่วนกรณีคอลลาเจนเตรียมโดยใช้คอลลาเจนในสารละลายกรดไฮโดรคลอริค pH 3 ที่มีความเข้มข้น 0.3 %โดยน้ำหนัก มาทำแห้งเยือกแข็ง แล้วนำมาละลายในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้น 0.8% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายแต่ละชนิดไปบรรจุภายให้เต็มในท่อ PFA และปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงแกะพาราฟิล์มออกและนำไปเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ตัวอย่างดังรูป 3.2 ข. และนำไปศึกษาการเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมา ตามหัวข้อ 3.3.2.1



รูปที่ 3.2 ก. ท่อ PFA ข. ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นในท่อ PFA

3.3.2.1 ศึกษาการเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกเกี่ยวกับการเชื่อมขวางโปรตีนโดยการใช้รังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน การเชื่อมขวางทำโดยนำตัวอย่างจากข้อ 3.3.2 ที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วออกจากท่อ PFA แล้วนำไปเชื่อมขวางโดยใช้เครื่อง Plasma focus (United Nation University/ International Center for Theoretical Physics) ที่ 12.5 กิโลโวลต์และใช้ก๊าซอาร์กอนความดัน 0.55, 1.0 และ 1.5 มิลลิบาร์ ตามลำดับ ที่ 1,3, 5 และ 7 พัลส์ โดยนำตัวอย่างใส่ภายในถุงพลาสติกปิดสนิทซึ่งทำการเจาะรูขนาดเล็กที่มุมถุงเพื่อไม่ให้ภายในถุงเกิดสภาวะสุญญากาศและบีบอัดทำให้ตัวอย่างเสียรูปและนอกจากนี้ยังป้องกันการปนเปื้อนตัวอย่างจากไอออนที่เกิดในขั้นตอนการเชื่อมขวางด้วย หลังจากนั้นนำถุงที่บรรจุตัวอย่างไปติดบริเวณเครื่อง Plasma focus ดังรูปที่ 3.3

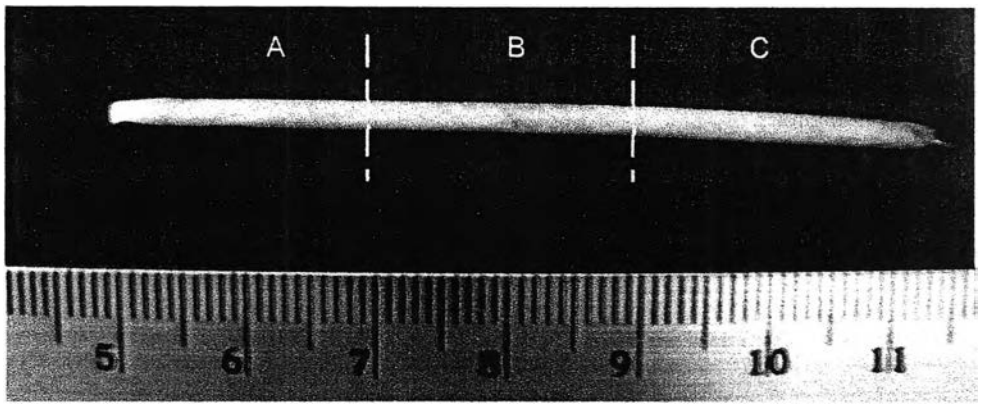


รูปที่ 3.3 ตำแหน่งที่ติดตัวอย่าง (ในวงรีสีน้ำตาล) ใน Plasma focus tube

เมื่อปฏิบัติการเสร็จแล้วนำมาตรวจสอบระดับการเชื่อมขวางโดยวิธีการ 2,4,6-ไตรไนโตรเบนซีนซัลโฟนิคแอซิด (TNBS) โดยใช้การคำนวณในสมการที่ (3.1) โดยนำผลการเชื่อมขวางมาเปรียบเทียบกับการเชื่อมขวางแบบ DHT ซึ่งทำโดยการนำท่อนำเส้นประสาทจำลองใส่ในตู้อบสุญญากาศ (Vacuum oven, VD23 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน) ที่ความดัน 0 มิลลิบาร์ โดยคอลลาเจนใช้อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนเจลาตินชนิด A ชนิด และชนิด B ใช้อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ M. Ozeki และ Y. Tabata (2005)

$$\text{ระดับการเชื่อมขวาง (Degree of Cross-linking)} = \left(1 - \frac{\text{ปริมาณกรดอะมิโนอิสระหลังการเชื่อมขวาง}}{\text{ปริมาณกรดอะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวาง}}\right) \times 100 \qquad (3.1)$$

การวัดระดับการเชื่อมขวางดัดแปลงมาจากวิธีของ N. Nagai และคณะ (2004) ซึ่งวัดได้โดยใช้ 2, 4, 6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) โดยทำการศึกษาจากการดูดซับค่า absorbance โดยทำการเปรียบเทียบตัวอย่าง 2 ชนิด คือ ตัวอย่างที่ผ่านการเชื่อมขวางและตัวอย่างที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง ซึ่งสามารถคำนวณหาระดับการเชื่อมขวางได้จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลง วิธี TNBS สามารถบ่งบอกถึงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระหรือ $-NH_2$ ในโมเลกุล เนื่องจากหมู่ $-NH_2$ เป็นองค์ประกอบที่พบในเจลาตินและคอลลาเจนซึ่งถ้าปริมาณหมู่อะมิโนในโครงเลี้ยงเซลล์หลังจากการเชื่อมขวางเหลือต่ำลงแสดงว่าเกิดการเชื่อมขวางภายในโปรตีนตัวเติมสูงขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่เตรียมจากสาร β-alanine โดยแสดงวิธีการหาการเชื่อมขวางจากวิธี TNBS และกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ข



รูปที่ 3.4 การตัดตัวอย่างโปรตีนตัวเติมที่ได้จากท่อ PFA เป็น 3 ส่วนคือ A, B และ C เพื่อใช้หาความสม่ำเสมอของระดับการเชื่อมขวางในตัวอย่างชิ้นเดียวกัน

วิเคราะห์ผลโดยประมาณระดับการเชื่อมขวางมีการตัดตัวอย่างเป็น 3 ท่อนคือ A, B และ C โดย มีความยาวท่อนละประมาณ 2 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.4 แล้วนำมาตรวจสอบระดับการเชื่อมขวาง

3.3.3 การขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL

ขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทสำหรับใช้ศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ จากสารละลาย PLCL ใน 1,4-dioxane 3 และ 4 % โดยน้ำหนัก ที่ปั่นกวนด้วยแท่งกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 4 วันโดยวิธี Dip-coating วิธีการคือ ใช้แม่พิมพ์จากท่อ PFA ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 2 มิลลิเมตรที่แช่ไนโตรเจนเหลว 30 วินาที ก่อน (Pre-freeze) จุ่มลงในสารละลาย PLCL เปรียบเทียบกับไม่จุ่มลงไนโตรเจนเหลวก่อน (Non per-freeze) และนำขึ้นจากสารละลายพร้อมกับตั้งแม่พิมพ์ให้ตรงจนกระทั่งสารละลายที่เคลือบติดแม่พิมพ์ มีลักษณะสม่ำเสมอ จึงจุ่มลงไนโตรเจนเหลว อีกครั้ง 30 วินาที แล้วนำเก็บใส่หลอดทดลองฝาเกลียวและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จึงนำมาทำแห้งเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -55 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

3.3.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของท่อนำเส้นประสาท PLCL

เมื่อขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทจากสารละลาย PLCL ใน 1, 4-dioxane เข้มข้น 3 และ 4 % โดยน้ำหนัก แล้วจึงเปรียบเทียบความเหมาะสมระหว่างท่อนำเส้นประสาทที่เตรียมจากสารละลาย PLCL ใน 1,4-dioxane เข้มข้น 3 และ 4 % โดยน้ำหนัก เพื่อเลือกใช้สำหรับศึกษาสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางชีวภาพ เมื่อเลือกความเข้มข้นของ PLCL ได้แล้วจะทำการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทโดยใช้ความเข้มข้นนั้นและเตรียมการดังนี้คือ เตรียมท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุโปรตีนได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ตามวิธีการเดียวกับ 3.3.2.1. และ

เชื่อมขวางโปรตีนที่อยู่ภายในท่อ PLCL ด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนโดยเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมแล้วทำการตรวจวัดดังต่อไปนี้

ก. ลักษณะพื้นผิวโดยรวมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM) ด้วยเครื่อง Joel JSM 5400 ที่มีความต่างศักย์ 12-15 kV ทำการเคลือบทองโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย Ion sputtering device, JFC 1100 ซึ่งพิจารณาลักษณะพื้นผิวโดยใช้ใบมีดโกนตัดท่อนำเส้นประสาทในแนวตัดขวาง (cross-section) และดูพื้นผิวด้านในและนอกรวมทั้งด้านที่ตัดแนวขวาง

ข. ขนาดของรูพรุนของท่อนำเส้นประสาท PLCL และโปรตีนตัวเติม

การหาขนาดของรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ HW. Kang โดยวัดขนาดของรูพรุนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแบบสุ่ม 200 รู ในแนวราบ (horizontal) และแนวตัดขวาง (cross-section) จากนั้นนำขนาดของรูพรุนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย [Kang, HW. และคณะ, 1999]

ค. สมบัติเชิงกลของท่อนำส้นประสาท PLCL

ศึกษาสมบัติทางกลด้วยเครื่อง INSTRON 5567 Universal Mechanical Testing machine บริษัท CALIBRATION LABORATORY, สหรัฐอเมริกา โดยใช้สภาวะดังนี้คือ อัตราที่ใช้ดึง 2 มิลลิเมตรต่อนาที, แรงดึง 1 กิโลนิวตัน โดยจะตัดท่อนำเส้นประสาทยาว 20 มิลลิเมตรและจับยึดส่วนปลายทั้งสองของท่อนำเส้นประสาทกับหัวจับของตัวเครื่อง INSTRON ด้านละ 5 มิลลิเมตร ตัวอย่างจะแบ่งเป็น 2 การทดสอบคือดึงแบบแห้งและแบบเปียกซึ่งแบบเปียกจะแช่ในสารละลาย PBS pH 7.4 เป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการทดสอบแปรผลโดยหาค่าความทนแรงดึง (Tensile strength), โมดูลัสของความยืดหยุ่น (Elastic modulus) และเปอร์เซนต์ความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด (% Elongation at break) แสดงข้อมูลในภาคผนวก ง

ง. เปรียบเทียบระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเติมในท่อนำเส้นประสาทจำลอง PFA และโปรตีนตัวเติมในท่อนำเส้นประสาท PLCL

3.3.5 ศึกษาสมบัติทางชีวภาพของท่อนำเส้นประสาท PLCL และวัสดุ PLCL

ก. ความเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังหนู

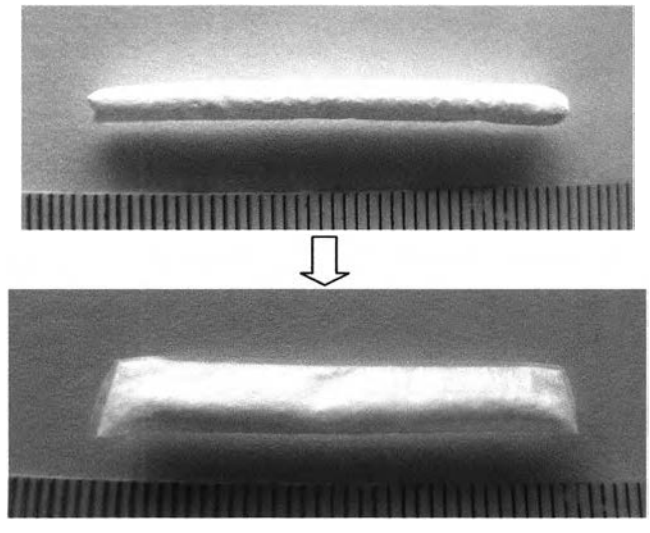
เป็นการศึกษาว่าวัสดุ PLCL มีความเข้ากันได้กับเซลล์โดยใช้เซลล์ไลน์มาตรฐานของผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblast) ในสภาพภายนอกร่างกาย (*in vitro* biocompatibility) โดยการขึ้นรูปฟิล์ม PLCL จากสารละลาย PLCL 0.3 และ 3 % โดยน้ำหนัก ใน 1,4-dioxane 200 ไมโครลิตรหยดลงบนแผ่นปิดสไลด์แก้ว (cover slip) เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร แล้วเอียงให้เกิดฟิล์มบางอย่างทั่วถึงและปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง 24 ชั่วโมงใน Laminar flow hood และนำไปเข้า

ตู้อบสุญญากาศเพื่อให้แน่ใจว่าสาร 1,4-dioxane ระเหยหมด หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (ดูภาคผนวก ค) และเตรียมนำไปใช้สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังหนูตามหัวข้อ 3.3.6 ก

ความเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังหนูของวัสดุ PLCL ประเมินได้จากการยึดเกาะของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยถ่ายเซลล์ลงไป 20,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง โดยใช้ฟิล์มของสารละลาย PLCL 0.3 และ 3 % โดยน้ำหนักเป็นกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับสารละลาย Zinc sulphate 0.3 % โดยน้ำหนักเคลือบผิวหน้ากระจกปิดสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้งจะใช้เป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) กลุ่มนี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ตามที่อ้างจากมาตรฐาน ISO 10993-5 และใช้แผ่นปิดสไลด์เปล่าเป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) โดยวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่เวลา 5, 24, และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งจะวัดกิจกรรมของเซลล์ที่มีชีวิต โดยดัดแปลงวิธีของ H. Liu [Liu, H. และคณะ, 2004] ซึ่งวิธีการเตรียมและการคำนวณแสดงในภาคผนวก จ

ข. การสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท PLCL ในสัตว์ทดลอง

ท่อนำเส้นประสาท PLCL กลวง 3% โดยน้ำหนัก ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักแล้วนำมาใส่ในถุง Polypropylene แล้วปิดด้วยเครื่องปิดผนึกถุงดังรูปที่ 3.5 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์ก่อนนำไปฝังในใต้ผิวหนังหนู Wistar น้ำหนัก 200 กรัม



รูปที่ 3.5 แสดงภาพท่อนำเส้นประสาทบรรจุในถุง Polyprolylene ก่อนการฝังในสัตว์ทดลอง

โดยวิธีดมยาสลบด้วยยา Halothane (4% ร่วมกับก๊าซออกซิเจนสำหรับเหนี่ยวนำให้สลบและ 2% ร่วมกับก๊าซออกซิเจนสำหรับให้สลบต่อเนื่องระหว่างผ่าตัด) และทำการผ่าหนูเพื่อเก็บตัวอย่างที่เวลา 2, 4 และ8 สัปดาห์ แล้วล้างด้วย 0.9 %Normal saline solution และทำให้แห้งโดยวิธีแห้ง

เยื่อกแข็ง ก่อนนำมาตรวจดูรูปร่างลักษณะด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของ PLCL ด้วยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) (ดูรูปกราฟจากภาคผนวก ฉ) ซึ่งทำการวิเคราะห์ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยเครื่อง Waters 600 Controller โดยใช้ Tetrahydrofluran (THF) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในคอลัมน์ Spyragel® ซึ่งบรรจุโคพอลิมอร์ Stylene-divinylbenzene โดยใช้อัตราเร็วในการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุลจะพิจารณาจากค่า Polydispersity index (PDI) ซึ่งคำนวณมาจาก Weight average molecular weight (M_w) หารด้วย Number average molecular weight (M_n) ซึ่งมาจากสมการ 3.2 A) และ B) โดยทั้งค่า PDI, M_w และ M_n เครื่องวิเคราะห์จะทำการคำนวณให้

A)

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \qquad (3.2)$$

B)

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

สมการ (3.7) แสดงการ A) M_n และ B) M_w โดย N_i คือ จำนวนของสายพอลิเมอร์ขนาด i และ M_i = น้ำหนักโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ขนาด i

ค. การทดสอบการเจริญของเส้นประสาทในท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบมีโปรตีนตัวเติมในสัตว์ทดลอง

ท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุด้วยโปรตีน คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด Bที่เชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 3.3.2.1 และฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา (โดยเครื่อง Gammacell 220 Excel, บริษัท MDS Nordion, แคนาดา) ที่ความแรงรังสี 13779 คูลี 0.16 kGy/นาที อุณหภูมิประมาณ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 138 นาที และหลังจากนั้นนำมาดูดซับโกรทแฟคเตอร์ชนิด NGF เข้มข้น 10 ng/µl (โดยปริมาณ NGF ที่ถูกดูดซับโดยประมาณ คือ 440 ng ซึ่งคิดจากปริมาตรส่วนกลวงภายในท่อนำเส้นประสาท) โดยดูดซับนาน 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar โดยการทดสอบในสัตว์ทดลองได้ขออนุญาตจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใบอนุญาตเลขที่ วจ/ศท 001/50 และได้ปฏิบัติ

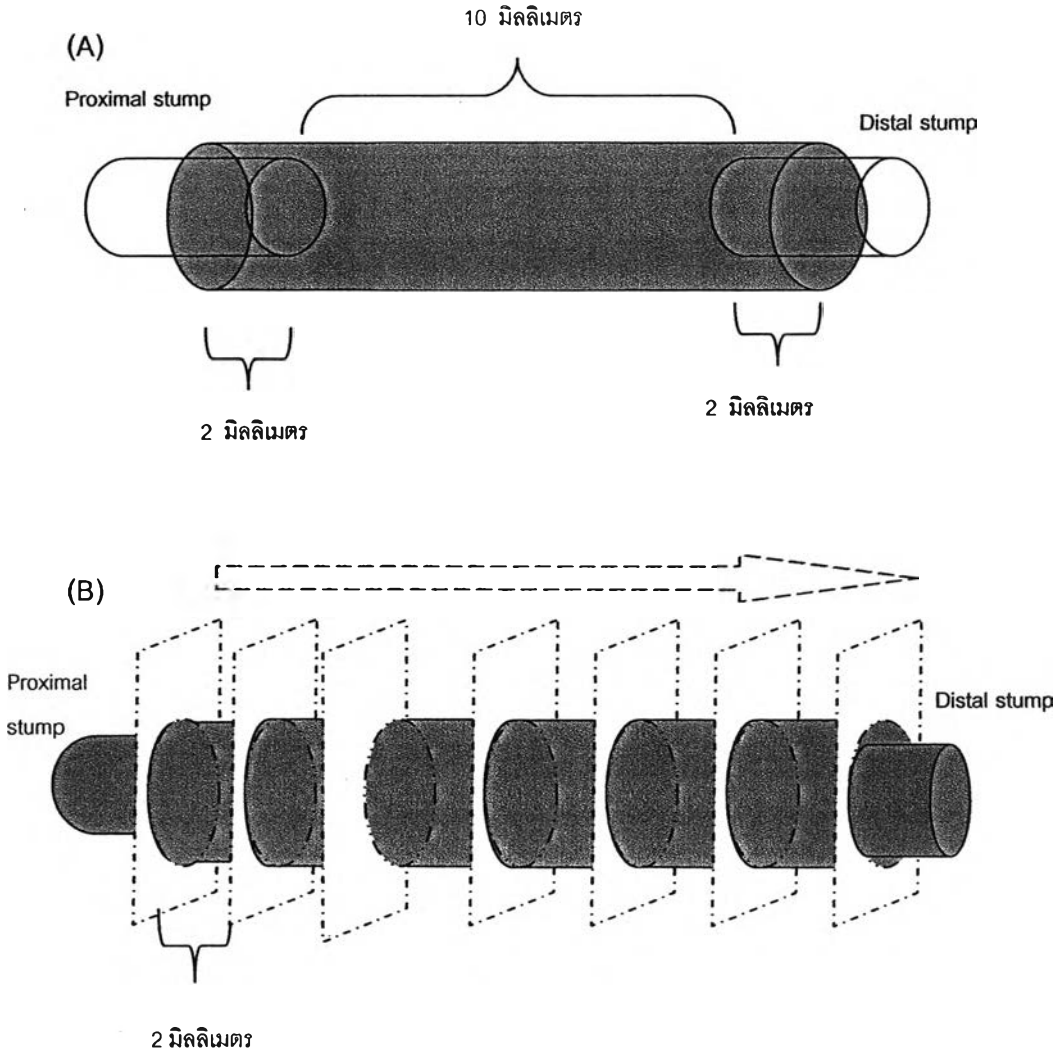
อย่างเคร่งครัดตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสภาวิจัยแห่งชาติ (ดูแบบอนุมัติในภาคผนวก ช) ขั้นตอนการผ่าตัดปฏิบัติดังนี้คือ

(1) การผ่าตัดเพื่อเชื่อมต่อเส้นประสาทด้วยท่อนำเส้นประสาท PLCL

นำหนู Wistar มาดมยาสลบ Halothane (4% ร่วมกับก๊าซออกซิเจนสำหรับเหนี่ยวนำให้สลบและ 2% ร่วมกับก๊าซออกซิเจนสำหรับให้สลบต่อเนื่องระหว่างผ่าตัด) เมื่อสลบเต็มที่แล้ว (ตรวจสอบโดย วิธี Pinch test ด้วยการหยิกบริเวณกลางฝ่าเท้า ถ้าหนูไม่ตอบสนองถือว่าสลบเต็มที่) จึงผ่าเปิดผิวหนังบริเวณกึ่งกลางต้นขาหลังด้านซ้ายและแหวกกล้ามเนื้อออกไปสองข้างเพื่อเข้าถึงเส้นประสาท sciatic และตัดเส้นประสาท sciatic บริเวณกึ่งกลางของกระดูกต้นขา (Femur) โดยมีระยะระหว่างปลายขาด (gap) 10 มิลลิเมตรและเย็บเชื่อมต่อปลายเส้นประสาททั้งสองข้างกับท่อนำเส้นประสาท PLCL จากนั้นจึงเย็บปิดแผลและนำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองชั้น 4 ตึกสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) การผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอย่างท่อนำเส้นประสาท PLCL

ภายหลังจาก 1 เดือน จะเก็บท่อนำเส้นประสาทที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic จากหนู Wistar โดยนำหนูมาดมยาสลบ Halothane (4% ร่วมกับก๊าซออกซิเจนสำหรับเหนี่ยวนำให้สลบเต็มที่) หลังจากนั้นผ่าเปิดหน้าอกแล้วเสียบเข็มที่ต่อกับเครื่อง Perfusion (Watson Marlow, SciQ 400, เยอรมัน) ซึ่งพร้อมจะปล่อย normal saline (ที่เติม Heparin ความเข้มข้น 1:5000 ในอัตราส่วน 3 มิลลิลิตร/1000 มิลลิลิตร) เข้าสู่หัวใจห้องล่างซ้ายหลังจากนั้นตัดหัวใจห้องบนขวาเพื่อให้เลือดออกจากร่างกายพร้อมกับแทนที่เลือดด้วย normal saline โดยใช้เครื่อง Perfusion เป็นตัวส่งสารละลายปริมาณ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเปลี่ยนสารละลายเป็น Para-formaldehyde 4% ใน PBS 0.1 M pH 7.4 ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Perfusion เช่นเดิม เพื่อให้เนื้อเยื่อเส้นประสาทคงสภาพและง่ายต่อการผ่าตัดนำออกมา หลังจากนั้นนำหนูมาผ่าเปิดผิวหนังบริเวณกึ่งกลางต้นขาหลังด้านซ้ายและแหวกกล้ามเนื้อออกไปสองข้างเพื่อเข้าถึงเส้นประสาท sciatic และตัดเส้นประสาท sciatic ตั้งแต่เหนือบริเวณที่เชื่อมต่อกับท่อนำเส้นประสาท PLCL (รูป 3.6 (A)) เพื่อนำมาลังเกตการเจริญของเส้นประสาทที่งอกใหม่รวมถึงเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นใหม่ภายในท่อนำเส้นประสาท PLCL โดยตัดเป็นท่อนสั้นๆ ยาวท่อนละประมาณ 2 มิลลิเมตร (รูป 3.6 (B)) และนำมาผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาการเจริญของเส้นประสาทด้วยกล้องจุลทรรศน์และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี p-Phenylenediamine ซึ่งอธิบายตามภาคผนวก ฌ



รูปที่ 3.6 การตัดชิ้นตัวอย่าง (A) คือ ชิ้นตัวอย่างท่อนำเส้นประสาทที่เก็บมาโดย Proximal stump คือส่วนของเส้นประสาทปลายด้านต้นต่อบริเวณที่ขาดซึ่งเป็นส่วนที่ใกล้นิวเคลียสของเซลล์ประสาทและ Distal stump คือปลายด้านท้ายต่อบริเวณที่ขาด (B) คือ การตัดตัวอย่างท่อนำเส้นประสาทสำหรับนำไปสังเกตการเจริญของเส้นประสาทที่อยู่ภายใน โดยตัดส่วนของท่อนำเส้นประสาทเป็นท่อนสั้นๆ ความยาวท่อนละ 2 มิลลิเมตร

3.3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกการทดลองจะมีการทำซ้ำอย่างน้อย n=3 ซึ่งคำนวณเป็น Average ± SD แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ t-test ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรม Minitab Statistical sorfware (version 14, USA)

3.3.7 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเคมี ตึกอาคารอนุสาสน์ยันตรกรรม ชั้น 5 ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ชั้น 9 ตึก อ.ป.ร. คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย