



รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จุฑามาศ ต้นปลูก และสายสุดา ผลจันทร์. การเตรียมและหาลักษณะเฉพาะของเทอร์พอลิเอส

เทอร์แบบทอและแบบฟิล์มสำหรับใช้เป็นท่อนำเส้นประสาทที่สามารถสลายตัวทาง

ชีวภาพ.[Online]. Available from : <http://www.Science.cmu.ac.th> [2551, เมษายน 4]

จิตติศักดิ์ กุลเกล้าปรากฏ. การตรวจสอบการแผ่รังสีเอ็กซ์จากเครื่องพลาสมาไฟกัสขนาดเล็ก.

วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย, 2548.

ดุสิต งามรุ่งโรจน์. การตัดแปรพลาสมาไฟกัสสำหรับการปรับสภาพผิววัสดุ. วิทยานิพนธ์ปริญญา

มหาบัณฑิต, สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545.

ธรรมบุญ คำสาร และวินิตา บุญโยดม. การพัฒนาพอลิเมอร์ที่สลายตัวทางชีวภาพสำหรับใช้เป็น

บรรจุภัณฑ์และทางการแพทย์.[Online]. Available from :

<http://www.Vcharkarn.com>[2551, เมษายน 4]

ผาสุก มหรรฆานุเคราะห์. ประสาทกายวิภาคศาสตร์พื้นฐาน Basic Neuroanatomy. คณะ

แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 1998.

ภานุพันธ์ ทรงเจริญ. การบาดเจ็บของเส้นประสาท. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์, 1996.

วีระศักดิ์ สหชัยเสรี, โปรตีนเทคโนโลยี, โครงการตำราและเอกสารประกอบการเรียนเคมี,

ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาลัยวิทยาลัยเชียงใหม่, 177-179 (2544)

สุพิชญา ชื่นชนม์. สมบัติและสัณฐานวิทยาของเส้นใยประดิษฐ์ที่ตัดแปรด้วยเครื่องที่ตาพินซ์.

วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยี

สิ่งทอ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

เสริมสุข แซ่ตั้ง. การหาอุณหภูมิและความเร็วของพลาสมาที่เกิดจากเครื่องพลาสมาไฟกัสโดยใช้

รังสีเอ็กซ์ที่เกิดจากเครื่องพลาสมาไฟกัส. โครงการงานนักศึกษาชั้นปีที่ 4, สาขาวิชาฟิสิกส์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.

ภาษาอังกฤษ

Akkus, O., Belaney, R.M., Das, P. Free radical scavenging alleviates the biomechanical

important of gamma radiation sterilized bone tissue. Journal of Orthopaedic

Research 23 (2005): 838-845.

Aydin, H. Microporous scaffolds form poly(lactide-co-caprolactone) composites with

hydroxyapatite and tricalcium phosphates using supercritical CO₂ for bone

- tissue engineering. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 19 (2004): 383-394.
- Bellamkonda, R. Peripheral nerve regeneration : An opinion on channels, scaffolds and anisotropy, Biomaterials 27 (2006): 3515-3518.
- Biomaterials Search Group:Middle East Technique University-Biotechnology Research Unit. Nerve Tissue Engineering. [Online]. Available from : http://www.biomed.metu.edu.tr/courses/term_papers/Nerve_Tissue_ENG_bar.html [2006. October 25]
- Bunting, S., Di Silvio, L., Deb, S. Bioresorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration. British and European 30B (2005) 242-247.
- Burks, CA., Bundy, K., Fotuhi, P., Alt, E. .Characterization of 75:25 poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) thin films for the endoluminal delivery of adipose-derived stem cells to abdominal aortic aneurysms. Tissue Eng. 12(9) (2006): 1-10.
- Chang, C.J., Hsu, S.H. The effect of high outflow permeability in asymmetric poly(DL-lactide-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. Biomaterials 27 (2006) :1035-1042.
- Chen, P.R., Chen, M.H., Lin, F.H. Release characteristics and bioactivity of gelatin-tricalcium phosphate membranes covalently immobilized with nerve growth factors. Biomaterials 26 (2005): 6579-6587.
- Chen, Y., Hsieh, C., Yao, C. Peripheral nerve regeneration in silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin, Proceeding of the 22nd Annual EMBS International Conference (2000): 23-28.
- Cheng, Q., Peng, T.Z., Hu, X.B., Yang, X.B. Ccharge-selective recognition at fibroin-modified electrodes for analytical application. Anal Bioanal Chem 382(1) (2005): 80-4.
- Damink, LO., Dijkstra, P.J., Luyn, M.V., Wachem, P.V., Nieuwenhuis, P. and Feijen, J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. Biomaterials 17 (1996): 765-773.
- Evans, G. Challenges to nerve regeneration. Seminars in Surgical Oncology 19 (2000): 312-318.

- Evans G, Brandt K, Widmer MS, et al. In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999; 20:1109-1113.
- Freepatentonline. Nerve regeneration conduit-Patent 5019087[Online]. Available from : <http://www.freepatentsonline.com/5019087.html>[2007, February 9]
- Freepatentonline. Polymer and nerve guide conduits formed thereof- Patent 20030060836.[Online]. Available from : <http://www.freepatentsonline.com/20030060836.html>[2007, February 9]
- Friess, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (1998): 113-136.
- Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (2003): 1531-1546.
- Goissis, G., Yoshioka, SA., Braille, DM. and Ramirez, VDA. The chemical protecting Group concept Applied in Cross-linking of natural Tissues wiyh Glutaraldehyde Acetals. *Artificial Organs* 22 (1998): 210.
- Grothe, C., Nikkhah, G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat Embryol* 204 (2001): 171-177.
- Groot, J., Pennings, A., Coenen, J. Triple laver artificial skin:porous 50/20 copoly(L-lactide/caprolactone) template for neoderms regeneration [Online]. Available from: <http://dissertation.ub.ruq.nl/FILES/faculties/Science/1995/j.h.de.groot/appendix.pdf>. [2006, October25]
- Growth of human chondrocytes on biodegradable synthetic polymers [Online]. Presentation: Poster at V Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku.Available from: <http://www.science24.com/paper/6504> [2006,October 25]
- Guruvenket, S., Komath, M., Vijayalakshmi, S.P., Raichur, A.M., Mohan Rao, G. Wettability enhancement of polystyrene with electron cyclotron resonance plasma with argon. *Journal of Applied Polymer Science* 90 (2003): 1618-1623.
- Holmbom, J., et al. Long-term evaluation of porous poly(epsilon-caprolactone-co-L-lactide) as a bone-filling material. *J Biomed Mater Res A*. 75(2) (2005): 308-15.
- Jeong, S., et al. In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* 25 (2004): 5939-5946.

- Kanematsu, A., Marui, A., Yamamoto, S., et al. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. Journal of controlled release 99 (2004) :281-292.
- Kang, HW., Tabata, Y. and Ikada, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 20 (1999): 1339-1344.
- Keilhoff, G., Stang, F., Wolf, G. Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. Biomaterials 24 (2003) :2779-2787.
- Komiyama, T., Nakao, Y., Toyama, Y. Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit. Journal of Neuroscience Methods 134 (2004) :133-140.
- Kuzuya, M., Kondo, S., Sasai, Y. Recent advances in plasma techniques for biomedical and drug engineering. Pure Appl. Chem 77 (2005): 667-682.
- Kuzuya, M., Sawa, T., Mouri, M., Kondo, S., Takai, O. Plasma technique for the fabrication of a durable functional surface on organic polymers. Surface&Coatings Technology 169-170 (2003): 587-591.
- Kwon, K., Matsuda, T. Co-Electrospun Nanofiber Fabrics of Poly(L-lactide-co-caprolactone) with Type I Collagen or Heparin. Biomacromolecules 6 (2005): 2096-2105.
- Lee, A., Yu, V., Lowe, J.,. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. Experimental Neurology 184 (2003) :295-303.
- Lee, CH., Singla, A. and Lee, Y. Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics 221 (2001): 1-22.
- Lee, DY., Choi, BH., Park, JH., et al. Nerve regeneration with the use of a poly(L-lactide-co-glycolic acid)-coated collagen tube filled with collagen gel. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 34 (2006) :50-56.
- Liu, H., Mao, J., Yao, K., Yang, G., Cui, L. and Cao, Y. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. Biomaterials 15. 1 (2004): 25-40.
- Lu M, Chang Y, Chiang L, et al. Peripheral nerve regeneration through nerve guides filled with bilobalide and schwann cells, Biomedical Engineering-Application, Basis&communications 18 (2006): 8-12.

- Lu, XL., Cai, W., Gao, ZY., Zhao, LC. Shape memory property of poly(L-lactide-co-caprolactone) copolymers. Materials Science & Engineering A 438-440 (2006):857-861.
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu,X., Han, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineer. Biomaterials 24 (2003): 4833-4841.
- Mo, X., et al. Study on electrospinning P(LLA-CL) nanofiber for the ideal scaffolding in cardiovascular tissue engineering. The International Journal of Artificial Organs 26 (2003):836.
- Mo, X., et al. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber : a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. Biomaterials 25 (2004):1883-1890.
- Murtomaki-Repo, S. The role of laminin in development, regeneration and injuries of the nervous system. Public examination in auditorium of Institute of Biomedicine University of Helsinki (2000): 25-48.
- Nagai, N., Yunoki, SJ., Suzuki, M., Salata, Tajima, K., and Munekata, M. Application of cross-linked salmon atelocollagen to the scaffold of human periodontal ligament cells. Bioscience and bioengineering. Vol.97.No.6 (2004): 389-394.
- Neuman, RE. The amino acid composition of gelatins, collagens and elastins from different sources. The Department of Biological Chemistry (Thesis) (1949): 289-297.
- Nicoli Aldini, N, et al. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. Biomaterials 17(1996): 959-962.
- Nicoli Aldini, N., Fini, M., Rocca, M., Giavaresi, G., Giardino, R. Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries. Int Orthop. 24(3) (2000): 121-125.
- Nie, X., Zhang, YJ., Tian, WD. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filld with ectomesenchymal stem cells. International Journal Oral&Maxillofacial Surgery 36 (2007) :32-38

- Ozeki, M. and Tabata, Y. Affinity evaluation of gelatin for hepatocyte growth factor of different types to design the release carrier. J.Biomater.Sci. Polymer Edu. 17 (2006) :139-150.
- Park, H., et al. A novel composite scaffold for cardiac tissue engineering. *In Vitro Cell. Dev. Biol- Animal* 41 (2005):188-196.
- PatentStorm LLC. Medical guide tubes[Online]. Available from: <http://www.patentstorm.us/> [2007, February 9]
- Pfister, L., et al. Novel biodegradable nerve conduits for peripheral nerve regeneration, European Cells and Materials 7 (2004): 16-17.
- Pieper, J.S., Oosterhof, A., Dijkstra, P.J., Veerkamp, T.H., Kupperelt, V. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. Biomaterial 20 (1999): 847-858.
- Shao-hong, L.I, Shao-x,i CAI., Bing, LIU.. In vitro characteristics of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres incorporating gelatin particles loading basic fibroblast growth factor. Acta Pharmacologica Sinica 27(6) (2006): 754-759.
- Somsamak, P., et al. Fabrication of absorbance nerve guides from poly(L-lactide-co-caprolactone). 31st Congress on Science and technology of Thailand at Suranaree University of Technology. (2005).
- Stang, F., Fansa, H., Wolf, G.Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. Biomaterials 26 (2005) :3083-3091.
- Tabata, Y., Nagano, A., Muniruzzaman, Md., Ikada, Y. In vivo sorption and desorption of basic fibroblast growth factor from biodegradable hydrogels. Biomaterials 19(1998): 1781-1789.
- Tabata, Y. and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 31 (1998): 287–301.
- Tabata ,Y., Ikada, Y. Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. Biomaterials 20(1999): 2169-2175.
- Tern, J., et al. A biosynthetic skin substitute (Biobrane) in the management of burns. Ann. Medit. Burns Club 8 (1995).

- Tohill, M., Mantovani, C., Wiberg, M. Rat bone marrow mesenchymal stem cell express glial markers and stimulate nerve regeneration. Neuroscience Letters 362 (2004):200-203.
- Tseng, C., Ambron, R., Chiu, D. Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration in the autogenous venous nerve conduit (AVNC). P&S Medical Review (2001): 22-24.
- Uebersax, L., Mattotti, M., Papaloizos, M., Merkle, HP., Gander, B., Meinel, L. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor. Biomaterials 28 (2007):4449-4460.
- Ueda, H., Nakamura, T., Yamamota, M., Nagata, N. Repairing of rabbit skull defect by dehydrothermally crosslinked collagen sponges incorporating transforming growth factor β 1. Journal of controlled Release 88 (2002): 256-274.
- United States Patent and Trademark Office. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same[Online]. Available from: <http://www.patentstorm.us/patents/5733950-description.html>. [2006, October 25]
- United States Patent and Trademark Office. High drug loaded injectable microparticle compositions and methods of treating opioid drug dependence[Online]. Available from: <http://www.freepatentsonline.com/7041320.html>. [2006, October 25]
- United States Patent and Trademark Office. Implantable devices comprising biologically absorbable star polymers and methods for fabricating the same[Online]. Available from: <http://www.freshpatents.com>. [2006, October 25]
- U.S. Patent and Trademark Office. Resorbable polymer composition, implant and method of making implant[Online]. Available from: http://www.pharmcast.com/Patents100/Yr2005/Aug2005/080905/6926903_Implant080905.htm [2006, October 30]
- Wess, T.J., Orgel, J.P. Change in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. Thermochimica Acta 365 (2000): 119-128.
- Wissink, M.J.B., Beernink, R., Peiper, J.S., Poot, A.A., Engbers, G.H.M., Beugeling, T., Van Aken, W.G., Feijen, J. Immobilization of heparin to EDC/NHS-cross-linked

- collagen. Characterization and in vitro evaluation. Biomaterials 22 (2001): 151-163
- Xu, C., et al. Aligned biodegradable nanofibrous structure : a potential scaffold for blood vessel engineering. Biomaterials 25 (2004): 877-886.
- Xu, X., Yee, WC., Hwang, P., *et al.* Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. Biomaterials 24 (2003): 2405-2412.
- Yang, Y., Laporte, L., Rives, C., *et al.* Neurotrophin releasing single and multiple lumen nerve conduits. Journal of controlled release 104 (2005) :433-446.
- Yang, Y., Porte, M.C., Marmey, P., El Haj, A.J., Amede, J. Covalent bonding of collagen on poly(L-lactic acid) by gamma irradiation. Nuclear Instruments and methods in Physics Research B 207 (2003):165-174.
- Yannas IV. Tissue and Organ Regeneration in Adults. New York: Sprinkger-Verlag 2001.
- Young, S., Wong, M., Tabata, Y. and Mikos, AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. Journal of Controlled Release 109 (2005): 256-274.
- Zhao, K., *et al.* Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. Biomaterials 24 (2003): 1041-1045.
- Zhu, Y., *et al.* Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly(L-lactide-co-caprolactone)(PLLC) nanofiber scaffold. Biomaterials 28 (2007): 861-868.
- Zhu, Y., *et al.* Protein bonding on biodegradable poly(L-lactide-co-caprolactone) membrane for esophageal tissue engineering. Biomaterials 27 (2006): 68-78.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบโกรทแฟคเตอร์โดย Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

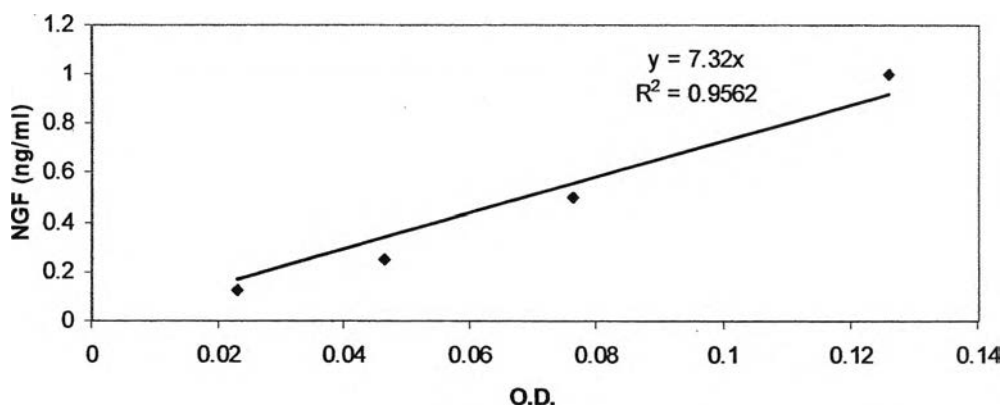
การตรวจสอบปริมาณ Nerve growth factor (NGF)

โดยใช้ชุดตรวจ NGF E_{max}[®] ImmunoAssay System , Promega, สหรัฐอเมริกา ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เคลือบ 96 well plate ด้วย Anti-NGF Polyclonal Antibody (pAb) โดยผสม pAb10 ไมโครลิตร และ Carbonate coating buffer 10 มิลลิลิตร แล้วใส่หุลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน
2. เติม Block&Sample 1XBuffer หุลุมละ 200ไมโครลิตร เพื่อช่วยยึด pAb ไว้ที่ plate บ่มไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องเขย่า
3. เติมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่เก็บจากช่วงเวลาต่างลงไปในช่วงที่กำหนดไว้ หุลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 ชั่วโมงพร้อมกับเขย่าด้วยเครื่อง แล้วดูดสารละลายในแต่ละหุลุมทิ้งและล้างด้วย Wash buffer 5 ครั้ง
4. เติม Monoclonal antibody (mAb) คือ Anti-Rat IgG, HRP Conjugate หุลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ 2 ชั่วโมงครั้งที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องแล้วดูดสารละลายในแต่ละหุลุมทิ้งและล้างด้วย Wash buffer 5 ครั้ง
5. เติมสารละลาย TMBหุลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ทำปฏิกิริยาเกิดสีขึ้นและหยุดปฏิกิริยาด้วย Stop Solution หุลุมละ 50ไมโครลิตรนำไปวัดค่า Optical density (O.D.) ที่ 450 นาโนเมตรแล้วหาปริมาณ NGF จากกราฟ NGF มาตรฐาน (ตาราง ก.1 และรูป ก.1) และนำไปหาข้อมูลปริมาณ NGF ได้ดังตารางที่ ก.2

| ข้อมูลกราฟมาตรฐาน | |
|-------------------|-------------------|
| O.D. ที่ 450 | NGFมาตรฐาน(ng/ml) |
| 0.126 | 1 |
| 0.0765 | 0.5 |
| 0.0465 | 0.25 |
| 0.023 | 0.125 |
| 0.0595 | 0.05 |

ตารางที่ ก.1 แสดงข้อมูลของกราฟมาตรฐาน NGF



รูป ก.1 แสดงกราฟมาตรฐานของ NGF

| ค่าเฉลี่ยของ O.D. ที่ 450 nm ของการตรวจวัด NGF จากโปรตีนตัวเต็ม | | | |
|---|---------------|---------------|----------|
| วัน | เจลาตินชนิด A | เจลาตินชนิด B | Collagen |
| 0 | 0.363 | 0.282 | 0.234 |
| 0.083 | 3.075 | 1.385 | 1.532 |
| 0.5 | 1.005 | 0.249 | 1.080 |
| 1 | 0.649 | 0.119 | 0.606 |
| 3 | 0.397 | 0.177 | 0.431 |
| 7 | 0.131 | 0.084 | 0.125 |
| 14 | 0.096 | 0.076 | 0.083 |
| 21 | 0.069 | 0.037 | 0.054 |
| 28 | 0.076 | 0.066 | 0.049 |
| ค่าเฉลี่ยของปริมาณ NGF (ng/ml) จากโปรตีนตัวเต็ม | | | |
| วัน | เจลาตินชนิด A | เจลาตินชนิด B | คอลลาเจน |
| 0 | 2.65 | 2.06 | 1.72 |
| 0.083 | 22.51 | 10.14 | 11.21 |
| 0.5 | 7.35 | 1.82 | 7.91 |
| 1 | 4.75 | 0.87 | 4.44 |
| 3 | 2.90 | 1.29 | 3.15 |
| 7 | 0.96 | 0.61 | 0.92 |
| 14 | 0.71 | 0.56 | 0.61 |
| 21 | 0.51 | 0.27 | 0.40 |
| 28 | 0.55 | 0.48 | 0.36 |

ตารางที่ ก.2 แสดงข้อมูลของค่าเฉลี่ย O.D. ที่ 450 nm และค่าเฉลี่ยของปริมาณ NGF จากโปรตีนตัวเต็มเจลาตินชนิด A, เจลาตินชนิด B และคอลลาเจน ที่เวลาต่าง ๆ

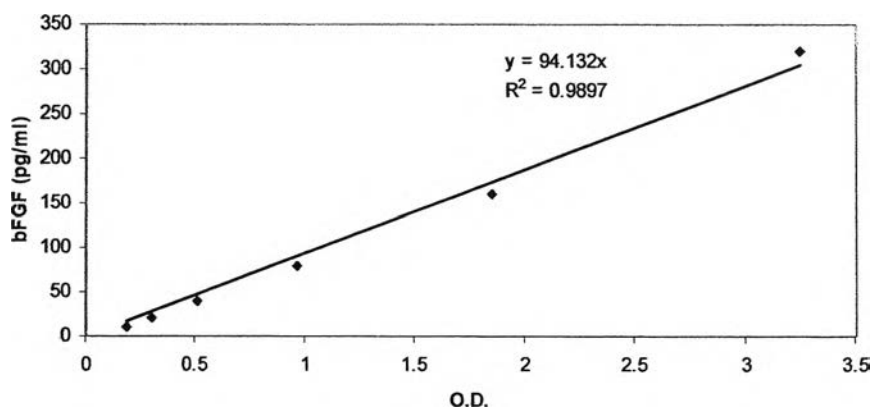
การตรวจสอบปริมาณ bFGF (basic fibroblast growth factor)

โดยใช้ชุดตรวจ Quantikine[®] Human bFGF Immunoassay, R&D Systems, สหรัฐอเมริกา ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ใส่ Assay Diluent RD1-43 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมของ 96 well plate
2. เติมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่เก็บจากช่วงเวลาต่างลงไปในห้องที่กำหนดไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงแล้วดูดสารละลายในแต่ละหลุมทิ้งและล้างด้วย Wash buffer 4 ครั้ง
3. เติม bFGF Conjugate หลุมละ 200 ไมโครลิตรบ่มไว้ 2 ชั่วโมงแล้วดูดสารละลายในแต่ละหลุมทิ้งและล้างด้วย Wash buffer 4 ครั้ง
4. เติม Substrate solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีในที่มืด
5. เติม Stop solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
6. นำไปวัดค่า Optical density (O.D.) ภายใน 30 นาที ที่ 450 นาโนเมตร และ 570 นาโนเมตร และนำค่า O.D. มาหักลบกันได้ข้อมูลดังตารางที่ ก.3 แล้วหาปริมาณ bFGF จากกราฟ bFGF มาตรฐาน (รูปที่ ก.2) และนำไปหาข้อมูลปริมาณ bFGF ได้ดังตาราง ก.4

ตารางที่ ก.3 แสดงข้อมูลของกราฟมาตรฐาน bFGF

| ค่าเฉลี่ยของ O.D. ที่ 450 nm ลบด้วย O.D. ที่ 570nm ของ bFGF | |
|---|---------------------------------|
| O.D. | ความเข้มข้น bFGF มาตรฐาน(pg/ml) |
| 3.250 | 320 |
| 1.854 | 160 |
| 0.969 | 80 |
| 0.511 | 40 |
| 0.301 | 20 |
| 0.186 | 10 |



รูปที่ ก.2 แสดงกราฟมาตรฐานของ bFGF

ตารางที่ ก.4 แสดงข้อมูลของค่าเฉลี่ย O.D. ที่ 450 nm ลบด้วย 570 nm และค่าเฉลี่ยของปริมาณ bFGF จากโปรตีนตัวเต็มเจลาตินชนิด A, เจลาตินชนิด B และคอลลาเจน ที่เวลาต่าง ๆ

| ค่าเฉลี่ย O.D. ที่ 450 ลบ 570 nm ของ bFGF จากโปรตีนตัวเต็ม | | | |
|---|-----------|-----------|----------|
| วัน | Gelatin A | Gelatin B | Collagen |
| 0 | 3.529 | 3.556 | 3.703 |
| 0.083 | 3.629 | 3.347 | 3.530 |
| 0.5 | 3.587 | 3.743 | 3.878 |
| 1 | 3.310 | 3.266 | 3.957 |
| 3 | 1.022 | 1.036 | 1.977 |
| 7 | 0.340 | 0.401 | 0.555 |
| 14 | 0.202 | 0.222 | 0.235 |
| 21 | 0.095 | 0.090 | 0.207 |
| 28 | 0.312 | 0.224 | 0.085 |
| ค่าเฉลี่ย bFGF (pg/ml) จาก O.D. ที่ 450 ลบ 570 nm ของ bFGF จากโปรตีนตัวเต็ม | | | |
| วัน | Gelatin A | Gelatin B | Collagen |
| 0 | 335.17 | 337.76 | 351.72 |
| 0.083 | 344.68 | 317.96 | 335.28 |
| 0.5 | 340.74 | 355.53 | 368.33 |
| 1 | 314.42 | 310.19 | 375.85 |
| 3 | 97.04 | 98.40 | 187.76 |
| 7 | 32.27 | 38.06 | 52.73 |
| 14 | 19.17 | 21.04 | 22.32 |
| 21 | 9.06 | 8.55 | 19.68 |
| 28 | 29.66 | 21.28 | 8.03 |

ตารางที่ ก.1 พื้นที่ใต้กราฟและร้อยละของการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ของคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B (โกรทแฟคเตอร์เริ่มต้น 100 นาโนกรัม ในสารละลาย PBS/0.1% BSA)

| พื้นที่ใต้กราฟ | คอลลาเจน | เจลาตินชนิด A | เจลาตินชนิด B |
|--|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| NGF (ng/ml) | 31.61±2.62 | 32.79±8.78 | 15.05±7.47 |
| bFGF (ng/ml)×10 ³ | 1890.28±30.17 ^a | 1408.01±168.54 ^b | 1403.18±49.57 ^b |
| ร้อยละของการปลดปล่อยเทียบกับปริมาณเริ่มต้น | คอลลาเจน | เจลาตินชนิด A | เจลาตินชนิด B |
| NGF | 31.61±2.62 | 32.79±8.78 | 15.05±7.47 |
| bFGF | 1.89±0.03 | 1.41±0.17 | 1.40±0.05 |

ตัวอักษร a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ p<0.05 ของปริมาณ bFGF ที่ปลดปล่อยออกมา

ภาคผนวก ข

การหาระดับการเชื่อมขวางจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

การหาระดับการเชื่อมขวางจากการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระแล้วคำนวณค่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงเป็นร้อยละการวิเคราะห์หมู่เอมีนอิสระทำได้โดยปฏิกิริยาของ 2,4,6-trinitro-benzen sulfonic acid (TNBS) โดยมีขั้นตอนดังนี้

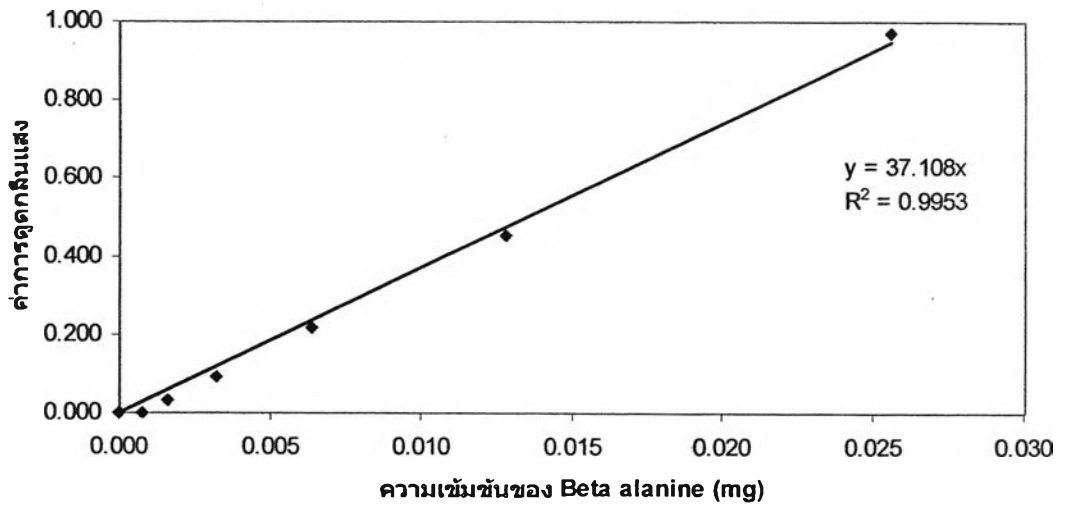
1. ใส่โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ลงในสารละลายที่ประกอบด้วย 1 มิลลิลิตรของสารละลาย NaHCO_3 (ความเข้มข้น ร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นที่ pH 8.5) และ 1 มิลลิลิตรของสารละลาย TNBS (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่น) ซึ่งสารละลาย TNBS นี้ไม่สามารถทำเก็บไว้ใช้ได้เนื่องจากสารประเภทนี้มีความไวต่อแสงสูง จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอ่างให้ความร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N (6N HCl) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

3. นำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (KUBOTA, ประเทศญี่ปุ่น) เพื่อแยกสารละลายใสกับตะกอน เนื่องจากโคโคซานไม่ละลายในสารละลาย TNBS

4. นำสารละลายส่วนที่ใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning) เพื่อวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน β -alanine จากนั้นจึงนำปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ได้ ไปคำนวณหาระดับการเชื่อมขวางจากสมการ ข.1

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



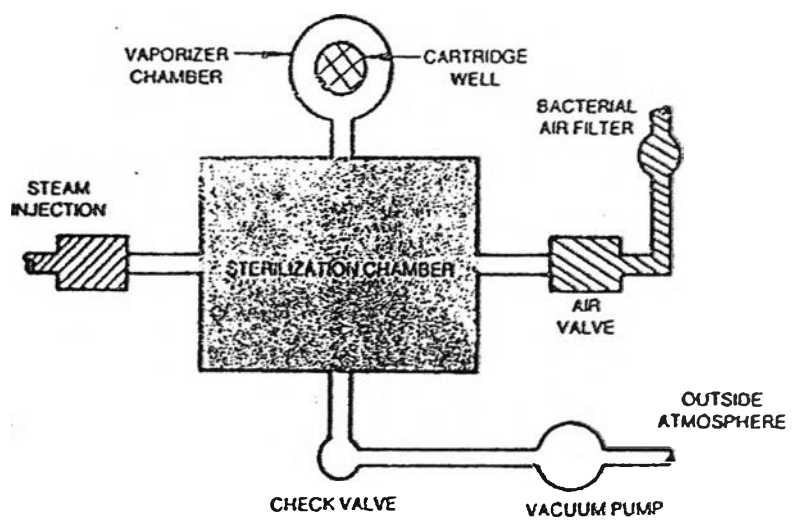
รูปที่ ข.1 กราฟแสดงสมการที่ใช้ในการหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ β -alanine กับค่าการดูดกลืนแสง

ภาคผนวก ค การฆ่าเชื้อด้วยการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์

นำตัวอย่างที่ต้องการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์มาบรรจุลงใน Sterile pouch (ดังรูปที่ ค.1) ก่อนนำเข้าเครื่องอบ โดยเครื่องอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (Steri-Vac™ gas sterilizer, 3M, USA แสดงดังรูปที่ ค.2) จะทำงานดังนี้คือ เปิดสวิตช์ให้ไฟเข้าเครื่อง เมื่อเครื่องพร้อมทำงานแล้วปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) จะทำงานโดยดูดอากาศภายในช่องอบ (Sterilization chamber) ออกเพื่อให้ภายในเป็นสุญญากาศ ความดันภายในช่องอบจะลดลงเรื่อยๆ และอุณหภูมิภายในช่องอบจะสูงขึ้นจนเท่ากับระบบที่เลือก (อุณหภูมิ 55 ± 3 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นความดันภายในช่องอบจะลดต่ำกว่า 240 mB ภายใน 20 นาที จากนั้นเครื่องอบก๊าซจะทำสุญญากาศอีก 2 นาที พร้อมกับตรวจสอบความดันภายในช่องอบเพื่อให้แน่ใจว่าต่ำกว่า 240 mB ต่อมาความชื้นจะถูกฉีดเข้าไปในช่องอบสลับกับการดูดอากาศออกซ้ำๆ กัน 10 ครั้ง สำหรับการให้ความชื้นจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที ปั๊มสุญญากาศจะทำงานอีกอย่างน้อย 2 นาที เพื่อให้ความดันภายในช่องอบต่ำกว่า 240 mB ต่อมาชุดให้ความร้อนจะหยุดทำงานและเครื่องจะเช็คการล๊อคประตู หลังจากนั้นเครื่องจะเช็คอุณหภูมิและความดันอีกครั้ง ต่อมาจะเป็นช่วงเจาะก๊าซโดยหลอดก๊าซจะถูกเจาะและก๊าซเอทิลีนออกไซด์จะเข้าสู่ช่องอบ และชุดให้ความร้อนของช่องอบจะทำงาน เพื่อรักษาความร้อนให้คงที่เท่ากับ 55 ± 3 องศาเซลเซียส และเครื่องจะตรวจสอบความดันใน 40 วินาที โดยเมื่อหลอดก๊าซถูกเจาะความดันจะสูงขึ้นอย่างน้อย 200 mB ระยะเวลาในการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์จะใช้เวลาทั้งหมด 62 นาที ความดันในช่องอบจะถูกตรวจสอบตลอดเวลาระหว่างอบเพื่อควบคุมความดันให้ต่ำกว่าความดันบรรยากาศอย่างน้อย 80 mB เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการอบ ระบบสุญญากาศจะทำงานโดยดูดก๊าซเอทิลีนออกไซด์ทิ้งโดยความดันในช่องอบจะลดต่ำถึง 240 mB ภายใน 20 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างออกจากเครื่องอบ และนำไปวางไว้ในตู้ดูดก๊าซ (Steri-Vac™ aeration cabinet, 3M, USA) เพื่อไล่ก๊าซเอทิลีนออกไซด์ออกทั้งหมด เป็นเวลา 15 ชั่วโมง



รูปที่ ค.1 แสดงการบรรจุ Sterile pouch ก่อนนำไปอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์



รูปที่ ค.2 แสดงส่วนประกอบของเครื่องอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์

ภาคผนวก ง
ข้อมูลการหาสมบัติเชิงกล

ตาราง ง.1 แสดงข้อมูล ความทนต่อแรงดึง (Tensile strength) แบบเปียกและแบบแห้งของท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบต่างๆ (n=4)

| Tensile strength (MPa) แบบแห้ง | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| unfiled PLCL | unfiled PLCL Gamma | PLCL Col | PLCL Col Gamma | PLCL GeA | PLCL GeA Gamma | PLCL GeB |
| 1.07±0.21 | 1.10±0.18 | 1.11±0.23 | 1.07±0.24 | 1.04±0.19 | 1.06±0.17 | 1.05±0.19 |
| PLCL GeB Gamma | PLCL Col Plasma | PLCL Col plasma Gamma | PLCL GeA plasma | PLCL GeA plasma Gamma | PLCL GeB Plasma | PLCL GeB plasma Gamma |
| 0.99±0.21 | 0.92±0.19 | 0.90±0.15 | 0.89±0.13 | 0.92±0.13 | 0.97±0.13 | 0.98±0.25 |

| Tensile strength (MPa) แบบเปียก | | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| unfiled PLCL | unfiled PLCL Gamma | PLCL Col | PLCL Col Gamma | PLCL GeA | PLCL GeA Gamma | PLCL GeB |
| 0.87±0.14 | 0.89±0.15 | 0.88±0.13 | 0.88±0.18 | 0.83±0.13 | 0.86±0.16 | 0.85±0.13 |
| PLCL GeB Gamma | PLCL Col Plasma | PLCL Col plasma Gamma | PLCL GeA plasma | PLCL GeA plasma Gamma | PLCL GeB Plasma | PLCL GeB plasma Gamma |
| 0.84±0.21 | 0.83±0.15 | 0.88±0.17 | 0.83±0.18 | 0.80±0.16 | 0.85±0.22 | 0.80±0.19 |

หมายเหตุ : unfiled PLCL หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบกลวง, PLCL Col หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุคอลลาเจน, PLCL GeA หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินชนิด A, PLCL GeB หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินชนิด B, Gamma หมายถึง ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา และ plasma หมายถึง ผ่านการเชื่อมขวางด้วยพลาสมาร้อนจากอาร์กอน

ตาราง ง.2 แสดงข้อมูลโมดูลัสของความยืดหยุ่น (Elastic modulus) แบบเป็ยกและแบบแห้งของท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบต่างๆ (n=4)

| Elastic modulus (MPa) แบบแห้ง | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| unfiled PLCL | unfiled PLCL Gamma | PLCL Col | PLCL Col Gamma | PLCL GeA | PLCL GeA Gamma | PLCL GeB |
| 1.20±0.20 | 1.19±0.24 | 1.03±0.21 | 1.11±0.21 | 1.03±0.25 | 1.09±0.19 | 0.91±0.25 |
| PLCL GeB Gamma | PLCL Col Plasma | PLCL Col plasma Gamma | PLCL GeA plasma | PLCL GeA plasma Gamma | PLCL GeB Plasma | PLCL GeB plasma Gamma |
| 1.09±0.18 | 0.95±0.22 | 1.04±0.28 | 1.01±0.20 | 1.09±0.19 | 1.04±0.27 | 1.07±0.20 |

| Elastic modulus (MPa) แบบเป็ยก | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| unfiled PLCL | unfiled PLCL Gamma | PLCL Col | PLCL Col Gamma | PLCL GeA | PLCL GeA Gamma | PLCL GeB |
| 1.17±0.28 | 1.10±0.22 | 1.03±0.24 | 1.02±0.20 | 0.95±0.20 | 0.99±0.19 | 0.90±0.28 |
| PLCL GeB Gamma | PLCL Col Plasma | PLCL Col plasma Gamma | PLCL GeA plasma | PLCL GeA plasma Gamma | PLCL GeB Plasma | PLCL GeB plasma Gamma |
| 0.94±0.26 | 0.96±0.21 | 0.98±0.23 | 0.90±0.26 | 0.97±0.26 | 0.91±0.19 | 0.99±0.20 |

หมายเหตุ : unfiled PLCL หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบกลวง, PLCL Col หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุคอลลาเจน, PLCL GeA หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินชนิด A, PLCL GeB หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินชนิด B, Gamma หมายถึง ฝาเชื่อมด้วยรังสีแกมมา และ plasma หมายถึง ผ่านการเชื่อมขวางด้วยพลาสติกมาร้อนจากอาร์กอน

ตาราง ง.3 แสดงข้อมูลความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด (% Elongation at break) แบบเปียกและแบบแห้งของท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบต่างๆ (n=4)

| % Elongation at break แบบแห้ง | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| unfiled PLCL | unfiled PLCL Gamma | PLCL Col | PLCL Col Gamma | PLCL GeA | PLCL GeA Gamma | PLCL GeB |
| 109.60±16.67 | 106.15±16.45 | 126.33±15.82 | 118.25±15.04 | 116.38±18.86 | 123.40±19.61 | 107.50±17.23 |
| PLCL GeB Gamma | PLCL Col Plasma | PLCL Col plasma Gamma | PLCL GeA plasma | PLCL GeA plasma Gamma | PLCL GeB Plasma | PLCL GeB plasma Gamma |
| 114.98±15.92 | 112.03±18.81 | 111.70±17.57 | 114.90±16.64 | 115.20±18.79 | 117.43±18.34 | 114.90±17.31 |

| % Elongation at break แบบเปียก | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| unfiled PLCL | unfiled PLCL Gamma | PLCL Col | PLCL Col Gamma | PLCL GeA | PLCL GeA Gamma | PLCL GeB |
| 101.83±16.16 | 103.23±18.16 | 113.30±16.47 | 112.65±20.19 | 110.65±16.72 | 109.18±18.41 | 110.23±16.20 |
| PLCL GeB Gamma | PLCL Col Plasma | PLCL Col plasma Gamma | PLCL GeA plasma | PLCL GeA plasma Gamma | PLCL GeB Plasma | PLCL GeB plasma Gamma |
| 107.18±18.60 | 104.78±16.69 | 105.85±15.03 | 106.83±19.73 | 108.88±24.14 | 111.70±16.29 | 105.53±19.43 |

หมายเหตุ : unfiled PLCL หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบกลวง, PLCL Col หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุคอลลาเจน, PLCL GeA หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินชนิด A, PLCL GeB หมายถึง ท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่บรรจุเจลาตินชนิด B, Gamma หมายถึง ซ้ำเชื่อมด้วยรังสีแกมมา และ plasma หมายถึง ผ่านการเชื่อมขวางด้วยพลาสมาร้อนจากอาร์กอน

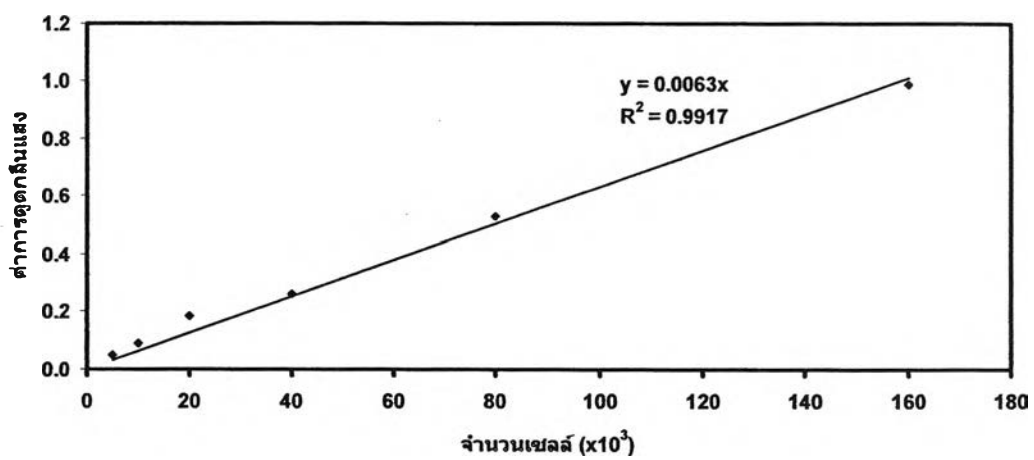
ตาราง ง.4 แสดงขนาดของท่อนำเส้นประสาท PLCL ความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก (n=20)

| PLCL 3% non prefreeze template | | PLCL 3% prefreeze template | |
|--------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|
| เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (มม.) | ความหนาของผนัง (มม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (มม.) | ความหนาของผนัง (มม.) |
| 1.62±0.09 | 0.13±0.04 ^a | 1.63±0.07 | 0.31±0.03 ^b |
| PLCL 4% non prefreeze template | | PLCL 4% prefreeze template | |
| เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (มม.) | ความหนาของผนัง (มม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (มม.) | ความหนาของผนัง (มม.) |
| 1.64±0.07 | 0.12±0.06 ^a | 1.63±0.05 | 0.60±0.06 ^c |

ภาคผนวก จ

การวัดปริมาณเซลล์สัมผัสด้วยวิธี MTT assay

1. นำฟิล์ม PLCL ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม ออกจากเอทิลีนออกไซด์เพื่อฆ่าเชื้อ
2. นำจานเพาะเชื้อมาใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ปริมาตรหลุมละ 350 ไมโครลิตร
3. ใส่เซลล์ L929 จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อ 1 หลุม ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม แล้วนำไปบ่ม (incubate) ภายในตู้ที่มี 5% CO₂ แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่ 5, 24, และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay [Liu, H. และคณะ 2004]
4. หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโครงเลี้ยงเซลล์ภายในตู้ที่มี 5% CO₂ แล้ว จากนั้นล้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS buffer เพื่อที่จะล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออก
5. เติมสารละลาย MTT ใน DMEM ที่ปราศจาก phenol red ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุม และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที
6. สาร (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ใน MTT ซึ่งมีสีเหลือง จะทำปฏิกิริยากับ enzyme mitochondria dehydrogenase ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มและล้างผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ผสมกับ glycine buffer ในอัตราส่วน 9:1
8. ทำการวัดปริมาณเซลล์สัมผัส โดยการวัดจากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตกับกราฟมาตรฐานในรูปแบบที่ ง.1 [Liu, H., และคณะ 2004]



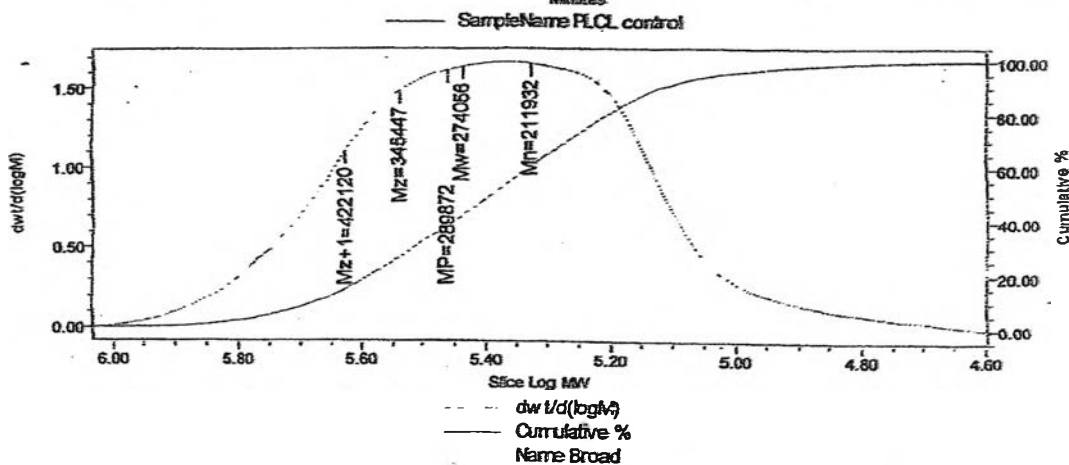
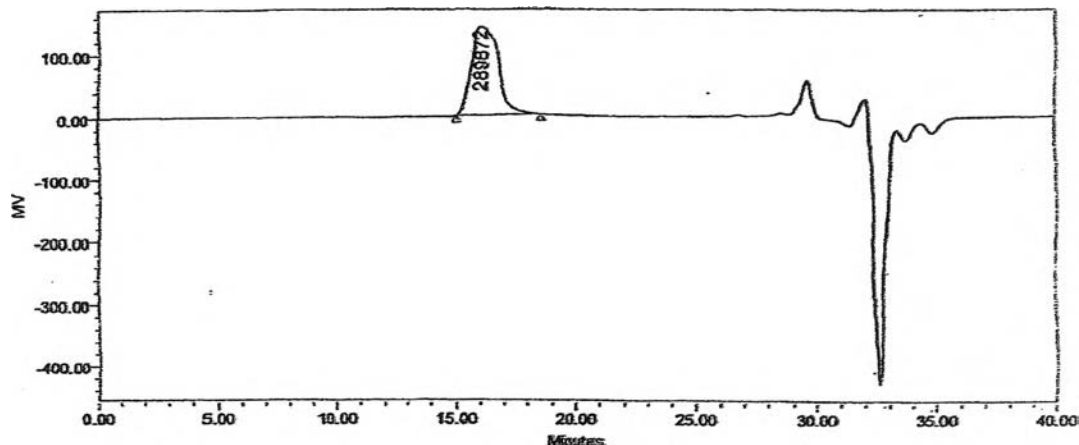
รูปที่ ๑.1 กราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 mouse fibroblast (n = 4)

ภาคผนวก ฉ

การวัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC)

GPC Sample Result Report

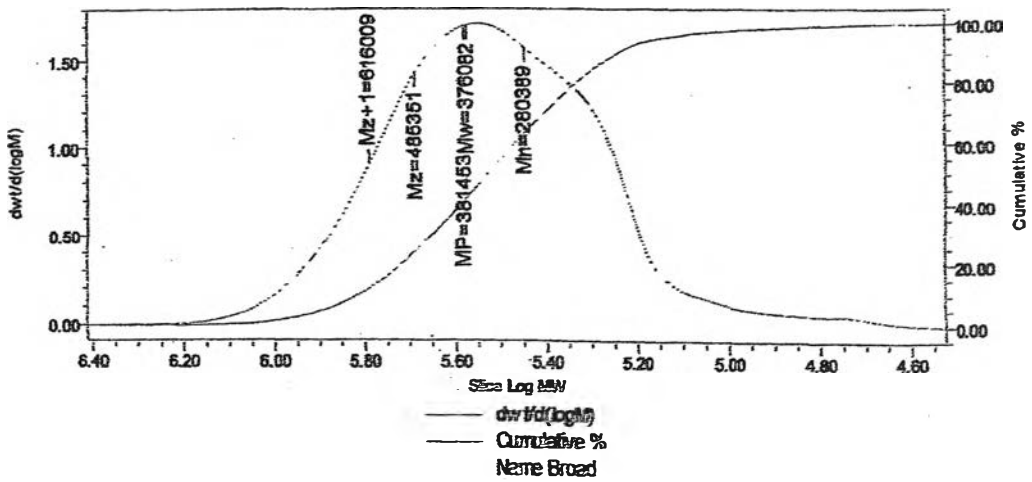
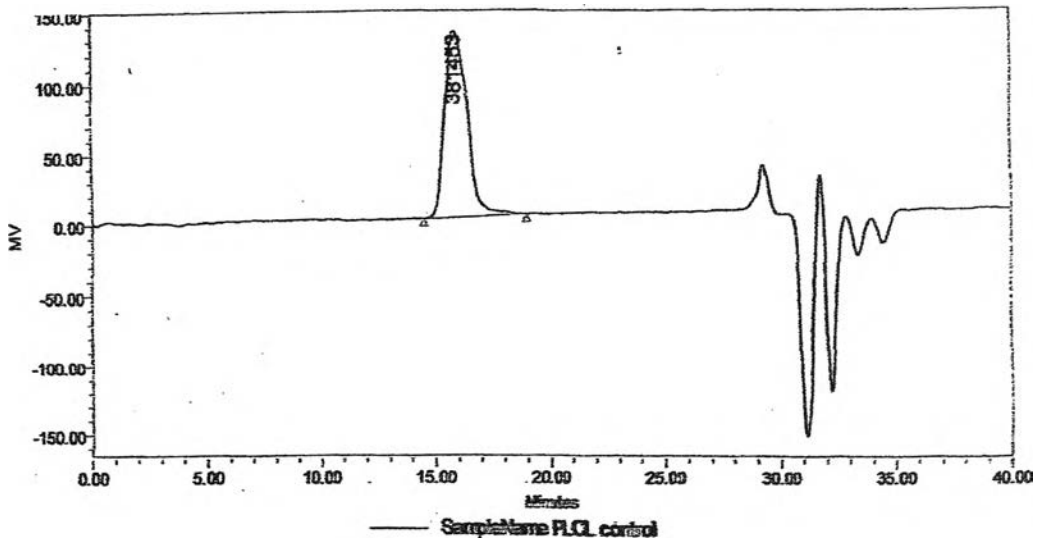
Sample Name: PLCL control Date Acquired: 1/30/2008 5:58:19 PM
 Processing Method: STD for high MW 3order Date Processed: 1/31/2008 12:38:54 PM
 Date Calibrated: 1/31/2008 12:38:24 PM



GPC Results / Process Channel ver 1
 Processed Channel Descr.:

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Poly dispersity | Area ($\mu V \cdot sec$) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|-----------------|----------------------------|--------------------|
| 1 Broad | 16.108 | 100.00 | 211932 | 274066 | 289872 | 345447 | 422120 | 1.293133 | 10839601 | 140201 |
| 2 Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 3 Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

รูปที่ ฉ.1 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL กลุ่มควบคุม



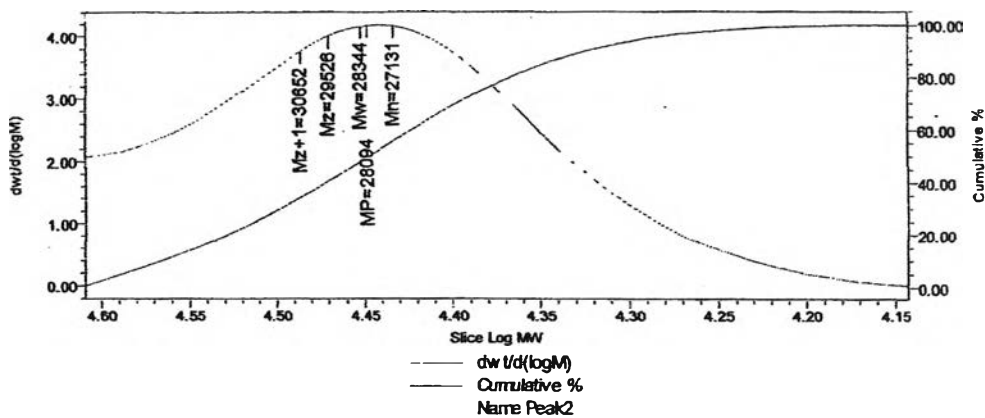
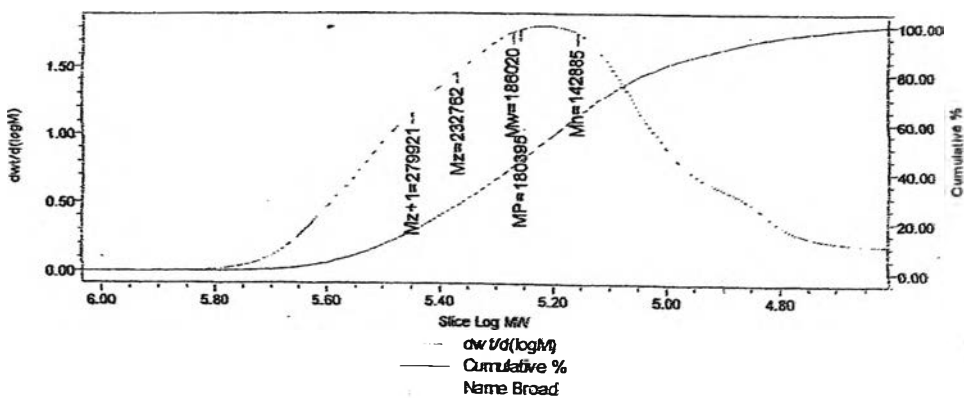
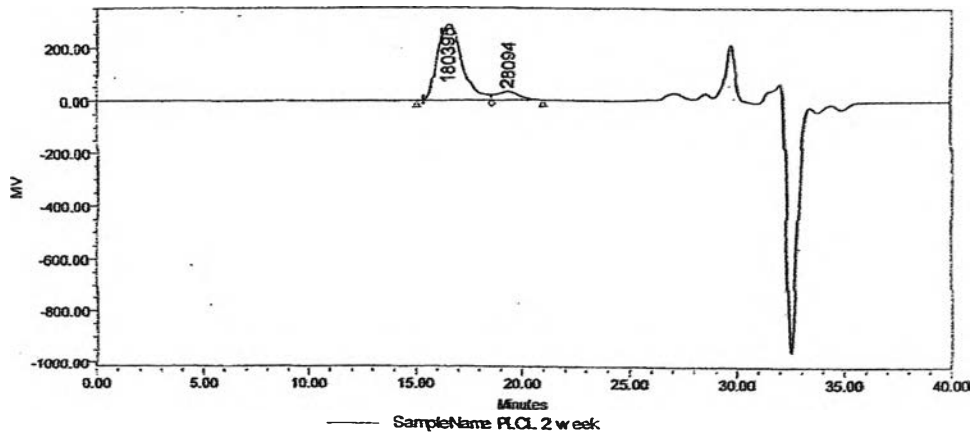
GPC Results / Process Channel ver 1
Processed Channel Descr.:

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Polydispersity | Area (μA ² sec) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|----------------------------|-------------|
| 1 Broad | 15.669 | 100.00 | 280399 | 376082 | 381453 | 465351 | 616009 | 1.341289 | 9048699 | 132094 |
| 2 Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 3 Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

รูปที่ ๑.2 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL กลุ่มควบคุม

GPC Sample Result Report

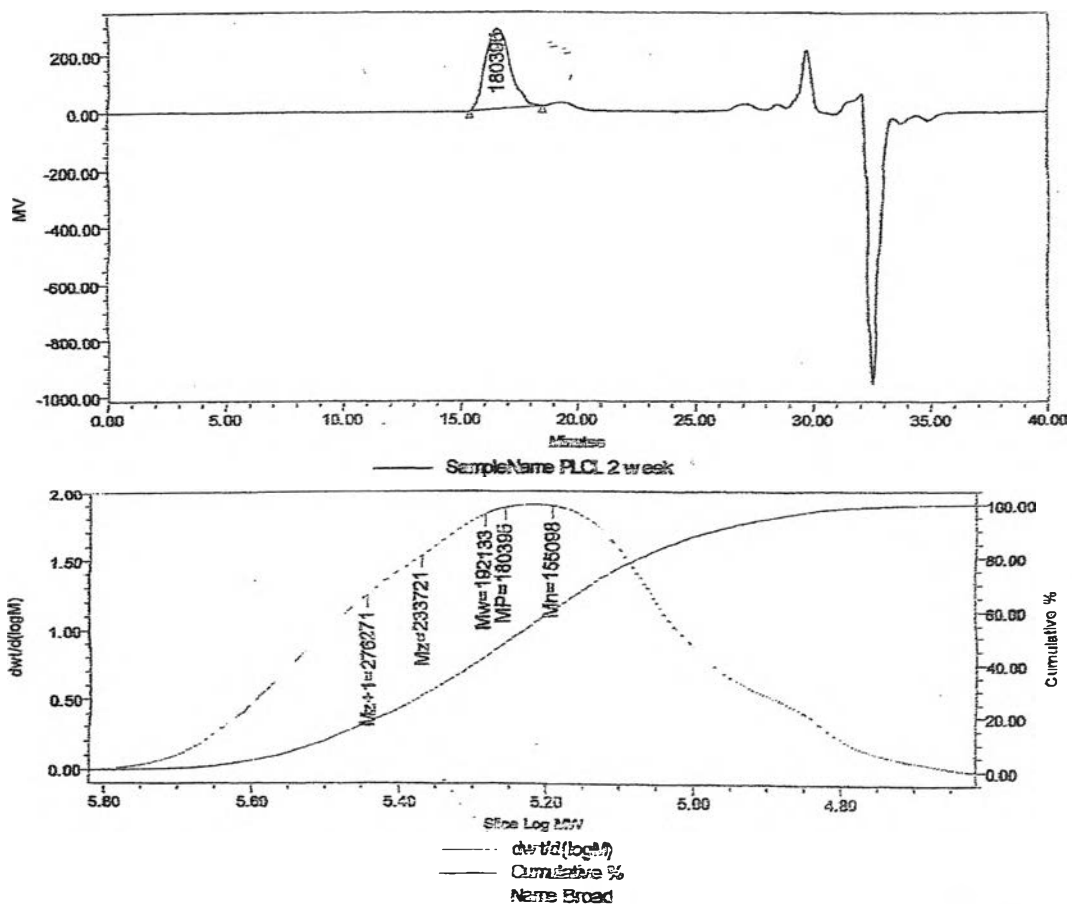
Sample Name: PLCL 2 week Date Acquired: 1/30/2008 5:07:54 PM
 Processing Method: STD for high Mw 3order Date Processed: 1/31/2008 12:39:38 PM
 Date Calibrated: 1/31/2008 12:38:24 PM



GPC Results / Process Channel ver 1
 Processed Channel Descr.:

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Poly dispersity | Area (µA*sec) | Height (µV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|-----------------|---------------|-------------|
| 1 Broad | 16.566 | 91.28 | 142885 | 186029 | 180395 | 232762 | 279921 | 1.301884 | 23068714 | 286970 |
| 2 Peak2 | 19.364 | 8.72 | 27131 | 28344 | 28094 | 29526 | 30652 | 1.044706 | 2203138 | 30516 |
| 3 Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 4 Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

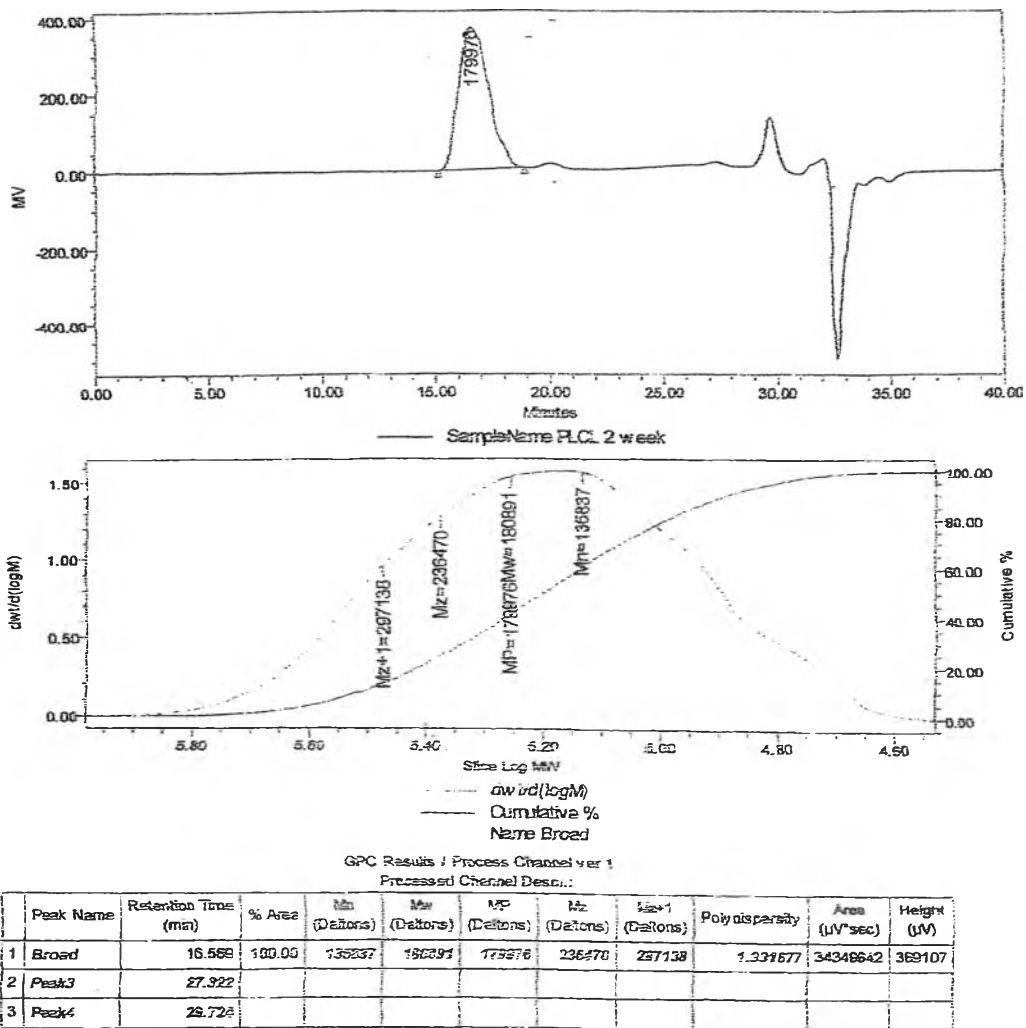
รูปที่ ๓.3 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังได้ฉนวนหนังหนู Wistar 2 สัปดาห์



GPC Results / Process Channel ver 1
Processed Channel Descr...

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mw+1 (Daltons) | Polydispersity | Area (μV*sec) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|---------------|-------------|
| 1 Broad | 16.565 | 100.00 | 155253 | 192133 | 180395 | 233721 | 276271 | 1.226779 | 21200970 | 279606 |
| 2 Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 3 Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

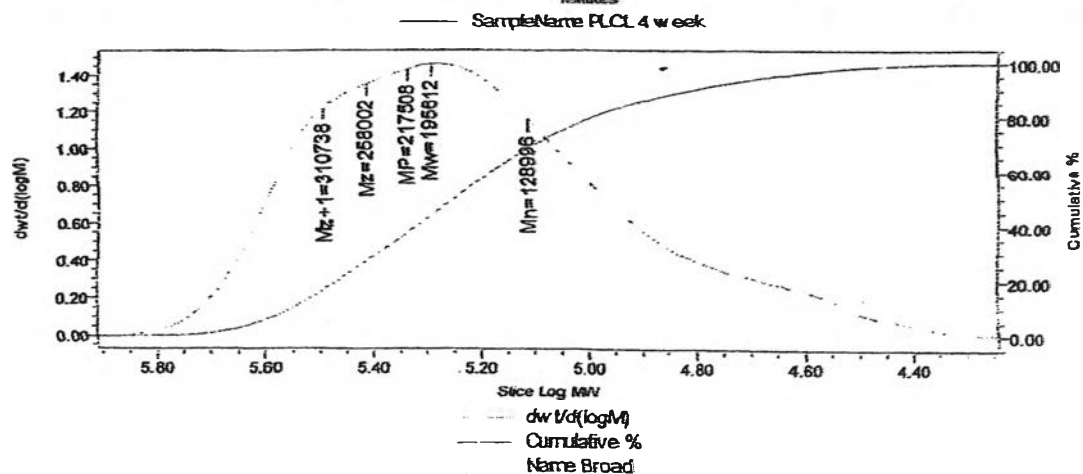
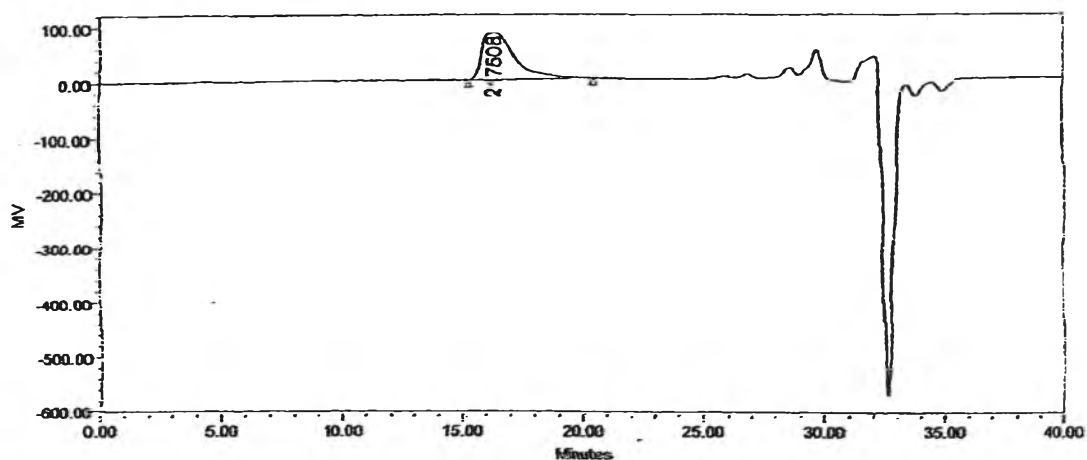
รูปที่ ๑.4 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังใต้ผิวหนังหนู Wistar 2 สัปดาห์



รูปที่ ๑.5 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังได้ฉนวนหนังหนู Wistar 2 สัปดาห์

GPC Sample Result Report

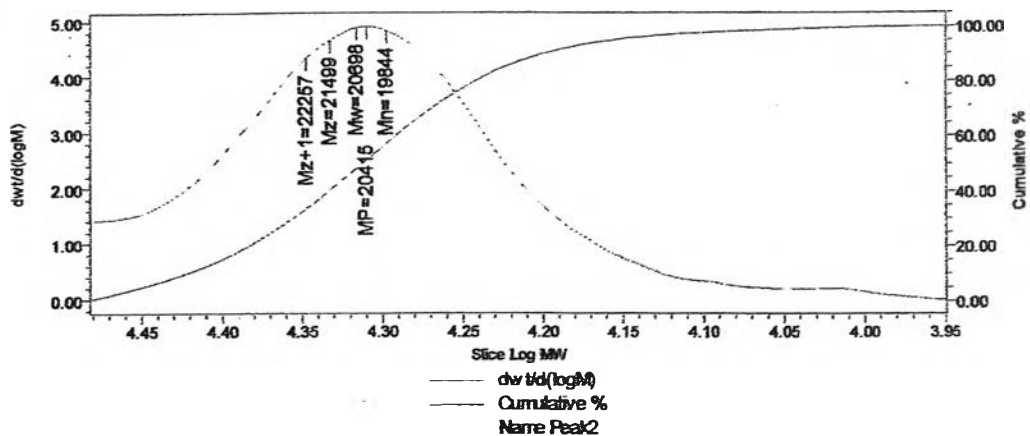
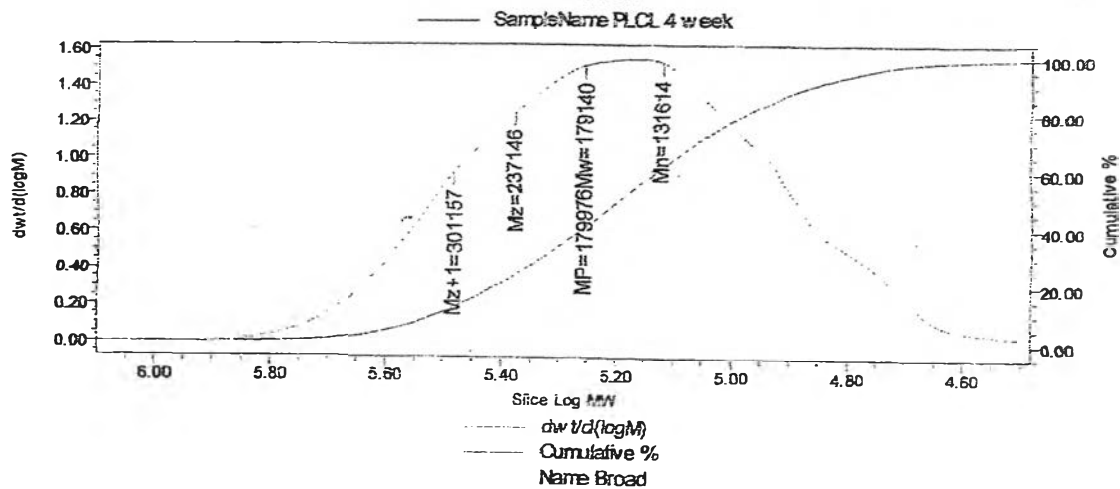
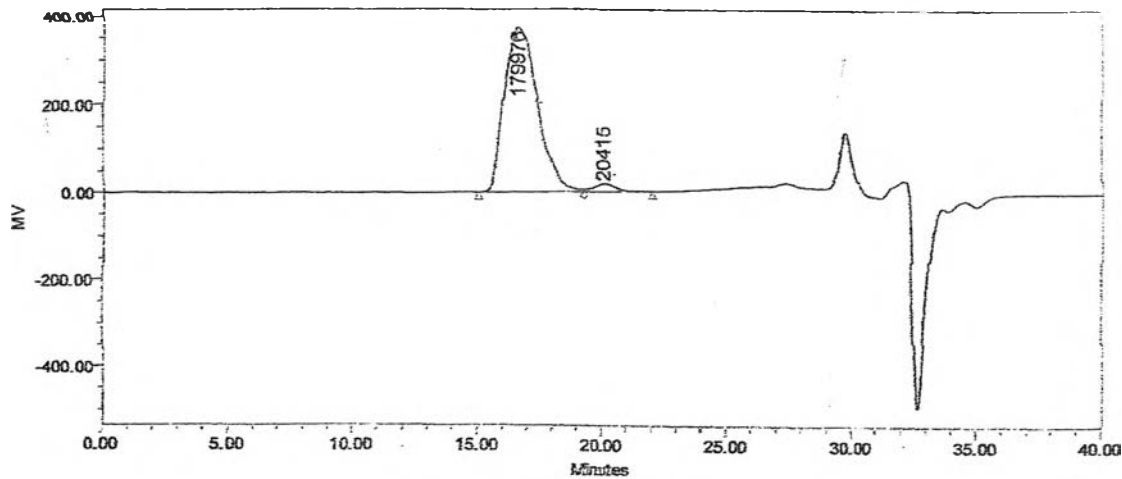
Sample Name: PLCL 4 week Date Acquired: 1/30/2008 4:26:52 PM
 Processing Method: STD for high Mw 3order Date Processed: 1/31/2008 12:40:05 PM
 Date Calibrated: 1/31/2008 12:38:24 PM



GPC Results / Process Channel ver 1
 Processed Channel Desc.:

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Polydispersity | Area ($\mu V \cdot sec$) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|----------------------------|--------------------|
| 1 Broad | 16.378 | 100.00 | 128996 | 195612 | 217508 | 258602 | 310738 | 1.518416 | 8054291 | 85525 |
| 2 Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 3 Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

รูปที่ ๑.6 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังใต้ผิวหนังหนู Wistar 4 สัปดาห์



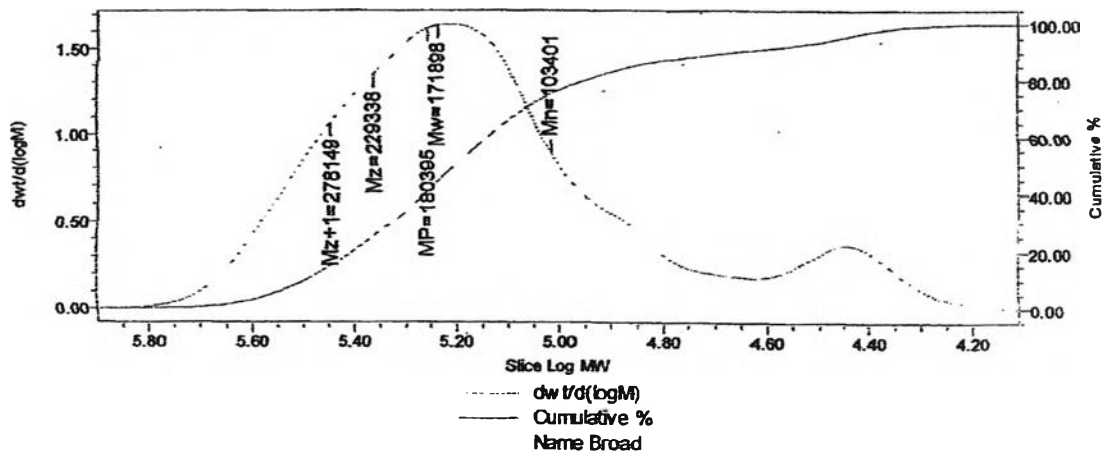
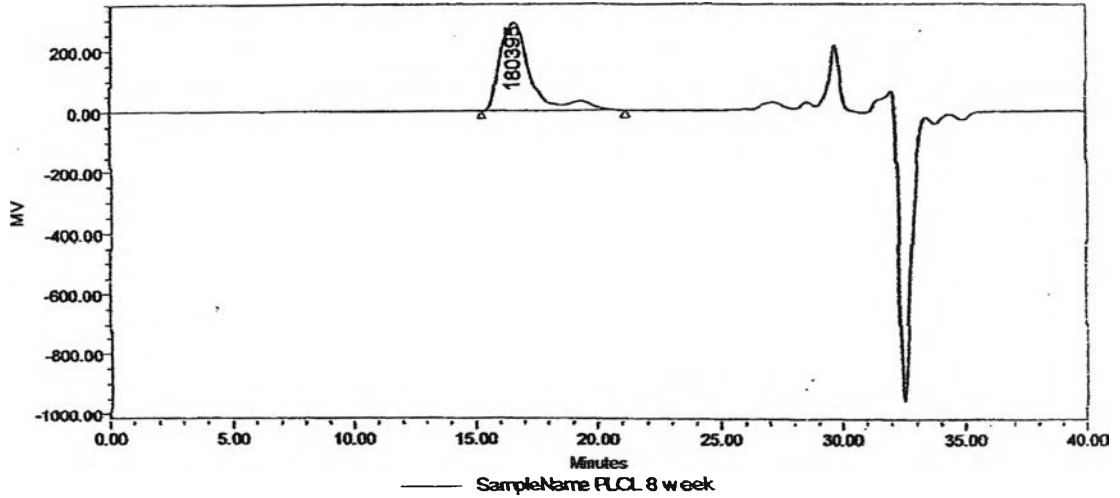
CPC Results / Process Channel ver 1
Processed Channel Descr.:

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Polydispersity | Area (μV*sec) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|---------------|-------------|
| 1: Broad | 16.569 | 96.79 | 131614 | 179140 | 179976 | 237146 | 301157 | 1.381097 | 35265686 | 371938 |
| 2: Peak2 | 20.097 | 3.21 | 19844 | 20698 | 20415 | 21489 | 22257 | 1.042996 | 1168649 | 17434 |
| 3: Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 4: Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

รูปที่ ๑.7 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังใต้ผิวหนังหนู Wistar 4 สัปดาห์

GPC Sample Result Report

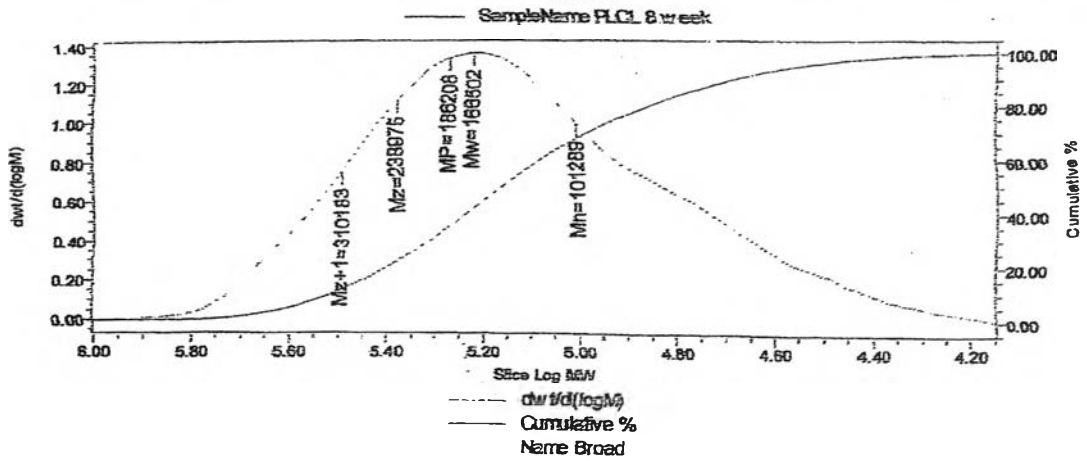
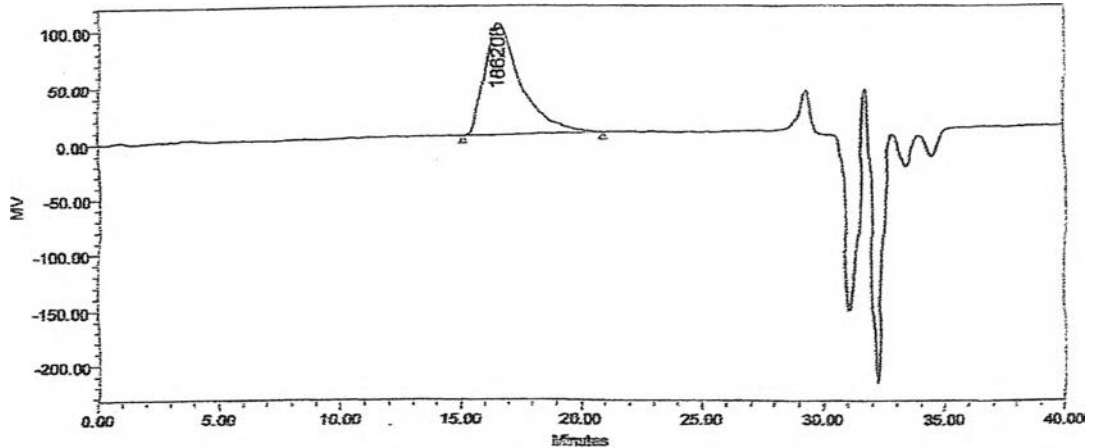
Sample Name: **PLCL 8 week** Date Acquired: **1/30/2008 5:07:54 PM**
 Processing Method: **STD for high Mw 3order** Date Processed: **1/31/2008 1:00:05 PM**
 Date Calibrated: **1/31/2008 12:38:24 PM**



GPC Results / Process Channel ver 1
Processed Channel Descr.:

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Poly dispersity | Area (μV*sec) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|-----------------|---------------|-------------|
| 1 Broad | 16.566 | 100.00 | 103401 | 171898 | 180395 | 229338 | 278149 | 1.662448 | 25305812 | 286898 |
| 2 Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 3 Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

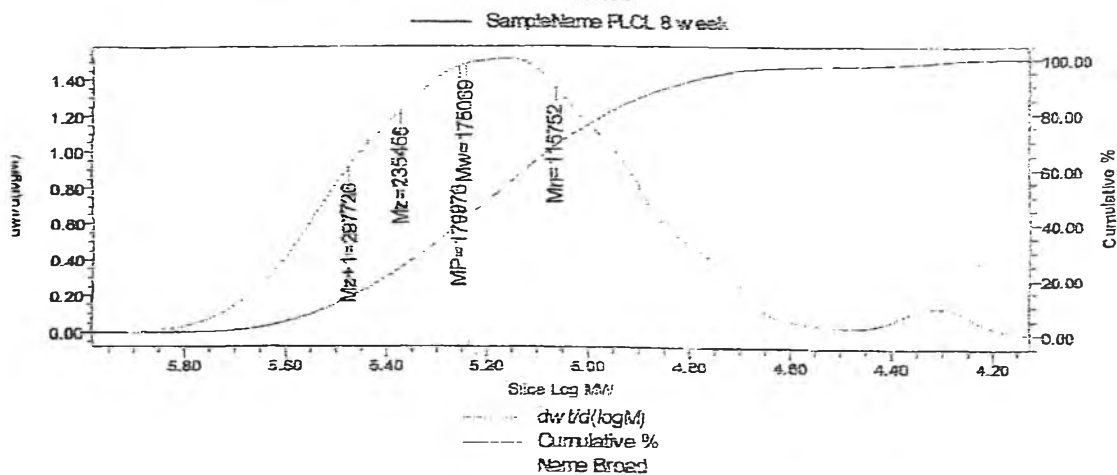
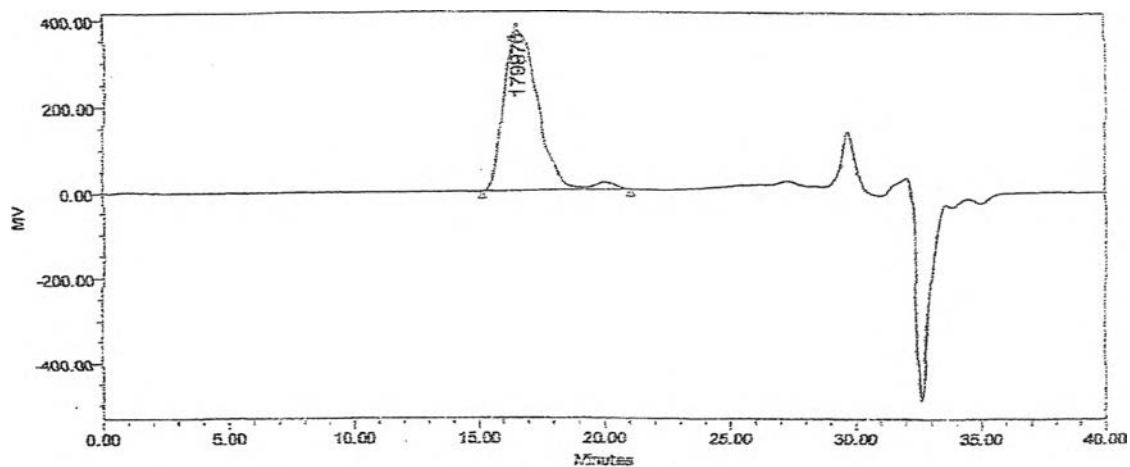
รูปที่ ๘.8 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังได้ฉนวนหนังหนู Wistar 8 สัปดาห์



GPC Results / Process Channel ver 1
Processed Channel Desc :

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | M_n (Daltons) | M_P (Daltons) | M_w (Daltons) | M_z (Daltons) | M_z+1 (Daltons) | Poly dispersity | Area ($\mu V \cdot sec$) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------------------|--------------------|
| 1 Broad | 16.534 | 100.00 | 101289 | 166592 | 186206 | 238975 | 319183 | 1.643828 | 10362983 | 97723 |
| 2 Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| 3 Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

รูปที่ ๑.9 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังได้ฉนวนหนังหนู Wistar 8 สัปดาห์



GPC Results / Process Channel ver: 1
Processed Channel Descr.:

| Peak Name | Retention Time (min) | % Area | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Polydispersity | Area (μV*sec) | Height (μV) |
|-----------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|---------------|-------------|
| Broad | 16.599 | 100.00 | 115752 | 175089 | 175756 | 235456 | 297726 | 1.512443 | 35996529 | 371108 |
| Peak3 | 27.322 | | | | | | | | | |
| Peak4 | 29.724 | | | | | | | | | |

รูปที่ ๑.10 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย GPC ของท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ฝังได้ฉนวนหนังหนู Wistar 8 สัปดาห์

ภาคผนวก ข

แบบอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เลขที่ใบรับรอง 001/2550

เลขที่โครงการวิจัย 03/2550

คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

(ภาษาไทย) “การพัฒนาท่อนำเส้นประสาท poly (L-lactide-co-caprolactone) เพื่อเสริมการงอกใหม่ของเส้นประสาทส่วนปลาย”

(ภาษาอังกฤษ) “Development of poly (L-lactide-co-caprolactone) conduits for Enhancing peripheral nerve regeneration”

ผู้เสนอโครงการใช้สัตว์ทดลอง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิพร แอกทอง

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามที่ข้อเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้

ลงนาม.....

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล จีนชนน)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

วันที่รับรอง 17 สิงหาคม พ.ศ.2550

ภาคผนวก ซ

กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาการเจริญของเส้นประสาทด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. การทำให้คงสภาพ (Fixation) ทำโดยตัดท่อนำเส้นประสาทที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาท sciatic แล้วแช่ใน น้ำยา glutaraldehyde 3% เป็นเวลา 1 วัน ตัดตัวอย่างออกเป็นท่อนสั้นๆยาวประมาณท่อนละ 2 มิลลิเมตรและเปลี่ยนสารละลายเป็น PBS 0.1 M pH 7.4 แช่ไว้จนกว่าจะใช้จริง เมื่อต้องการใช้ให้เปลี่ยนสารละลาย PBS อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย Cacodylate buffer 0.1 m pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และทำให้คงสภาพด้วย Osmium tetroxide 1% โดยแช่ไว้ 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย Cacodylate buffer 0.1 m pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

2. การขจัดน้ำ (Dehydration) ทำโดยการเปลี่ยนสารละลายจากข้างต้นเป็นแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นต่างๆ คือ แอลกอฮอล์ 70% ทิ้งไว้ 1 คืน และเปลี่ยนด้วยแอลกอฮอล์ 80% 1 ครั้ง , 95% 2 ครั้ง, 100% 2 ครั้ง

3. Clearing เป็นการล้างสารละลายแอลกอฮอล์ออกโดยใช้ Propylene oxide 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

4. การแทรกซึม (Infiltration) เป็นการนำตัวกลางที่จะยึดตัวอย่างเข้าสู่ภายในเนื้อเยื่อโดยใช้ Propylene oxide : epon อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ Propylene oxide : epon อัตราส่วน 1:2 เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นแช่ด้วย epon 100% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. การฝังตัวอย่างในพลาสติก (Embedding) โดยนำตัวอย่างใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็กพร้อมกับฝังด้วย epon 100%

6. การทำให้พลาสติกแข็งตัว (Polymerization) นำตัวอย่างที่อยู่ใน epon ในหลอดพลาสติกมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 วัน (จนแข็งตัว)

7. การเตรียมตัวอย่างที่แข็งเพื่อตัดให้บาง (Block trimming) โดยนำหลอดพลาสติกออกแล้วตัด epon ส่วนที่มากเกินไปออกให้หน้าตัดของตัวอย่างที่ฝังในพลาสติกมีขนาดเหมาะสมเพื่อสะดวกต่อการตัดให้บาง

8. การตัดตัวอย่าง (Sectioning) ตัดตัวอย่างที่ได้จากข้อ 7 ด้วยเครื่องตัด Ultramicrotome โดยใช้มีดจากกระจกแก้วให้มีความหนา 1 ไมโครเมตร โดยตัวอย่างที่ตัดแล้วจะลอยอยู่ในช่องบรรจุน้ำที่ติดอยู่กับมีด

9. ติดตัวอย่างบนแผ่นวางตัวอย่าง (Mounting) โดยติดตัวอย่างที่ตัดแล้วบนแผ่นวางตัวอย่างแล้วทิ้งไว้จนแห้งบนแท่นให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส

10. ย้อม (Staining) นำตัวอย่างจากข้อ 9 มาย้อมด้วยสี p-Phenylenediamine โดยหยดสีลงไปและทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทิ้งไว้จนแห้งบนแท่นให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส และปิดตัวอย่างด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์เพื่อป้องกันรอยขีดข่วนและเก็บไว้ดูได้นาน โดยใช้ Xylene เป็นตัวเชื่อมปิด

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย โกศล ยิ่งสุขวัฒนา เกิดที่จังหวัดขอนแก่น ในวันที่ 29 ธันวาคม 2523 จบการศึกษา ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในปี พ.ศ.2540 จากศูนย์การศึกษานอกโรงเรียนจังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2547 จบการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต จากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้เข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2549

ผลงานที่มีการเผยแพร่

- โกศล ยิ่งสุขวัฒนา, สิทธิพร แอกทอง, รัชชาติ มงคลนาวิน, ไศรดา กนกพานนท์, Development of Protein-Filled Conduit for Peripheral Nerve Regeneration, การประชุมผลงานวิจัยระดับนานาชาติ SmartMat08&IWOFM-2 วันที่ 22-25 เมษายน พ.ศ. 2551 จังหวัดเชียงใหม่
- โกศล ยิ่งสุขวัฒนา, ดุสิต งามรุ่งโรจน์, รัชชาติ มงคลนาวิน, ไศรดา กนกพานนท์, การศึกษาเปรียบเทียบการเชื่อมโยงพันธะของโปรตีนด้วยความร้อนและรังสีเอ็กซ์จากอาร์กอนพลาสมาเพื่อนำไปใช้เป็นวัสดุบรรจุภายในท่อเส้นประสาท, การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์แห่งชาติ ครั้งที่ 5, วันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2550, กรุงเทพมหานคร

