

การพัฒนาท่อน้ำเส้นประสาทพอลิแอล-แลคไทด์-โค-คาโปรแลคโตน
เพื่อเสริมการงอกใหม่ของเส้นประสาทส่วนปลาย



นาย โกศล ยิ่งสุขวัฒนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 8 9 0 5 6 9 2 0

DEVELOPMENT OF POLY(L-LACTIDE-CO-CAPROLACTONE) CONDUITS FOR ENHANCING
PERIPHERAL NERVE REGENERATION

Mr Koson Yingsukwattana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502104

โกศล ยิ่งสุขวัฒนา : การพัฒนาท่อนำเส้นประสาทพอลิแลคไทด์-โค-คาโพรแลคโตน เพื่อเสริมการงอกใหม่ของเส้นประสาทส่วนปลาย (DEVELOPMENT OF POLY(L-LACTIDE-CO-CAPROLACTONE) CONDUITS FOR ENHANCING PERIPHERAL NERVE REGENERATION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. ไครดา กนกพานนท์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. นพ. สิทธิพร แอกทอง, 169 หน้า.

ในงานวิจัยนี้รายงานการพัฒนาท่อนำเส้นประสาท Poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLCL) ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มซึ่งแสดงลักษณะในการควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ โดยได้ทำการศึกษาการเชื่อมขวางโปรตีนตัวเต็มได้แก่ คอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B ด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนเพื่อนำมาใช้เป็นโปรตีนตัวเต็มที่บรรจุภายในท่อนำเส้นประสาทสำหรับควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับวิธีการเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal Crosslinking, DHT) พบว่าสภาวะที่มีการเชื่อมขวางสูงสุดสำหรับคอลลาเจนและเจลาตินชนิด A คือ ที่ 1.0 มิลลิบาร์ 5 พัลส์ และสำหรับเจลาตินชนิด B ที่ 1.0 มิลลิบาร์ 1 พัลส์ ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL ความเข้มข้น 3% ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.6 มม. หนาประมาณ 0.6 มม. ที่ผลิตขึ้นโดยวิธี Dip-coating ได้ถูกนำไปศึกษาการสลายตัวโดยปลูกถ่ายได้ผิวหนังหนู Wistar ที่เวลา 0, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าที่ 8 สัปดาห์มีน้ำหนักโมเลกุล (M_w) ลดลง 47.45% ผลศึกษาความเข้ากันได้กับเซลล์ไลน์จากผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblast) ของฟิล์ม PLCL ความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Zinc sulphate ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL ความเข้มข้น 3% บรรจุโปรตีนตัวเต็มที่ถูกเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนด้วยสภาวะที่มีการเชื่อมขวางสูงสุด และดูดซับโกรทแฟคเตอร์สำหรับเส้นประสาท (Nerve Growth Factor, NGF) ถูกนำไปเชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ที่มีระยะขาด 10 มม. บริเวณกึ่งกลางของกระดูกต้นขาของหนู Wistar เป็นระยะเวลา 1 เดือน ผลจาก 2 ใน 3 ของจำนวนสัตว์ทดลองบ่งชี้ว่าท่อนำเส้นประสาท PLCL บรรจุโปรตีนตัวเต็มเจลาตินทั้งสองชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของเส้นประสาทส่วนปลายมากกว่าท่อนำเส้นประสาทที่บรรจุคอลลาเจน โดยเส้นประสาทมีการงอกใหม่น้อย 6 มม.


สาขาวิชา.....วิศวกรรมชีวเวช.....ลายมือชื่อนิสิต.....*โกศล ยิ่งสุขวัฒนา*.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....*ไครดา กนกพานนท์*.....

4989056920 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

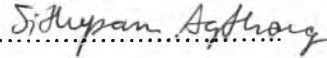
KEY WORD: NERVE CONDUIT / NERVE GROWTH FACTOR / (X-RAY ARGON PLASMA / DEHYDROTHERMAL CROSSLINK / POLY(L-LACTIDE-CO-CAPROLACTONE)

KOSON YINGSUKWATTANA: DEVELOPMENT OF POLY(L-LACTIDE-CO-CAPROLACTONE) CONDUITS FOR ENHANCING PERIPHERAL NERVE REGENERATION. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : SORADA KANOKPANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR : SITHIPORN AGTHONG, M.D., Ph.D., 169 pp.

This thesis reported a development of Poly(l-lactide-co-caprolactone) (PLCL) nerve conduit, and a protein filler with a sustained release feature. Three types of protein fillers, collagen, type A gelatin, and type B gelatin sponges were crosslinked using various doses of X-ray argon plasma treatments. Maximum crosslinking degrees were achieved when using the pressure of 1 mBar/5 pulses of the plasma treatment for collagen and type A gelatin, and 1 mBar/1 pulse for type B gelatin. PLCL conduits were fabricated using a dip-coating method which had an inner diameter and a thickness of 1.6 mm and 0.6 mm respectively. The unfilled conduits were implanted subcutaneously in Wistar rats for 0, 2, 4 and 8 weeks. The samples were removed for microscopic and molecular weight changes evaluations. Molecular weight (M_w) of the conduits decreased by 47.45 % after 8 weeks of implantation. *In vitro* cell culture tests indicated the PLCL films has relatively no toxics to L929 mouse fibroblasts comparing to zinc sulphate films which had been used as a negative control. PLCL conduits with protein fillers absorbed with nerve growth factor (NGF) were used to connect 10 mm-gap amputated femur sciatic nerves in Wistar rats. One month after operation, histological evidences showed 2/3 of gelatins-filled conduits regenerated more axon growths than those of the collagen-filled conduits. Peripheral nerves were regenerated for at least 6 mm. in length. These works prove the concept of using filled conduits with controlled release feature to accelerate peripheral nerve regeneration. Gelatin is a promising conduit filler in this case.

Field of study..Biomedical Engineering.....Student's signature.....

Principal advisor's signature.....

Academic year.....2007.....Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ไศรดา กนกพานนท์, ผศ.ดร.นพ.สิทธิพร แอกทอง และ ผศ.ดร.รัฐชาติ มงคลนาวิน เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ.นพ. ถนอม บรรณประเสริฐ สำหรับความเอื้อเฟื้อการใช้ห้องและอุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ iTissue Lab คณะแพทยศาสตร์, คุณจุฑามาศ รัตนวราภรณ์ สำหรับคำแนะนำและการสอนเทคนิคการต่างๆ, คุณดุสิต งามรุ่งโรจน์ สำหรับคำแนะนำและการใช้เครื่องมือพลาสมาไฟกัส ศูนย์ MRC อปร. ชั้น 10 คณะแพทยศาสตร์, ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี, ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ในการแนะนำให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย, คุณอารักษ์ วิทิตที่รานนท์ และคุณ นงคันุช แจ้งสว่าง สำนักงานปริมาณเพื่อสันติ สำหรับการเอื้อเฟื้อเครื่องมือมาเชื่อด้วยรังสีแกมมา

ขอบคุณมากๆ สำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ระบบประสาทส่วนปลาย.....	5
2.2 การบาดเจ็บของเส้นประสาท.....	7
2.3 การเปลี่ยนแปลงของ Axon ที่บาดเจ็บ.....	8
2.4 การซ่อมแซมเส้นประสาทกรณีการบาดเจ็บชนิดรุนแรงเพื่อให้เกิดการงอกใหม่ ของเส้นประสาท.....	10
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ PLCL.....	17
2.6 ข้อมูลการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา.....	26
2.7 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับท่อนำเส้นประสาท.....	26
2.8 ท่อนำเส้นประสาทส่วนปลายที่มีในระบบการค้า.....	28
2.9 งานวิจัยในประเทศที่เกี่ยวข้องกับท่อนำเส้นประสาท.....	34
2.10 คอลลาเจน.....	34
2.11 เจลาติน.....	37
2.12 การควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีน.....	40
2.13 การเชื่อมขวาง.....	43
2.13.1 การเชื่อมขวางด้วยวิธีกายภาพ.....	44
2.13.2 การเชื่อมขวางด้วยวิธีทางเคมี.....	50
2.14 ลักษณะที่เหมาะสมของท่อนำเส้นประสาทส่วนปลาย.....	55

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	57
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	57
3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	59
3.3 วิธีการทดลอง.....	62
3.3.1 การขึ้นรูปโปรตีนตัวเต็มแบบฟองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูทาราลดีไฮด์.....	62
3.3.2 การขึ้นรูปโปรตีนบรรจุในท่อนำเส้นประสาท PFA.....	63
3.3.3 การขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL.....	66
3.3.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของท่อนำเส้นประสาท PLCL	66
3.3.5 ศึกษาสมบัติทางชีวภาพของท่อนำเส้นประสาท PLCL และวัสดุ PLCL...	67
3.3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	71
3.3.7 สถานที่ทำการวิจัย.....	72
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	73
4.1 ผลการศึกษาการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์จากโปรตีนตัวเต็มแบบฟองน้ำ.....	74
4.2 ผลการศึกษาการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของ ก๊าซอาร์กอน.....	79
4.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นรูปท่อนำเส้นประสาท PLCL.....	91
4.3.1 ขนาดรูพรุนของโปรตีนตัวเต็มก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์ จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน.....	98
4.3.2 สมบัติเชิงกลของท่อ PLCL.....	99
4.4 สมบัติทางชีวภาพของท่อนำเส้นประสาท PLCL.....	104
4.4.1 ความเข้ากันได้ของวัสดุผลิตท่อนำเส้นประสาทกับเซลล์ผิวหนังหนู.....	104
4.4.2 การสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท PLCL ในสัตว์ทดลอง.....	107
4.4.3 ผลการทดสอบการเจริญของเส้นประสาทในท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบมีโปรตีนตัวเต็มในสัตว์ทดลอง.....	111
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	129
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	129
5.2 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย.....	131
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	132
รายการอ้างอิง.....	133

	หน้า
ภาคผนวก.....	141
ภาคผนวก ก การตรวจสอบโกรทแพคเตอร์โดย Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.....	142
ภาคผนวก ข การหาระดับการเชื่อมขวางจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ.....	146
ภาคผนวก ค การฆ่าเชื้อด้วยการอบก๊าซเอทิลีนออกไซด์.....	148
ภาคผนวก ง ข้อมูลการหาสมบัติเชิงกล.....	150
ภาคผนวก จ การวัดปริมาณเซลล์สัมผัสด้วยวิธี MTT assay.....	154
ภาคผนวก ฉ การวัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC).....	156
ภาคผนวก ช แบบอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....	166
ภาคผนวก ซ กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาการเจริญของเส้นประสาท ด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	167
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	169

สารบัญญัตินี้

ตาราง	หน้า
2.1 แสดงมวล (%) ของ PLCL เมื่อเวลาผ่านไป 1, 3, 5, 8 และ 15 สัปดาห์.....	19
2.2 ท่อนำเส้นประสาทสำหรับเส้นประสาทส่วนปลายที่ได้จากธรรมชาติ (Natural graft).....	31
2.3 ท่อนำเส้นประสาทสำหรับเส้นประสาทส่วนปลายที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthetic graft) จากคอลลาเจน.....	32
2.4 ท่อนำเส้นประสาทสำหรับเส้นประสาทส่วนปลายที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthetic graft) จากพอลิเมอร์ชนิดอื่น.....	33
2.5 ส่วนประกอบของคอลลาเจนชนิดต่างๆ.....	37
2.6 พลังงานของอิเล็กตรอน, ความยาวคลื่นรังสีเอ็กซ์, ชนิดของรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนที่ความดันต่างๆ.....	50
4.1 พลังงานของอิเล็กตรอน, ความยาวคลื่นรังสีเอ็กซ์, ชนิดของรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนที่ความดันต่างๆ.....	80
4.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระก่อนการเชื่อมขวางของคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B.....	86
4.3 ขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านใน (n=200) และพื้นผิวด้านนอก (n=50) ของท่อ PLCL...	95
4.4 ขนาดรูพรุนพื้นผิวด้านในและนอกของท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนัก ที่บรรจุโปรตีนตัวเต็มและทำการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน.....	97
4.5 ขนาดรูพรุน (n=200) ของโปรตีนตัวเต็ม 0.8% โดยน้ำหนัก จากท่อนำเส้นประสาทจำลอง Perfluoroalkoxy polymer (PFA) และจากท่อ PLCL 3% โดยน้ำหนัก ทั้งก่อนและหลังเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์ ที่สภาวะต่างๆ.....	99
4.6 ผลวิเคราะห์การสลายตัวของท่อนำเส้นประสาท PLCL 75:25 โคพอลิเมอร์ ที่ฝังใต้ผิวหนังหนู Wistar ที่ เวลา 2, 4 และ 8 สัปดาห์ แล้วนำออกมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงได้ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC).....	107
ก.1 แสดงข้อมูลของกราฟมาตรฐาน NGF.....	142
ก.2 แสดงข้อมูลของค่าเฉลี่ย O.D. ที่ 450 nm และค่าเฉลี่ยของปริมาณ NGF จากโปรตีนตัวเต็มเจลาตินชนิด A, เจลาตินชนิด B และคอลลาเจน ที่เวลาต่าง ๆ.....	143
ก.3 แสดงข้อมูลของกราฟมาตรฐาน bFGF.....	144

ตาราง	หน้า
ก.4 แสดงข้อมูลของค่าเฉลี่ย O.D. ที่ 450 nm ลบด้วย 570 nm และค่าเฉลี่ยของปริมาณ bFGF จาก โปรตีนตัวเต็มเจลาตินชนิด A, เจลาตินชนิด B และคอลลาเจน ที่เวลาต่าง ๆ.....	145
ง.1 แสดงข้อมูล ความทนต่อแรงดึง (Tensile strength) แบบเปียกและแบบแห้งของท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบต่างๆ (n=4).....	150
ง.2 แสดงข้อมูลโมดูลัสของความยืดหยุ่น (Elastic modulus) แบบเปียกและแบบแห้งของท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบต่างๆ (n=4).....	151
ง.3 แสดงข้อมูลความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด (% Elongation at break) แบบเปียกและแบบแห้งของท่อนำเส้นประสาท PLCL แบบต่างๆ (n=4).....	152
ง.4 แสดงขนาดของท่อนำเส้นประสาท PLCL ความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก.....	153

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 แสดงรูปส่วนประกอบต่างๆเซลล์ประสาท.....	6
2.2 แสดงรูปเส้นใยประสาท (Axon) ตัดขวาง.....	6
2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของ PLCL	18
2.4 ท่อนำเส้นประสาทจาก PLCL	22
2.5 ท่อนำเส้นประสาทที่สังเคราะห์ (Synthetic graft) จากคอลลาเจน	29
2.6 ท่อนำเส้นประสาทที่สังเคราะห์ (Synthetic graft) จากพอลิเมอร์ชนิดอื่น.....	30
2.7 โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	35
2.8 โครงสร้างแบบ triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	35
2.9 ขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin	38
2.10 โครงสร้างของเจลาติน.....	39
2.11 การเกิดหมู่เอมีนอิสระของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางโดยการใช้ UV irradiation	45
2.12 แสดงรูปเครื่อง Plasma focus.....	48
2.13 ภาพแสดงช่วงของการเคลื่อนที่ของพลาสมาชีท (Plasma sheath) ที่สำคัญ 4 ช่วง.....	49
2.14 การเชื่อมขวางของคอลลาเจนกับ GA.....	50
2.15 โครงสร้างของโคโตซานถูกเชื่อมขวางด้วย GA	51
2.16 โครงสร้างของคอลลาเจนกับโคโตซานเชื่อมขวางกับ GA	51
2.17 โครงสร้างของ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC).....	52
2.18 การเชื่อมขวางของคอลลาเจนกับ EDC และ NHS.....	53
2.19 การเชื่อมขวางโควาเลนต์ระหว่าง chondroitin sulfate กับคอลลาเจน โดยใช้ EDC และ NHS.....	54
3.1 แผนผังการดำเนินการวิจัย.....	58
3.2 รูป ก. ท่อ PFA ข. ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นในท่อ PFA.....	64
3.3 ตำแหน่งที่ติดตัวอย่าง (ในวงรีสีน้ำตาล) ใน Plasma focus tube.....	65
3.4 การตัดตัวอย่างโปรตีนตัวเต็มที่ได้จากท่อ PFA เป็น 3 ส่วนคือ A, B และ C เพื่อใช้หาความสม่ำเสมอของระดับการเชื่อมขวางในตัวอย่างชิ้นเดียวกัน.....	66
3.5 แสดงภาพท่อนำเส้นประสาทบรรจุในถุง Polypropylene ก่อนการฝังใน สัตว์ทดลอง.....	68

ภาพประกอบ	หน้า
3.6 การตัดชิ้นตัวอย่างท่อนำเส้นประสาทที่เชื่อมต่อเป็นเวลา 1 เดือน.....	71
4.1 ขั้นตอนการศึกษาสมบัติของท่อนำเส้นประสาท.....	73
4.2 ระดับการเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มคอลลาเจน, เจลาตินชนิด A และเจลาตินชนิด B แบบพองน้ำที่เชื่อมขวางด้วยกลูรัลดีไฮด์ ทั้งก่อนและหลังการอบฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์	75
4.3 การปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ NGF และ bFGF จากโปรตีนตัวเต็ม.....	77
4.4 รั้อยละของการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ NGF และ bFGF จากโปรตีนตัวเต็ม.....	78
4.5 การเปลี่ยนแปลงสถานะตามอุณหภูมิของท่อ PLCL 75:25 ความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนักซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	80
4.6 การตัดตัวอย่างโปรตีนตัวเต็มที่ได้จากท่อ PFA เป็น 3 ส่วน.....	81
4.7 ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของคอลลาเจนจากการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอน.....	83
4.8 ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของเจลาตินชนิด A จากการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนของ.....	84
4.9 ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของเจลาตินชนิด B จากการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนของ.....	85
4.10 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนของโปรตีนตัวเต็ม.....	89
4.11 การเชื่อมขวางของโปรตีนตัวเต็มที่ผ่านการเชื่อมขวางรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของก๊าซอาร์กอนจากท่อนำเส้นประสาทจำลอง (Perfluoroalkoxy polymer (PFA), โปรตีนตัวเต็มในท่อนำเส้นประสาท PLCL และโปรตีนตัวเต็มในท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา.....	91
4.12 รูปถ่าย SEM ของท่อ PLCL ($M_w = 300,000$) 3 % โดยน้ำหนัก โดยการเปรียบเทียบวิธีการเตรียม Template ต่างกัน.....	93
4.13 รูปถ่าย SEM ของท่อ PLCL ($M_w = 300,000$) 4 % โดยน้ำหนัก โดยการเปรียบเทียบวิธีการเตรียม Template ต่างกัน.....	94
4.14 ภาพถ่าย SEM กำลังขยาย 15 เท่า ของท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนักที่บรรจุโปรตีนตัวเต็ม (0.8% โดยน้ำหนัก) ก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยรังสีเอ็กซ์จากพลาสมาของอาร์กอนที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา.....	96

ภาพประกอบ	หน้า
4.15 ความทนแรงดึงแบบแห้งและแบบเปียก (n=4) ของ ท่อ 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).....	101
4.16 แสดงกราฟโมดูลัสของความยืดหยุ่น (n=4) ของ ท่อ 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).....	102
4.17 แสดงกราฟเปอร์เซ็นต์ความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด (n=4) ของ ท่อ PLCL กลวง (Unfilled PLCL), ท่อ PLCLบรรจุคอลลาเจน (Collagen-filled PLCL), ท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด A (Gelatin A-filled PLCL) และท่อ PLCL บรรจุเจลาตินชนิด B (Gelatin B-filled PLCL).....	103
4.18 ปริมาณเซลล์สัมผัสของเซลล์ไลน์มาตรฐานของผิวหนังหนู บน Cover slip, ฟิล์มจาก PLCL 0.3%โดยน้ำหนัก, ฟิล์มจาก PLCL 3% โดยน้ำหนัก และ Zinc sulphate 0.3 %โดยน้ำหนักในน้ำที่แห้งบน Cover slip เวลา 5, 24 และ 72 ชั่วโมง (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 20,000 เซลล์/ตัวอย่าง) โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT.....	105
4.19 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า ของเซลล์ไลน์มาตรฐานผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblasts) บน Cover slip, ฟิล์มจาก PLCL 0.3% โดย น้ำหนัก, ฟิล์มจาก PLCL 3% โดยน้ำหนัก และ Zinc sulphate 0.3 %โดย น้ำหนักในน้ำที่แห้งบน Cover slip เวลา 5, 24 และ 72 ชั่วโมง.....	106
4.20 กราฟการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของท่อนำเส้นประสาท PLCL จากการ วิเคราะห์ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) ที่เวลา 0, 2, 4 และ 8 สัปดาห์.....	108
4.21 รูปถ่ายท่อนำเส้นประสาท PLCL ที่ปลูกถ่ายบนหลังหนู Wistar เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ก่อนถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย SEM และ GPC.....	109
4.22 ภาพถ่ายภายใต้กล้อง Scanning electron microscope (SEM) ของท่อ PLCL ที่ปลูกถ่ายบนหลังหนู Wistar เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 8 สัปดาห์.....	110

ภาพประกอบ	หน้า
4.23 รูปท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนัก บรรจุคอลลาเจน 0.8% โดย น้ำหนัก.....	112
4.24 รูปส่วนประกอบที่พบภายในท่อนำเส้นประสาท PLCL 3% โดยน้ำหนัก บรรจุ คอลลาเจน 0.8% โดยน้ำหนัก.....	112
4.25 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุ โปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/μl จากตัวอย่าง ท่อนที่ 1 หนูตัวที่ 1 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 250 กรัมเป็นเวลา 1 เดือน.....	115
4.26 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุ โปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/μl จากตัวอย่าง ท่อนที่ 1 หนูตัวที่ 2 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	116
4.27 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุ โปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/μl จากตัวอย่าง ท่อนที่ 1 หนูตัวที่ 3 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	117
4.28 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุ โปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/μl จากตัวอย่าง ท่อนที่ 2 หนูตัวที่ 1 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	118
4.29 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุ โปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/μl จากตัวอย่าง ท่อนที่ 2 หนูตัวที่ 2 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	119
4.30 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุ โปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/μl จากตัวอย่าง ท่อนที่ 2 หนูตัวที่ 3 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	120

ภาพประกอบ	หน้า
4.31 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/ μ l จากตัวอย่างที่ 3 หนูตัวที่ 1 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	121
4.32 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/ μ l จากตัวอย่างที่ 3 หนูตัวที่ 2 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	122
4.33 ภาพตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 และ 20 ของท่อ PLCL ซึ่งบรรจุโปรตีนตัวเต็มแล้วผ่านการเชื่อมขวางและดูดซับด้วย NGF 50 ng/ μ l จากตัวอย่างที่ 3 หนูตัวที่ 3 (n=3) ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ของหนู Wistar เพศผู้หนัก 250 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน.....	123
4.34 ภาพเส้นประสาทย้อมด้วยสี Toluidine blue (กำลังขยาย 20 เท่า) ภายในท่อนำเส้นประสาท PLCL สัดส่วน Lactide : caprolactone 50:50 ที่เชื่อมต่อเส้นประสาท sciatic ในหนู Wistar เป็นเวลา 2 เดือน ซึ่งมีการงอกของเส้นประสาทตามแนวขวางเป็นจำนวนมาก	124