



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลต
ที่บรรจุโปรตีนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

Evolution of Electrospun Eudragit RL100 blend poly (methyl methacrylate)
nanofibrous scaffolds loaded protein for neural tissue engineering

โดย

1. นสภ. ปิณณวัชร มหาศิริอภิรักษ์ รหัสนิต 59210041
2. นสภ. มาฆะเกษม ภาณุพงศ์พันธ์ รหัสนิต 59210190
3. นสภ. รัฐนันท์ ไทยตรง รหัสนิต 59210194

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาไครเลต
ที่บรรจุโปรตีนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

Evolution of Electrospun Eudragit RL100 blend poly (methyl methacrylate)
nanofibrous scaffolds loaded protein for neural tissue engineering

โดย

1. นสภ. ปิณณวัชร มหาศิริอภิรักษ์ รหัสนิต 59210041
2. นสภ. มาฆะเกษม ภาณุพงศ์พันธ์ รหัสนิต 59210190
3. นสภ. รัฐนันท์ ไทยตรง รหัสนิต 59210194

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาไครเลต
ที่บรรจุโปรตีนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

Evolution of Electrospun Eudragit RL100 blend poly (methyl methacrylate)
nanofibrous scaffolds loaded protein for neural tissue engineering

โดย

1. นสภ. ปิณณวัชร มหาศิริอภิรักษ์ รหัสนิสิต 59210041
2. นสภ. มาฆะเกษม ภาณุพงศ์พันธุ์ รหัสนิสิต 59210190
3. นสภ. รัฐนันท์ ไทยตรง รหัสนิสิต 59210194

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ในปัจจุบันกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์สามารถผลิตเส้นใยนาโนซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้อย่างหลากหลาย เช่น ระบบนำส่งยาหรือสารชีวโมเลกุล วัสดุป้องกันสารเคมี วัสดุปิดแผลและวิศวกรรมเนื้อเยื่อ พอลิเมอร์ที่นำมาสังเคราะห์เส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์สามารถใช้ได้หลากหลายชนิดควรมีสมบัติไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เข้ากันได้และย่อยสลายได้ในร่างกายมนุษย์

คณะผู้วิจัยเห็นว่า Eudragit RL100 มีสมบัติดังกล่าว แต่เมื่อนำมาผ่านกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์เพื่อสังเคราะห์เส้นใยนาโน พบว่ายังมีข้อด้อยในเรื่องของความแข็งแรงของเส้นใย จึงนำมาผสมกับพอลิเมทิลเมทาไครเลต ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติและโครงสร้างคล้ายกับ Eudragit RL100 แต่มีความแข็งแรงที่มากกว่า โดยการศึกษาของพอลิเมอร์ทั้งสองตัวนี้ยังมีไม่มาก คณะผู้วิจัยจึงนำพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดมาผสมกันและบรรจุโปรตีนที่มีสมบัติที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเส้นประสาทเพื่อศึกษาในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาท

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับผลิตกระบวนการเส้นใยและศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่บรรจุโปรตีนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาท

คณะผู้วิจัย

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง การพัฒนาโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุโปรตีนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. ปณิตวัชร มหาศิริอภิรักษ์ รหัสนิสิต 59210041
2. นสภ. มาฆะเกษม ภาณุพงศ์พันธุ์ รหัสนิสิต 59210190
3. นสภ. รัฐนันท์ ไทยตรง รหัสนิสิต 59210194

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภก.ผศ.ดร. ญัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์
2. ภญ.ผศ.ดร. สมาวดี เปี้ยนนวงษ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุ Nerve growth factors (NGFs) และประเมินการเจริญเติบโตและสัญญาณวิทยาของเซลล์ชวานน์บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ สังเกตขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย การเรียงตัวของเส้นใย และสัญญาณวิทยาของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) ตรวจสอบความเป็นผลึกของเส้นใยตรวจสอบด้วย Powder X-Ray Diffraction (PXRD) มุมสัมผัสของน้ำด้วยเครื่อง Drop shape analyzer ศึกษาปริมาณและการปลดปล่อยของ NGFs โดยอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (ELISA) ศึกษาการเจริญเติบโตเซลล์และสัญญาณวิทยาของเซลล์ชวานน์ด้วยวิธี Alamar blue assay และ SEM ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์อยู่ในช่วง 373.52 ± 50.52 ถึง $5,835.55 \pm 1,113.33$ นาโนเมตร โครงสร้างทางเคมีของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุ NGFs ไม่เปลี่ยนแปลง รูปแบบ PXRD ของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทั้งหมดด้วย Powder X-Ray Diffraction (PXRD) เป็นรูปอสัณฐาน โครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุ NGFs มีความชอบน้ำสูงกว่าโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์อื่น ปริมาณร้อยละ NGFs ในโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์อยู่ในช่วงร้อยละ 47.23 ± 4.71 ถึง 72.02 ± 0.83 จลนศาสตร์การปลดปล่อยของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่บรรจุ NGFs เป็นแบบจำลอง Higuchi การเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุ NGFs สูงที่สุดในวันที่ 4 ภาพถ่าย SEM แสดงการยึดเกาะของเซลล์ชวานน์บนโครงร่างเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุ NGFs ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์มีศักยภาพเพื่อนำไปใช้สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาท

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2020

: Evolution of Electrospun Eudragit RL100 blend poly (methyl methacrylate) nanofibrous scaffolds loaded protein for neural tissue engineering

By

1. Mr. Punawat Mahasiriapiruk ID 59210041
2. Mr. Maka-kasem Bhanupongpan ID 59210190
3. Mr. Rattanan Thaitrong ID 59210194

Advisor:

1. Assist. Prof. Dr. Natthan Charernsriwilaiwat
2. Assist. Prof. Dr Samarwadee Plianwong

Abstract

The objective of this research was to investigate the physical and chemical properties of the nanofibrous scaffolds of Eudragit RL100 blended polymethyl methacrylate loaded nerve growth factors (NGFs) and evaluated proliferation and morphology of rat Schwann cell on scaffolds. Fiber diameter, fiber orientation, and morphology of nanofibrous scaffolds were observed by scanning electron microscopy (SEM). Chemical structure of nanofibrous scaffolds was investigated by a Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), The crystallinity of scaffolds was performed by an X-ray diffraction (PXRD). Water contact angle was recorded by a drop shape analyzer. The NGFs content and releasing were investigated based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The proliferation and morphology of Schwann cells on scaffolds were demonstrated by Alamar Blue assay and SEM, respectively. The average diameter of nanofibrous scaffolds were in the range of 373.52 ± 50.52 to $5,835.55 \pm 1,113.33$ nm. The chemical structure of Eudragit RL100 blended polymethyl methacrylate loaded NGFs was not changed. All pattern of the powder X-ray diffraction (PXRD) nanofibrous scaffolds exhibited an amorphous form. The hydrophilicity of Eudragit RL100 blended polymethyl methacrylate nanofibrous scaffolds loaded NGFs was greater than another. The content (%) of nanofibrous scaffolds were in the range of 47.23 ± 4.71 to 72.02 ± 0.83 %. All release kinetics of nanofibrous scaffolds loaded NGFs were Higuchi model. At 4th day, the Schwann cell proliferation on Eudragit RL100 blended polymethyl methacrylate nanofibrous scaffolds loaded NGFs was the greatest. The SEM images showed that Schwann cells were adhered on the surface of nanofibrous scaffolds. In conclusion, the Eudragit RL100 blended polymethyl methacrylate nanofibrous scaffolds loaded NGFs promoted growth of Schwann cells. The previously mentions may have potential to apply for nerve tissue engineering.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา ภก.ผศ.ดร. ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆด้วยความเอาใจใส่ ให้ข้อเสนอแนะ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณ ภก.ฐาปกรณ์ เจริญยิ่ง ที่ช่วยแนะนำในส่วนขอเทคนิคการวิเคราะห์ต่าง ๆ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและความตั้งใจทุ่มเทเป็นอย่างยิ่ง ขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพาที่สนับสนุนเงินทุนในการศึกษาครั้งนี้และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ Fourier Transform Infrared (FTIR), X-ray diffractometer (XRD), อิเล็กโทรสปินนิง (Electrospinning) และเครื่อง Drop Shape Analyzer

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ค
บทคัดย่อ	ง
ABSTRACT	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฅ
สารบัญภาคผนวก	ฉ
สารบัญตารางภาคผนวก	ฐ
สารบัญรูปภาพภาคผนวก	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	45
บทที่ 4 ผลการวิจัย	57
บทที่ 5 สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย	73
เอกสารอ้างอิง	79
ภาคผนวก	88

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สมบัติของ Eudragit RL100	21
ตารางที่ 2 สมบัติของ Poly(methyl methacrylate) (PMMA)	23
ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ	57
ตารางที่ 4 แสดงความแตกต่างของแต่ละสภาวะการทดลองที่เลือกใช้ในการผลิตโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์	61
ตารางที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1, C2 และ C3	62
ตารางที่ 6 แสดงมุมของหยดน้ำที่อยู่บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์	69
ตารางที่ 7 แสดงปริมาณโปรตีนที่บรรจุบนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1, C2 และ C3	70
ตารางที่ 8 การปลดปล่อย NGFs จากโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ในช่วงเวลาต่าง ๆ	71

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของ Eudragit RL100	20
รูปที่ 2 โครงสร้างของ Poly(methyl methacrylate) (PMMA)	22
รูปที่ 3 Direct ELISA	37
รูปที่ 4 Indirect ELISA	37
รูปที่ 5 Competitive ELISA	38
รูปที่ 6 Sandwich ELISA	38
รูปที่ 7 Energy-Level diagram หรือ Jablonaski diagram	41
รูปที่ 8 Central Composite Design	43
รูปที่ 9 Box-Behnken design	43
รูปที่ 10 ความเข้มข้นของ protein standard	52
รูปที่ 11 Perturbation plot ของเส้นใย PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ	58
รูปที่ 12 Interaction plot ระหว่าง pairwise variables ของ เส้นใย PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ	58
รูปที่ 13 Response surface and contour plots for the mutual effects	59
รูปที่ 14 กราฟแสดงการวิเคราะห์เส้นผ่านศูนย์กลางของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์	60
รูปที่ 15 แสดงการทำนายสถานะที่เหมาะสมที่จะได้เส้นผ่านศูนย์กลาง 3,500 นาโนเมตร	61
รูปที่ 16 แสดงลักษณะทางกายภาพ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองค์การจัดเรียงตัวของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์	63
รูปที่ 17 ภาพถ่าย SEM แสดงลักษณะทางกายภาพของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่บรรจุโปรตีน Nerve Growth Factors (NGFs)	64
รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างผง C1 เส้นใย C1 และเส้นใย CL1	65
รูปที่ 19 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างผง C2 เส้นใย C2 และเส้นใย CL2	65
รูปที่ 20 กราฟเปรียบเทียบระหว่างผง C3 (Physical mixtures) เส้นใย C3 และเส้นใย CL3	66
รูปที่ 21 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C1 เส้นใย C1 และเส้นใย CL1	66
รูปที่ 22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C2 เส้นใย C2 และเส้นใย CL2	67

	หน้า
รูปที่ 23 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C3 (Physical mixtures) เส้นใย C3 และเส้นใย CL3	67
รูปที่ 24 แสดงมุมของหยดน้ำที่อยู่บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์	68
รูปที่ 25 การปลดปล่อยโปรตีนจากเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ในช่วงเวลาต่าง ๆ	70
รูปที่ 27 ภาพถ่าย SEM ของเซลล์ชวานน์	72

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
1. ลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์	89
2. ศึกษาหมู่โครงสร้างของผงและเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเครื่อง FTIR	93
3. ผลการทดสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของเส้นใยด้วยเครื่อง Powder X-Ray Diffraction (PXRD)	94
4. วิเคราะห์ปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ด้วยวิธี Alamar Blue assay	96
5. ศึกษาการปลดปล่อยของ Nerve Growth Factors (NGFs)	98

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โทรปินนิงและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โทรปินนิงที่บรรจุโปรตีน วันที่ 1	96
ตารางที่ 2 ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โทรปินนิงและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โทรปินนิงที่บรรจุโปรตีน วันที่ 4	97
ตารางที่ 3 ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โทรปินนิงและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โทรปินนิงที่บรรจุโปรตีน วันที่ 7	97

สารบัญรูปภาพภาคผนวก

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสเตอร์ของแต่ละสภาวะของการออกแบบการทดลอง	89
รูปที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสเตอร์ของแต่ละสภาวะของการออกแบบการทดลอง	90
รูปที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสเตอร์ของแต่ละสภาวะของการออกแบบการทดลอง	91
รูปที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสเตอร์ของแต่ละสภาวะของการออกแบบการทดลอง	92
รูปที่ 5 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างผง C1, C2 และ C3 (Physical mixtures)	93
รูปที่ 6 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างเส้นใย C1, C2 และ C3	93
รูปที่ 7 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างเส้นใย CL1, CL2 และ CL3	94
รูปที่ 8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C1, C2 และ C3 (Physical mixtures)	94
รูปที่ 9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างเส้นใย CL1, CL2 และ CL3	95
รูปที่ 10 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึก spectrum ระหว่างเส้นใย C1, C2 และ C3	95
รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของเซลล์	96
รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Nerve Growth Factors (NGFs)	98

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) เป็นกระบวนการที่แพร่หลายสำหรับการสร้างเส้นใย เนื่องจากมีกระบวนการที่ทำได้ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่าย หลักการคือการทำให้พอลิเมอร์อยู่ในรูปของสารละลายหรือหลอมเหลว จากนั้นใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเพื่อสะสมประจุให้แก่พอลิเมอร์ทำให้พอลิเมอร์หลุดลอยอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าแล้วไปเกาะยังวัสดุรองรับทำให้ได้เส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 3 นาโนเมตร ถึง 10 ไมโครเมตร (1, 2) วิธีการสร้างเส้นใยนาโนมีหลายวิธี ได้แก่ อิเล็กโตรสปินนิงแบบผสมผสาน (blend electrospinning) (3, 4) อิเล็กโตรสปินนิงแบบร่วมแกน (co-axial electrospinning) (5, 6) และอิมัลชันอิเล็กโตรสปินนิง (emulsion electrospinning) เป็นต้น (7, 8) กระบวนการสร้างโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินนิงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ อย่างหลากหลาย เช่น วัสดุกรองอากาศและฝุ่น เซลล์บรรจุไฟฟ้า วัสดุปกป้องพืช อุตสาหกรรมสิ่งทอ วัสดุป้องกันสารเคมีและคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า วิศวกรรมเนื้อเยื่อและระบบนำส่งยาหรือสารชีวโมเลกุล เป็นต้น (8) โครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินนิงสามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างโดดเด่นในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถเลียนแบบแมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular matrix, ECM) ของเนื้อเยื่อ ในแง่ของขนาดและสัญญาณวิทยาสามารถทำให้เซลล์สามารถเกาะติด (cell adhesion) เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่จำเพาะ (cell differentiation) ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้ซ่อมแซมเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อเส้นเอ็น (tendon tissue) เนื้อเยื่อผิวหนัง (skin tissue) เนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue) หลอดเลือด (vascular vessel) และเนื้อเยื่อประสาท (nerve tissue) การวิจัยด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาทด้วยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงที่มีการศึกษามาก คือ การสร้างท่อนำเส้นประสาท (nerve conduits) สำหรับการรักษาการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย (peripheral nerve injury) (9) เนื่องจากเส้นประสาทมีอัตราการงอกใหม่ที่ช้าโดยขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเส้นประสาท เส้นประสาทที่อยู่ในส่วน proximal segment จะมีอัตราการงอกที่ 2-3 มิลลิเมตรต่อวัน ในขณะที่เส้นประสาทที่อยู่ในส่วน distal

segment อาจงอกในอัตรา 1-2 มิลลิเมตรต่อวัน (10) การสร้างท่อนำเส้นประสาทด้วยกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่งจะเอื้อสภาพแวดล้อมให้เซลล์ชวานน์ (Schwann cells) สามารถเกาะติด ซึ่งเซลล์ชวานน์มีหน้าที่สร้างหรือซ่อมแซมเอกซอนและโมอีลินรวมถึงหลั่ง neurotrophic growth factors ทำให้ส่งเสริมการสร้างหรือซ่อมแซมโมอีลินและเอกซอน (11)

ปัจจุบันมีการนำพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ มาใช้ผลิตเส้นใยนาโนด้วยกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่งสำหรับสร้างท่อนำเส้นประสาท เช่น พอลิยูรีเทน (polyurethanes, PU) พอลิอะคริโลไนไทรล์ (polyacrylonitrile, PAN) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol, PVA) พอลิไกลโคลิก (polyglycolic acid, PGA) พอลิคาโพรแลคโตน (polycaprolactone, PCL) Eudragit RS100 และ Eudragit RL100 เป็นต้น (12) poly (ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammonioethyl methacrylate chloride) (Eudragit RL100) เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีความชอบน้ำ (hydrophilicity) มีความคงตัวในเอนไซม์ย่อยอาหารและของเหลวในร่างกาย ย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradable polymer) เป็นวัสดุปลอดสารพิษและไม่ระคายเคือง แต่อย่างไรก็ตามสมบัติทางด้านเชิงกลของ Eudragit RL100 มีความแข็งแรงค่อนข้างต่ำ และการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการซ่อมแซมเส้นประสาทของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่งที่เตรียมจาก Eudragit RL100 ยังมีน้อยมากคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่งจาก Eudragit RL100 สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาท ซึ่ง Eudragit RL100 มีข้อจำกัดด้านสมบัติเชิงกลที่มีความแข็งแรงของโครงร่างเส้นใยต่ำ คณะผู้วิจัยจึงสนใจพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งซึ่งมีโครงสร้างและสมบัติคล้ายกับ Eudragit RL100 คือ พอลิ เมทิลเมทาไครเลต (PMMA) เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) มีสมบัติเชิงกลที่ดี ความเป็นพิษต่ำ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อมนุษย์ดี ทนทาน และราคาไม่แพง มีรายงานการใช้ PMMA ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท จากงานวิจัยของ Haijian Xia และคณะ ปี ค.ศ. 2016 ได้สร้างเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่งเรียงตัวทางเดียว จาก PMMA สำหรับการเลี้ยงเซลล์ชวานน์ พบว่าเซลล์สามารถเกาะและยึดออกตามแนวเส้นใย (13) แต่อย่างไรก็ตามจากสมบัติที่ไม่ชอบน้ำทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ช้า (14, 15) และมีการศึกษาวิจัยนำ PMMA ทดสอบกับเส้นประสาทหมู่มื่อให้อุณหภูมิที่สูงขึ้นพบว่าการสร้างความเสียหายต่อระบบประสาท (16) นอกจากนี้การศึกษาประสิทธิภาพ PMMA สำหรับการซ่อมแซมเส้นประสาทยังมีน้อยเช่นกัน ทางคณะผู้วิจัยจึงหาแนวทางการพัฒนาสมบัติของโครงร่างเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่ง โดยในปัจจุบันมีวิธีการพัฒนาได้แก่ การปรับพารามิเตอร์ในกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่ง การออกแบบวัสดุรองรับการนำกระบวนการต่างชนิดมารวมกัน และ การผสมพอลิเมอร์ เป็นต้น (17) คณะผู้วิจัยจึงนำ Eudragit RL100 ผสมกับ PMMA เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลและสมบัติอื่นๆ นอกจากนี้มีการวิจัย

พบว่าโปรตีนกลุ่ม growth factors เช่น nerve growth factors (NGFs) สามารถเพิ่มการสร้างหรือซ่อมแซมไมอีลินและเอกซอน และควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ชวานได้ (18, 19)

คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเตรียมโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินจาก Eudragit RL100 ผสม PMMA และบรรจุ NGFs สำหรับการรักษาและซ่อมแซมการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย โดยทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อรูปแบบสัณฐานวิทยาของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินเพื่อหาเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย โดยใช้วิธีออกแบบการทดลองวิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (response surface methodology) ชนิด Central Composite Design และมีการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน ได้แก่ การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) การตรวจสอบความเป็นผลึกของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) ศึกษาปริมาณโปรตีนที่สามารถบรรจุได้ในโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน (% content) และการปลดปล่อยของโปรตีนโดยใช้วิธีการตรวจที่อาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (enzyme-linked immunosorbent assay) สดุดท้ายทำการศึกษากับเซลล์ชวานหนู ได้แก่ การเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธี Alamar blue assay และสัณฐานวิทยาของเซลล์บนเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาไครเลตที่บรรจุโปรตีนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาท
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาไครเลตที่บรรจุโปรตีน
3. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของเซลล์ชวานหนูบนโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาไครเลตที่บรรจุโปรตีน

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้โครงร่างเส้นใยนาโนจากอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ที่บรรจุโปรตีนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาท
2. ทราบสมบัติทางกายภาพและเคมีของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุโปรตีน
3. ทราบผลของการเจริญเติบโตและสัญญาณวิทยาของเซลล์ชวานน์บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุโปรตีน

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. นาโนเทคโนโลยี (nanotechnology)
2. อิเล็กโทรสปินนิง (electrospinning)
 - 2.1 ส่วนประกอบของเครื่องอิเล็กโทรสปินนิง
 - 2.2 ชนิดของอิเล็กโทรสปินนิง (type of Electrospinning)
 - 2.1.1 *fiber composition*
 - 2.1.2 *fiber orientation*
 - 2.3 พารามิเตอร์ของอิเล็กโทรสปินนิง (parameter of Electrospinning)
 - 2.4 การวิเคราะห์เส้นใย (analysis)
 - 2.4.1 *กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy : SEM)*
 - 2.4.2 *การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยนาโนด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR)*
 - 2.4.3 *การตรวจสอบความเป็นผลึกของเส้นใยนาโนด้วยเครื่อง Powder X-ray Diffraction (PXRD)*
 - 2.4.4 *การวัดสมบัติความชอบน้ำด้วยเครื่อง Drop Shape Analyzer*
3. Eudragit RL100 และ Poly(methyl methacrylate) (PMMA)
 - 3.1 สมบัติของ Eudragit RL100 (properties of Eudragit RL100)
 - 3.2 สมบัติของ Poly(methyl methacrylate) (properties of PMMA)
4. Growth Factors และ Stem cells

- 4.1 Growth factors
- 4.2 Stem cells
- 4.3 Schwann cells
- 5. การตรึงเซลล์ (Immobilization)
- 6. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein quantitative analysis)
 - 6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- 7. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)
 - 7.1 การวัดปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell proliferation)
 - 7.1.1 *Alamar Blue assay*
 - 7.2 คุณลักษณะสัณฐานของเซลล์ (Cell morphology)
 - 7.2.1 *ฟลูออเรสเซนซ์ไมโครสโคป (Fluorescent microscope)*
- 8. การออกแบบการทดลอง (Design of experiment: DOE)

1. นาโนเทคโนโลยี (nanotechnology)

“นาโน” มาจากภาษากรีกโบราณ มีความหมายว่าอนุภาคขนาดเล็กมากหรือแปลว่าแคระ (Nanos เป็นคำมาจากภาษากรีกสำหรับ “คนแคระ”) (20) ซึ่งในศตวรรษที่ 21 นาโนเทคโนโลยีได้รับการปฏิบัติอุตสาหกรรมในวงการวิทยาศาสตร์ เนื่องจากมีอิทธิพลเป็นอย่างมากต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์ในอนาคต นาโนเทคโนโลยีเป็นสาขาหนึ่งซึ่งเป็นการศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบที่มีขนาด 1-100 นาโนเมตร ซึ่งประกอบไปด้วย เส้นใยนาโน นาโนรูปแบบแท่ง นาโนรูปแบบเส้น นาโนคริสตัล นาโนโฟม ฯลฯ ซึ่งสมบัติของวัสดุนาโนนั้นต้องมีดังนี้ ขนาดอนุภาคระดับนาโน มีความแข็งแรงคงทน มีความเป็นรูพรุน สามารถปรับปรุงสมบัติทางพื้นผิวได้และมีความยืดหยุ่นสูง (21)

“นาโนเทคโนโลยี” หมายถึง เทคโนโลยีประยุกต์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์วัสดุและการผลิตวัสดุอุปกรณ์ในระดับของอะตอมหรือกลุ่มเล็ก ๆ ของอะตอม โดยทั่วไปแล้ว “ระดับนาโน (nanoscale)” จะมีการวัดออกมาในหน่วยนาโนเมตรหรือหนึ่งในพันล้านของหนึ่งเมตร (10^{-9} เมตร) ซึ่งจะส่งผลให้วัสดุหรืออุปกรณ์ต่าง ๆ มีหน้าที่ใหม่ ๆ และมีสมบัติที่พิเศษขึ้นทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ นาโนเทคโนโลยีได้กลายเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์และวิศวกรรมระดับนาโน ด้านอาหารและด้านการแพทย์ ตัวอย่างด้านการแพทย์เช่น การป้องกันโรค (disease prevention) การวินิจฉัย (diagnosis) การรักษา (treatment) การประยุกต์ใช้ในระบบนำส่งยา (drug delivery system) ระบบนำส่งโปรตีน (protein delivery system) และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นต้น ซึ่งวัสดุนาโนมีสมบัติพิเศษ ได้แก่ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และมีความเป็นพิษที่ต่ำกับร่างกายมนุษย์ (22)

1.1 ชนิดของวัสดุนาโน (Classification of nanomaterials)

วัสดุนาโนสามารถจำแนกหมวดหมู่ได้ดังต่อไปนี้

1.1.1 ท่อนาโน (nanotube) เส้นใยนาโน (nanofiber) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 100 นาโนเมตร

1.1.2 อนุภาคนาโน (nanoparticles) ทรงกลมกลวง (hollow spheres) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 100 นาโนเมตร (23)

1.2 เส้นใยนาโน (Nanofiber)

เส้นใยนาโนมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1 ถึง 100 นาโนเมตร เป็นวัสดุที่มีความน่าสนใจ ถูกใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ระบบนำส่งยา (Drug delivery system) วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue

engineering) ระบบนำส่งยีน (Gene delivery) ใช้ในการแพทย์ (Medication) รักษามะเร็ง (Cancer therapy) รักษาแผล (Wound healing) และระบบนำส่งโปรตีน (Protein delivery) (24) เป็นต้น ซึ่งเหตุผลที่ใช้ทางการแพทย์เนื่องจากมีความเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์ โดยเส้นใยนาโนทำหน้าที่เป็นระบบนำส่งยา สารชีวโมเลกุลและโปรตีน ยกตัวอย่าง ยาต้านมะเร็ง ยาต้านแบคทีเรีย โปรตีน และ DNA หรือ RNA นำส่งไปยังอวัยวะเป้าหมายที่มีความจำเพาะ เส้นใยนาโนสามารถนำไปใช้เป็นโครงร่างเพื่อนำส่งยีนและซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่มีความเกี่ยวข้องกับ Growth factors

ลักษณะของเส้นใยนาโน คือ มีพื้นที่ผิว (Surface area) มากจึงสามารถสร้างระบบนำส่งหรือนำส่งสารชีวโมเลกุล ยา และโปรตีนได้มาก สมบัติของเส้นใยนาโนสามารถย่อยสลายได้ นำความร้อนนำไฟฟ้าได้ วิธีการสร้างเส้นใยนาโน ได้แก่ การแยกเฟส (Phase separation), Template synthesis, Drawing, Melt blown technology และอิเล็กโตรสปินนิง (Electrospinning) เป็นต้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีอื่น พบว่า อิเล็กโตรสปินนิง (Electrospinning) นั้นเป็นวิธีที่ง่าย ทำได้ต่อเนื่อง ทำซ้ำได้หลายครั้ง นอกจากนี้วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายใน 10-20 ปีที่ผ่านมา (21)

2. อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning)

อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) เป็นกระบวนการที่แพร่หลายสำหรับการสร้างเส้นใยจากพอลิเมอร์ ซึ่งหลักการคือ การทำให้พอลิเมอร์อยู่ในรูปของสารละลายหรือหลอมเหลวก่อน จากนั้นทำให้อยู่ในรูปของเส้นใยในระดับไมโครเมตรหรือนาโนเมตร มีรายงานครั้งแรกที่เกิดขึ้นโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีประจุเข้าไปแล้วเกิดเป็นหยดหรือยึดของของเหลวในศตวรรษที่ 16 โดย William Gilbert (25) ต่อมาในปี ค.ศ. 1934 ได้มีการจดสิทธิบัตรของอิเล็กโตรสปินนิงเป็นครั้งแรกโดย Formhals นอกจากนี้ยังได้ใช้วัสดุรองรับที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (moveable thread-collecting device) เพื่อเก็บเส้นใยและเส้นใยที่ได้ยังอยู่ในรูปแบบเรียงตัวทางเดียว (aligned) นอกจากนี้ Formhals ได้ใช้สารละลายอะซิโตนและแอลกอฮอล์มาเป็นตัวทำละลายเพื่อที่จะสังเคราะห์เป็นเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตท (26)

ในปี ค.ศ. 1969 Taylor ได้ศึกษารูปทรงหยดของสารละลายพอลิเมอร์ที่อยู่บริเวณปลายของเข็มฉีดยาภายใต้สนามไฟฟ้า ซึ่งรูปทรงที่ได้เป็นรูปทรงกรวย (cone shape) หรือเรียกว่า “Taylor cone” และได้ค้นพบว่าต้องใช้มุม 49.3 องศา เพื่อความสมดุลระหว่างแรงดึงดูดของสารละลายพอลิเมอร์ที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า ในปีถัดมานักวิจัยได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาลักษณะสัณฐานของเส้นใยนาโนโดยใช้เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy)

:SEM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy :TEM) เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ X-ray diffraction :XRD) และเครื่องวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางความร้อน (Differential scanning calorimeter :DSC) เพื่อดูลักษณะของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน (2) อีก 2 ปีให้หลัง ปี ค.ศ.1971 Buumgarten ได้ทดลองการลดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย โดยการเพิ่มสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ยังทำการปรับสสารละลายให้มีความหลากหลายเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อให้ได้เส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 500 และ 1100 นาโนเมตร (2, 27)

การทำงานพื้นฐานของอิเล็กโทรสปินนิ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ แหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง (high voltage power supply) หลอดบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ที่ติดเข็มโลหะ (needle spinneret) และวัสดุรองรับ (grounded conductive collector) (28) โดยหลักการการทำงานพื้นฐานของอิเล็กโทรสปินนิ่ง คือ การให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงแก่สารละลายพอลิเมอร์หรือพอลิเมอร์หลอมเหลวซึ่งไหลผ่านเข็มโลหะ เมื่อความต่างศักย์ถึงจุด critical voltage จะเกิด “แรงผลักคูลอมบ์ (coulombic repulsion)” เท่ากับแรงตึงผิวของหยดสารละลายพอลิเมอร์เกิดเป็นรูปร่าง conical shaped หรือเรียกว่า Taylor cone และเมื่อความต่างศักย์มากกว่าแรงตึงผิวของสารละลายพอลิเมอร์ สารละลายพอลิเมอร์จะพุ่งออกมาจากปลายของ Taylor cone ไปตกที่วัสดุรองรับ โดยระหว่างเคลื่อนที่จะมีการระเหยของสารละลายพอลิเมอร์อย่างรวดเร็ว ซึ่งลักษณะของเส้นใยจะขึ้นกับพารามิเตอร์ ได้แก่ ความต่างศักย์ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ และระยะทางระหว่างปลายเข็มจนถึงวัสดุรองรับ เป็นต้น (29)

2.1 ส่วนประกอบของอิเล็กโทรสปินนิ่ง (30)

2.1.1 ครอบกฉีดยาที่บรรจุสาร (pump and Syringe)

ทำหน้าที่บรรจุสารละลายที่เตรียมในกระบวนการทำอิเล็กโทรสปินนิ่ง

2.1.2 เข็มฉีดยา (needle gauge)

หัวเข็มฉีดยามีหลายขนาด เช่น เบอร์ 19 เบอร์ 20 และ เบอร์ 23 เป็นต้น

2.1.3 พาวเวอร์ซัพพลาย (power Supply)

เป็นเครื่องให้กำเนิดไฟฟ้าเพื่อให้เกิดการสปินสารออกมาเป็นเส้นใย

2.1.4 วัสดุรองรับ (collector)

มีลักษณะเป็นกระดานฉีกราบ ใช้เก็บตัวอย่างเส้นใยที่ผ่านการทำอิเล็กโทรสปิน โดยมียูด้วยกัน 2 แบบ คือ static และ dynamic (30)

2.2 ชนิดของอิเล็กโทรสปินนิง (type of Electrospinning)

2.2.1 Fiber composition

2.2.1.1 Blend Electrospinning

หลักการเบื้องต้นของอิเล็กโทรสปินนิงแบบผสมผสาน (Blend electrospinning) คือ การผสมส่วนผสมต่าง ๆ ให้อยู่กันเป็นเนื้อเดียวและอยู่ในสารละลายนั้น ๆ เพียงชนิดเดียว โดยใช้เทคนิคการทำนาโนเพื่อเป็นเส้นใยจากหลากหลายวัสดุ และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงโดยเมื่อสนามไฟฟ้ามากพอที่จะชนะแรงตึงผิวแล้ว ประจุของสารละลายพอลิเมอร์ไปอยู่บริเวณปลายของเข็มจากนั้นสารละลายพอลิเมอร์จะหลุดออกมาและอยู่ในรูปของ “Taylor cone” และยี่ดออกมาและลอยไปสะสมอยู่บริเวณหัวสุรอรรับ

อิเล็กโทรสปินนิงแบบผสมผสาน เป็นวิธีการที่ง่ายซึ่งยาหรือสารชีวโมเลกุลจะถูกกระจายหรือละลายในสารละลายพอลิเมอร์ ทำให้เกิดเส้นใยที่มียาหรือสารชีวโมเลกุลกระจายอยู่ทั่วเส้นใย

แม้ว่าจะจะเป็นวิธีที่ง่ายแต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเทียบกับอิเล็กโทรสปินนิงวิธีอื่น อิเล็กโทรสปินนิงแบบผสมผสานจะทำให้ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการกระจายสารชีวโมเลกุลสามารถเกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีนหรือสูญเสียสมบัติทางชีวภาพ นอกจากนี้ประจุโดยธรรมชาติของสารชีวโมเลกุลสามารถส่งผลทำให้เกิดการกระจายตัวบนพื้นผิวของมากกว่าเกิดการห่อหุ้มบนเส้นใย ซึ่งการกระจายบนพื้นผิวของเส้นใยเกี่ยวข้องกับปลดปล่อยของสารชีวโมเลกุล ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีนี้ได้จะต้องไม่ทำลายยาหรือสารชีวโมเลกุล อิเล็กโทรสปินนิงแบบผสมผสานถูกทดสอบในการใช้กับยาหรือสารชีวโมเลกุลอย่างกว้างขวาง เช่น ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ยามะเร็ง ยาต้านอักเสบ Growth factors และอื่น เป็นต้น (3, 4)

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยของ Marziyeh Jannesari กล่าวถึงการนำ Poly(vinyl alcohol)/Poly(vinyl acetate) มาผ่านกระบวนการอิเล็กโทรสปินนิงเป็นแผ่นแปะแผลสำหรับควบคุมการปลดปล่อยของตัวยา (31) งานวิจัยของ Dorati ปี 2018 ได้นำสารละลายพอลิเมอร์ผสมระหว่าง เกลือไคโตซาน และ Polylactide-Co-Polycaprolactone (PLA-PCL) มาทำการอิเล็กโทรสปินนิง เพื่อดูการเกิดเส้นใยนาโนและสมบัติและความคงตัวของไคโตซาน ซึ่งผลการทดลองได้พบว่าได้เส้นใยนาโน ของ PLA-PCL/Chitosan และมีขนาดของเส้นใยนาโนอยู่ในช่วง 800 นาโนเมตร เมื่อมาดูปริมาณไคโต

ชานในเส้นใยนาโนพบว่ามีความหนาแน่น 27.2 % (w/w) และมีความหนาแน่น 6 % (w/w) ที่พื้นผิว (32) งานวิจัยของณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์ กล่าวถึงการนำอิเล็กโทรสปินนิงแบบผสมผสานแบบสุ่ม และแบบทางเดียว มาเป็นวิธีในการสังเคราะห์เส้นใยนาโนด้วยพอลิเมอร์ Eudragit RS100 และ Eudragit RL100 ในการซ่อมแซมเส้นใยประสาท ได้ผลการวิจัยคือ เส้นใยนาโนเรียงตัวแบบสุ่มและทางเดียวจาก Eudragit RS100 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 504.82 – 552.19 นาโนเมตร และเส้นอิเล็กโทรสปินนิงเรียงตัวแบบสุ่มและทางเดียวจาก Eudragit RL100 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 492.06 – 500.10 นาโนเมตร และเซลล์สามารถเจริญเติบโตทางเดียวตามแนวของเส้นใยนาโนของพอลิเมอร์ทั้งสอง (33)

ข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ปรับเปลี่ยนสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางเคมีและสมบัติเชิงกลของเส้นใยนาโนที่ใช้สำหรับการนำส่งยา มีประโยชน์ในการพัฒนาสูตรตำรับการควบคุมการปลดปล่อยของยา ซึ่งอัตราการปลดปล่อยสามารถปรับเปลี่ยนได้โดยทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการผสม

ข้อเสีย คือ ถ้าเป็นสารชีวโมเลกุล ตัวอย่างเช่น กรดไขมันที่จำเป็น วิตามิน ฟลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระ วิธีนี้จำเป็นที่จะต้องละลายในสารละลายก่อน โดยการกระจายของสารชีวโมเลกุลในเส้นใยจะโดนอิทธิพลของสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารละลายที่มีอันตรกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และอาจจะไปยับยั้งการทำงานของสารชีวโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์หรือเปปไทด์ (4, 5)

2.2.1.2 Co-Axial Electrospinning

Co-Axial Electrospinning เป็นวิธีการที่จะปรับปรุงคุณภาพและสมบัติของเส้นใยนาโน และถูกพัฒนาขึ้นเพื่อสังเคราะห์ Core-Shell Nanofibers โดยหลักการเบื้องต้น คือ สารละลายพอลิเมอร์จะไม่ถูกผสมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยพอลิเมอร์แต่ละชนิดจะถูกบรรจุลงในเข็มฉีดยา และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงเพื่อสังเคราะห์เป็นเส้นใยนาโน (4)

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยของ Hong Zhang นำพอลิเมอร์มาสปินนิงด้วยวิธี Coaxial electrospinning โดยใช้ อิมัลชัน หรือเจลโคโตซานเป็นแกนกลางและ PELCL เป็นเปลือกสำหรับการนำส่ง Basic Fibroblast Growth Factor เพื่อควบคุมการปลดปล่อยและซ่อมแซมเส้นใยประสาท (34) งานวิจัยของ Amir Ehsan Torkamani ในปี 2018 กล่าวถึงการนำ Co-Axial Electrospinning มาสังเคราะห์เส้นใยที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยของสาร Polyphenolic Antioxidants ที่ได้มาจากต้นมะระขี้นก (35)

ข้อดีของวิธีการนี้ ยาหรือสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในแกนกลาง (Core) จะถูกป้องกันโดยมีเปลือก (Shell) ที่เป็นพอลิเมอร์และสามารถควบคุมการปลดปล่อยของยาหรือสารชีวโมเลกุล ข้อเสียของวิธีการนี้ จำเป็นจะต้องใช้หัวเข็มที่มีลักษณะจำเพาะและเทคนิคในการ สปินในลักษณะต่าง ๆ เพื่อจะได้เส้นใยที่มีสมบัติพิเศษ (5)

2.2.1.3 Emulsion Electrospinning

อิมัลชันอิเล็กโทรสปินนิงมีความแตกต่างกับการอิเล็กโทรสปินนิงแบบผสมผสาน คือมีการใช้พอลิเมอร์ในรูปแบบอิมัลชันแทนการใช้รูปแบบสารละลายโดยใช้อิมัลซิฟายเออร์ ใน ขั้นตอนและกระบวนการการเกิดเส้นใย ซึ่งความต่างศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงจะมีผลต่อการ ส่งเคราะห์เส้นใยนาโนทำให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ลดลง นอกจากนี้พารามิเตอร์อื่น ๆ เช่น อัตราการไหลและระยะทางการสปินเส้นใยส่งผลต่อรูปร่างของเส้นใยนาโน ซึ่งวิธีนี้เหมาะ สำหรับยาที่ไม่ละลายในน้ำและมีความเป็นพิษสูง

จากการทบทวนวรรณกรรมของ Cen Zhang ในปี 2017 ได้ทำการเตรียม อิมัลชันแบบ w/o emulsion โดยใช้ oleic acid-coated magnetite iron oxide nanoparticle และทำการสร้างเส้นใยโดยใส่ Vancomycin Hydrochloride โดยใช้ อิมัลชันอิเล็กโทรสปินนิงซึ่งผลที่ได้คือ เส้นใยมีความแข็งแรงและการฉีกขาดของเส้นใยเกิดได้ น้อยกว่าเส้นใยที่สังเคราะห์จากวิธีอิเล็กโทรสปินนิงแบบผสมผสาน (Blend electrospinning) (7)

ข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่าย มีความสามารถในการทำซ้ำได้ สามารถใช้สารละลายพอลิ เมอร์ที่ไม่เข้ากันมาใช้ร่วมกันได้โดยใช้สารก่ออิมัลชัน (Emulsifying agent) เป็นสารช่วยที่ทำให้ สารละลายสามารถเป็นเนื้อเดียวกันได้และวิธีนี้สามารถใช้กับสารละลายพอลิเมอร์ที่ไม่ ละลายในน้ำได้

ข้อเสีย คือ มีขั้นตอนที่ซับซ้อนเมื่อมีแกนกลาง (Core) มากกว่าหนึ่งแกนกลาง (Core) การใช้สารละลายพอลิเมอร์ตัวเดียวจะมีประสิทธิภาพและความคงตัวของอิมัลชันจะ ต่ำกว่าการใช้สารละลายพอลิเมอร์ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป (6, 7)

2.2.2 Fiber orientation

2.2.2.1 Rotating mandrel alignment

Rotating mandrel alignment คือ การใช้วัสดุรองรับแบบหมุนที่ใช้กันทั่วไป ซึ่ง สามารถเก็บเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินให้เรียงตัวในทางเดียว (align) โดยการเรียงตัวทาง เดียวจะมีผลต่อสมบัติเชิงกลของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน ทำให้มีเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน

ความคงทน แข็งแรงกว่าการใช้วัสดุรองรับที่เก็บเส้นใยแบบสุ่ม (random) โดยถ้าใช้ความเร็วในการหมุนที่ 500-4500 rpm จะทำให้เส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ มีการเรียงตัวในทางเดียวกันมากขึ้น (4)

การเรียงตัวของเส้นใยนั้นขึ้นอยู่กับความเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับซึ่งจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กรณี

1. ถ้าความเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับช้าเกินไปจะไม่เกิดการเรียงตัวของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ อบนวัสดุรองรับ
2. ถ้าความเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับเพิ่มขึ้นจนถึงจุดวิกฤติของความเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับจะเพิ่มการเรียงตัวของเส้นใยบนวัสดุรองรับได้ดีขึ้น
3. ถ้าหากความเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับมากเกินไปจนถึงจุดวิกฤติของความเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับจะทำให้การเรียงตัวของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ลดลงเนื่องจากโครงสร้างของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์เกิดการฉีกขาดและมีการรบกวนของอากาศบริเวณรอบของวัสดุรองรับ (36)

ข้อดีของวิธีการนี้คือ ทำให้เพิ่มค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) และเพิ่มความเค้นแรงดึง (tensile stress) เมื่อเปรียบเทียบกับแบบสุ่ม (random) และเพิ่มคุณสมบัติของเส้นใย (4)

ข้อเสียของวิธีการนี้คือ มีพอลิเมอร์บางชนิดที่ไม่สามารถทำอิเล็กทรอนิกส์ได้โดยใช้วัสดุรองรับแบบหมุน ถ้าหากเป็นเส้นใยที่มีความเปราะจะทำให้ง่ายต่อการฉีกขาดในขณะที่ใช้ความเร็วต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ที่มีความยืดหยุ่นสูง การใช้วัสดุรองรับแบบหมุนใช้เวลาและสิ้นเปลืองพลังงาน นอกจากนี้จำเป็นที่จะต้องมีความควบคุมดูแลด้วย (36)

2.3 พารามิเตอร์ของอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่ง (parameter of Electrospinning)

2.3.1 Solutions variables

2.3.1.1 ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ (concentration of solutions)

ความเข้มข้นของสารละลายมีความสัมพันธ์ในการเกิดเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์เป็นอย่างมาก โดยความเข้มข้นต่ำ จะทำให้มีความหนืดต่ำ แรงตึงผิวต่ำ มีการไหลดีขึ้นและเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยจะลดลง แต่ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะทำให้ความหนืดสูงขึ้นและเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์จะเพิ่มขึ้น สามารถทำให้เกิดรูปเม็ดบีดเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ได้ แต่อย่างไรก็

ตามถ้าความเข้มข้นมีความเหมาะสมจะทำให้เกิดเส้นใยนาโนที่มีความเรียบเนียน และสวยงาม (2)

2.3.1.2 ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลายพอลิเมอร์ (conductivity)

การเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายได้ถูกนำมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพของเส้นใย เช่น การเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายจะทำให้เม็ดบีดตกลงและเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินเล็กลง เพิ่มความยืดของสารละลายเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินเนื่องจากประจุที่เพิ่มขึ้น (21)

พอลิเมอร์ที่ใช้ในการทำเส้นใยนาโนส่วนใหญ่แล้วจะมีความสามารถนำไฟฟ้า และมักมีประจุ ซึ่งมีความสำคัญในการเกิดเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินที่ออกจากปลายเข็ม (polymeric jet) ดังนั้นในการทำเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินต้องคำนึงถึงชนิดของพอลิเมอร์และตัวทำละลายที่ใช้ ซึ่งจะสามารถทำนายความสามารถการนำไฟฟ้าของสารละลาย โดยทั่วไปแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินจะลดลงเมื่อเพิ่มความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลาย แต่ในทางกลับกันถ้าสารละลายมีสมบัติในการนำไฟฟ้าต่ำ ก็จะทำให้เส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินที่ได้ออกมามีเม็ดบีดเกิดขึ้น (21)

ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลายพอลิเมอร์สามารถเพิ่มได้โดยการเติมสารละลายเจือจาง กรด เบส หรือ ionic salts เช่น NaCl, H₂SO₄, HCl, NaOH, KOH, FeCl₃ และ KH₂PO₄ (2)

2.3.1.3 ลักษณะการไหลของพอลิเมอร์ (rheological properties)

สารละลายที่ความหนืดสูงไม่สามารถออกมาจากเข็มฉีดได้ แต่ถ้าสารละลายมีความหนืดต่ำจะไม่สามารถก่อเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินได้

2.3.1.4 อัตราการไหลของสารละลายพอลิเมอร์ (flow rate)

อัตราการไหลของสารละลายพอลิเมอร์มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางความเป็นรูพรุนและรูปร่างของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของพอลิเมอร์จะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางและรูพรุนที่มีขนาดเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังส่งผลให้เกิดเม็ดบีดบนเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินมากขึ้น ดังนั้นในการสปินเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินควรมีอัตราการไหลของสารละลายพอลิเมอร์ที่เหมาะสม (21)

2.3.1.5 ความสามารถในการระเหยของตัวทำละลาย (volatility of solvent)

ความสามารถในการระเหยของตัวทำละลายจะต้องอยู่ในช่วงที่แน่นอน ยิ่งตัวทำละลายมีความสามารถในการระเหยสูงจะส่งผลให้เส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นมีลักษณะเป็นริบบิ้น แบน มีรูพรุนบนผิว สารละลายที่เตรียมจากตัวทำละลายที่มีความสามารถในการระเหยที่ต่ำมากอาจส่งผลให้เส้นใยเปื่อย หลอมรวมกันหรือไม่สามารถกลายเป็นเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นได้ ในทางตรงข้ามตัวทำละลายที่มีความสามารถในการระเหยสูงอาจส่งผลให้การปั่นเส้นใยหยุดนิ่งชั่วคราวเนื่องจากเกิดการแข็งตัวของพอลิเมอร์ที่ปลายเข็ม (1)

2.3.1.6 ความหนืดของสารละลาย (viscosity)

ความหนืดของสารละลายส่งผลถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเช่นกัน ความหนืดที่สูงขึ้นของสารละลายจะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเพิ่มขึ้น เกิดรูพรุนและเม็ดบีดลดลง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อความหนืดสูงขึ้นการจ่ายไฟเริ่มต้นของการปั่นเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นอาจไม่เพียงพอที่จะยึดพอลิเมอร์ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตามต้องการได้ (37) ในกรณีที่ความหนืดต่ำ เส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นที่ออกมาจากปลายเข็มจะเกิดการรวมกันทำให้เกิดเม็ดบีดเป็นจำนวนมาก ผลลัพธ์ที่ได้คือเกิดการกระจายของเส้นใยที่ออกมาจากปลายเข็ม (2)

$$d = 19.49\eta^{0.43}$$

N คือ ความหนืดของสารละลาย และ d คือเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยนาโน (nm)

2.3.2 *Electrospinning variables*

2.3.2.1 ศักย์ไฟฟ้า (voltage)

การให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเข้าไปจะส่งผลต่อกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์ปั่นนิ่ง โดยมีความเกี่ยวข้องกับประจุในสารละลาย การเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มความเร่งให้กับเส้นใยและผลลัพธ์ที่ได้ คือ จะให้เพิ่มปริมาณของสารละลายออกมาจากหัวเข็ม มีงานวิจัยที่กล่าวไว้ถึงการใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงไว้ว่า การใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงจะทำให้เกิดการยึดของสารละลายทำให้ เส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นที่ได้มีความบาง นอกจากนี้การเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ลดระยะเวลาการเดินทางของเส้นใยไปยังวัสดุรองรับ นอกจากนี้ยังอาจจะเกิดเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นที่ออกมาจากปลายเข็มเป็นหลายสายได้ (multiple jets) ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการ

แต่ถ้าหากศักย์ไฟฟ้าต่ำเกินไปจะส่งผลให้เกิดการตีกลับของแรงดึงผิวสารละลายทำให้ได้เส้นใยที่มีลักษณะเป็นเม็ดบีทขึ้นได้ (1)

2.3.2.2 อัตราการป้อนสารละลาย (feed rate)

อัตราการป้อนสารละลายจะต้องเหมาะสมไม่เร็วจนเกินไป ถ้าใช้อัตราการป้อน สารละลายที่เร็วเกินไปจะก่อให้เกิดความไม่สมดุลของสารละลายที่ป้อนผ่านเข็มฉีดยา โดยจะทำให้เกิดเป็นเม็ดบีทบนผิวของเส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินเนื่องจากความต่างศักย์ไฟฟ้าไม่มีแรงมากพอที่สามารถพาสารละลายทั้งหมดถึงวัสดุรองรับได้ และถ้าอัตราการป้อนที่สูงเกินไปจะส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพิ่มขึ้นด้วยการใช้สารละลายอินทรีย์เป็นตัวทำละลายพอลิเมอร์ช่วยให้อัตราการป้อนสารละลายเร็วขึ้นเพราะสารละลายอินทรีย์ระเหยได้อย่างรวดเร็ว (1, 21)

2.3.2.3 ระยะห่างระหว่างปลายเข็มและวัสดุรองรับ (tip to collector distance)

ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับวัสดุรองรับ มีผลต่อเส้นทางและเวลาในการเดินทางก่อนที่จะตกบนวัสดุรองรับ ถ้าความต่างศักย์คงที่ความแรงของสนามไฟฟ้าจะแปรผกผันตามระยะทาง ในการตั้งค่าการสปินเส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินของไฟฟ้าสถิตจะตั้งค่าระยะห่างอยู่ที่ 10 ถึง 15 เซนติเมตร ซึ่งโดยทั่วไปจะเป็นระยะทางที่พอจะให้ตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอจนแห้ง ยิ่งไปกว่านั้นในกรณีที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ ณ ขณะที่ระยะห่างต่าง ๆ เส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินมีลักษณะ และรูปแบบที่คล้ายกันซึ่งเมื่อเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าและกำหนดให้ระยะห่างคงที่ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน การเพิ่มระยะห่างจะลดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปิน อย่างไรก็ตามนอกเหนือจากระยะทาง เส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยเพิ่มขึ้นเนื่องจากความแรงสนามไฟฟ้าที่ลดลงอีกด้วย (1)

2.3.2.4 การเลือกวัสดุรองรับ (collector)

สำหรับการเริ่มต้นการสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินนั้น ต้องมีสนามไฟฟ้าที่เคลื่อนที่ระหว่างแหล่งกำเนิดความต่างศักย์ไฟฟ้าและวัสดุรองรับ ดังนั้นวัสดุรองรับส่วนใหญ่จะต้องเป็นวัสดุที่นำไฟฟ้า ในกรณีที่ใช้วัสดุรองรับที่ไม่นำไฟฟ้า จะทำให้ได้เส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินบนวัสดุรองรับมีความหนาแน่นในการรวมกลุ่ม (packing density) น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุรองรับที่นำไฟฟ้า (38) ในการเลือกวัสดุรองรับมีผลต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยนาโนอิเล็กโตรสปินและมีผลต่อ

ลักษณะสำคัญของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินที่ได้ เนื่องจากวัสดุรองรับ (collector) จะมีอิทธิพลต่อความสามารถในการจับประจุบริเวณโลหะ (grounding electrode) ที่เป็นส่วนจับประจุไฟฟ้า ในกรณีที่วัสดุรองรับ (collector) สามารถนำประจุไฟฟ้าได้น้อย จะส่งผลให้เก็บเส้นใยนาโนได้ปริมาณน้อยลงหรืออาจไม่สามารถเก็บเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินได้ เนื่องจากประจุไม่สามารถเคลื่อนที่ไปอีกขั้วหนึ่งได้ (28)

2.3.3 Environment Variables

2.3.3.1 สภาวะความชื้นขณะปั่นเส้นใย (humidity)

ความชื้นที่สูงและต่ำเกินไปจะทำให้เส้นใยมีขนาดใหญ่ และเกิดการตกตะกอนของพอลิเมอร์อย่างรวดเร็วเมื่อน้ำเกิดการควบแน่นอยู่ผิวของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความชื้นสัมพัทธ์สูงจะส่งผลให้เส้นใยหนาตัวขึ้น ในขณะที่ความชื้นต่ำตัวทำละลายจะมีการระเหยเร็วขึ้นและอัตราการแข็งตัวเพิ่มมากขึ้นซึ่งทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินเพิ่มขึ้น (1) จากงานวิจัยของ Wang ในปี ค.ศ. 2019 พบว่าความชื้นมีผลต่อเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินจาก PMMA โดยเปรียบเทียบระหว่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินที่ได้รับความชื้น 70% พบว่ามีความพรุนสูงเมื่อเทียบกับเส้นใยที่ได้รับความชื้น 25% (39)

2.3.3.2 อุณหภูมิขณะปั่นเส้นใย (temperature)

การเพิ่มอุณหภูมิมีผลกระทบต่อสารละลายพอลิเมอร์ ได้แก่ 1.เพิ่มอัตราการระเหยของตัวทำละลาย 2.ลดความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์เป็นผลทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินลดลงและสารละลายกระจายเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น (1) อีกทั้งอุณหภูมิจะช่วยปรับปรุงความสามารถในการละลายของสารละลายพอลิเมอร์ (38)

2.4 การวิเคราะห์เส้นใย (Analysis)

2.4.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy : SEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงในการตรวจสอบวัตถุ ซึ่งใช้อิเล็กตรอนแทนแสงธรรมดา เนื่องจากความยาวคลื่นของลำอนุภาคอิเล็กตรอนสั้นกว่าความยาวคลื่นแสงถึง 100,000 เท่า ทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีประสิทธิภาพในเรื่องของกำลังขยาย และแจกแจงรายละเอียดได้มากกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยสามารถแยก

รายละเอียดของวัตถุที่เล็กขนาด 10 อังสตรอม หรือ 0.1 นาโนเมตร แต่กล้องจุลทรรศน์ทั่วไป จะแจจจายรายละเอียดได้ประมาณ 0.2 ไมโครเมตร กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราด (SEM) จะมีกำลังขยายสูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร ในการเตรียมตัวอย่างต้องทำให้มี ขนาดบาง และจะทำการสร้างภาพโดยตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากผิวหน้าของตัวอย่างที่ ทำการสำรวจ ซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM จะเป็นภาพลักษณะ 3 มิติ ดังนั้น กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy : SEM) จะถูกนำมาใช้ใน การศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้าน นอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของโลหะและวัสดุ เป็นต้น

หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy : SEM) ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิต อิเล็กตรอน โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่ม อิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็น ลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามที่ต้องการ หาก ต้องการภาพที่มีความคมชัดจะปรับให้ลำอิเล็กตรอนมีขนาดเล็ก หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนจะ ถูกปรับระยะโฟกัสโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ลงไปบนผิวชิ้นงานที่ต้องการศึกษา หลังจากลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนชิ้นงานจะทำให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (secondary electron) จากนั้นสัญญาณจากอิเล็กตรอนจะถูกบันทึก เปลี่ยนเป็นสัญญาณอิเลกทรอนิกส์และ แสดงภาพขึ้นบนหน้าจอต่อไป (18)

2.4.2 ฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared: FTIR)

เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบอินทรีย์ โดยอาศัย หลักการของการดูดกลืนคลื่นรังสีช่วงกลางอินฟราเรด (Middle infrared region) ประมาณ $400-4000\text{ cm}^{-1}$ เมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรดที่มีความถี่ตรงกับความถี่ ของการสั่น (stretching) หรือการหมุน (bending) ของพันธะโคเวเลนต์ในโมเลกุล จะทำให้ โมเลกุลดังกล่าวเกิดการดูดกลืนแสง IR และมีการเปลี่ยนแปลงค่าโมเมนต์ขั้วคู่ (dipole moment) ของโมเลกุลจากนั้นจะวัด ค่าความเข้มแสงต่อความถี่หรือความยาวคลื่น (wave number) ได้ออกมาเป็นสเปกตรัม ซึ่งแต่ละพันธะของหมู่ฟังก์ชันจะแสดงค่าความยาวคลื่น

เฉพาะที่ต่างกัน และสามารถใช้กับตัวอย่างได้ทั้ง 3 สถานะ ซึ่งโดยวิธีทั่วไปจะนำสารตัวอย่างที่อยู่ในรูปของแข็งไปบดกับโพแทสเซียมโบรไมด์ แต่ถ้าหากตัวอย่างเป็นของเหลวก็จะทำการหยดสารไประหว่างแผ่นโพแทสเซียมโบรไมด์ หรือแผ่นเกลือรูปอื่น ซึ่งการวิเคราะห์ด้วย FTIR นั้นเพื่อดูว่าเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงหมู่โครงสร้างหรือแสดงหมู่ที่สำคัญเพื่อดูว่าสารนั้นยังคงมีอยู่ (19)

2.4.3 การตรวจสอบความเป็นผลึกของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเครื่อง Powder X-ray Diffraction (XRD)

เทคนิคเอกซเรย์ดิฟแฟรคชัน (Powder X-ray Diffraction) หรือเทคนิค PXRD เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่นำรังสีเอ็กซ์ มาใช้วิเคราะห์สารประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างซึ่งจะสามารถบอกถึงมิติของหน่วยเซลล์ (Unit cell) บอกถึงโครงสร้าง การเรียงตัวของผลึก พื้นผิวและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างต่างๆ เช่น ค่าเฉลี่ยของโมเลกุลที่เล็กที่สุดของผลึก (grain size) ความเป็นผลึก (crystallinity) ความเครียด (strain) ความบกพร่องของผลึก (crystal defect) เป็นต้น ซึ่งหลักการทำงานของ X-Ray Diffraction เกิดจากการหักเหของรังสี X-ray ที่มีแหล่งกำเนิดจากหลอดรังสีแคโทด (cathode ray tube) ซึ่งจะมีตัวกรองแสง (filter) เพื่อที่จะสร้างรังสีที่มีความยาวคลื่นเดียว (monochromatic beam) ไปยังสารตัวอย่าง (sample) และเกิดอันตรกิริยากันของรังสีตกกระทบ (incident rays) กับตัวอย่างทำให้เกิดการเลี้ยวเบนของรังสี (diffraction) หลังจากนั้นรังสี x-ray ที่มีความยาวคลื่นเดียว (monochromatic beam) จะเกิดการกระเจิง (scattered) ที่มีมุมที่มีลักษณะจำเพาะตามโครงสร้างของผลึกทำให้ได้ลักษณะกราฟ x-ray ที่แตกต่างกันตามไปด้วย (40)

2.4.4 การวัดสมบัติความชอบน้ำด้วยเครื่อง Drop Shape Analyzer

เทคนิคการวิเคราะห์การหยดตัวของของเหลว (Drop shape analysis) ได้ถูกค้นพบจาก Neumann และคณะโดยทำการวิเคราะห์รูปร่างลักษณะของหยดเรียกว่า Asymmetric Drop shape Analysis (ADSA) โดยแรงตึงผิว (surface tension) จะสามารถคำนวณได้จาก ADSA conjunction ซึ่งจะขึ้นอยู่กับ การเรียงของหยด เช่น pendant drop, sessile drop, captive bubble ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายและใช้กันอย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์แรงตึงผิว

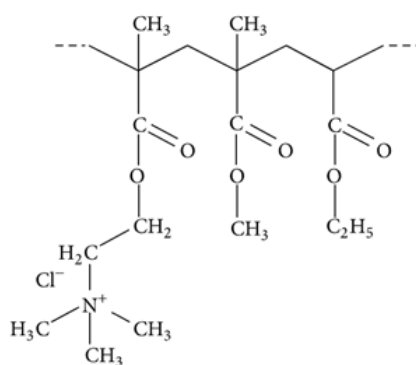
การวัดค่ามุม (contact angle) เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการวัดสมบัติทางพื้นผิวของสาร และเป็นวิธีที่ใช้โดยทั่วไปที่ใช้ในการวัดพื้นผิวของเหลว โดยใช้สมการ Young-

Laplace equation โดยในขณะวัดค่ามุม (contact angle) สมบัติทางเคมีที่วัดได้จะเป็นส่วนนอกที่สุดของอะตอมผิววนอกที่ทำกับพื้นผิวของของแข็งจะทำให้ได้ค่ามุม (contact angle) โดยทำการหยดของเหลวลงบนพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นของแข็ง โดยลักษณะการเรียงตัวของหยดที่จะทำการวิเคราะห์มีอยู่ด้วยกันได้แก่ pendant drop, sessile drop, captive bubble จากนั้นจะมีแหล่งกำเนิดแสงที่มี filter เพื่อให้แสงมีเพียงความถี่เดียว (monochromatic illumination) แล้วทำการถ่ายภาพจะทำให้เห็นรูปร่างของหยดของเหลว นั้น ๆ จากนั้นนำรูปที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ลักษณะของหยดของของเหลว และทำการทำนายตำแหน่งของพื้นผิวของของเหลวที่กระทำกับของแข็ง หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปใส่ในสมการ Young-Laplace equation (41, 42)

3. Eudragit RL100 และ Poly(methyl methacrylate) (PMMA)

3.1 สมบัติของ Eudragit RL100 (Properties of Eudragit RL100)

Eudragit RL 100 เป็นพอลิเมอร์ร่วมของ Ethyl acrylate, Methyl methacrylate และมีส่วนประกอบของ Methacrylic acid ester ที่ประกอบด้วยหมู่แอมโมเนียมซึ่งมีประจุเป็นบวก Eudragit RL100 จะไม่ละลายและพองตัวในน้ำแต่จะยอมให้น้ำซึมผ่านได้ โดยทั่วไปแล้ว Eudragit RL100 จะทำหน้าที่เป็น control release agent, viscosity agent, suspending agent, tablet binder, film former และ 1 กรัมของ Eudragit RL100 จะละลายใน 7 กรัม aqueous methanol, ethanol, acetone, dichloromethane (43)



รูปที่ 1 โครงสร้างของ Eudragit RL100 (44)

ตารางที่ 1 แสดงสมบัติของ Eudragit RL100

สมบัติของ Eudragit RL100	ข้อมูล
สี (Color)	ไม่มีสี
อุณหภูมิของการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature)	63 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น (Density)	0.816-23836 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว (Melting point)	294 องศาเซลเซียส
ความทนแรงดึง (Tensile strength)	2.05 MPa
ความสามารถในการละลาย (Solubility)	ละลายใน Acetone, Isopropanol, Alcohol ไม่ละลายน้ำ

3.2 สมบัติของ Poly(methyl methacrylate) (PMMA)

พอลิเมทิลเมทาไครเลตเป็น พอลิเมอร์ชนิดเทอร์โมพลาสติกที่มีความโปร่งใสสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้อย่างแพร่หลายเช่น นำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปได้หลายประเภท โดยพอลิเมทิลเมทาไครเลตมีความสามารถเรียกว่า Plexiglas, Lucite, Acrylite และ Altuglas เป็นต้น มีชื่อ IUPAC เรียกว่า methyl 2- methylprop-2-enoate (45) มีค่า Glass transition temperature (T_g) ที่สูงคือ 398 เคลวิน (398 K) มีความหนาแน่น 1.20 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรที่อุณหภูมิห้อง สามารถหลอมเหลวได้ที่อุณหภูมิ 200-230 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อตัวทำละลาย Alkane และกรดเจือจางได้ดี แต่ไม่สามารถทนตัวทำละลายที่มีขี้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์และคีโตน เป็นต้น ยังมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อมนุษย์ ไม่มีพิษต่อเนื้อเยื่อมนุษย์ ราคาไม่แพง มีกระบวนการผลิตที่ง่าย แข็งแรงทนต่อแรงดันทาน จึงทำให้ PMMA เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในทางชีวการแพทย์ปัจจุบัน (46)

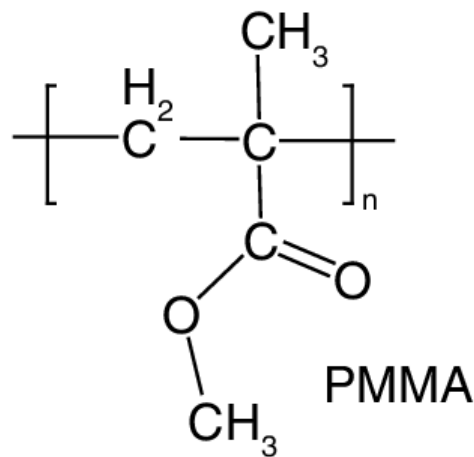
จากงานวิจัยของ Bee Chin Ang ในปี 2015 ได้มีรายงานถึงการทำอิเล็กโทรสปินนิงเพื่อสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินจากพอลิเมทิลเมทาไครเลตโดยใช้ Dimethylformamide (DMF) เป็นตัวทำละลาย เพื่อหาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์เส้นใยด้วย Taguchi design of experiments (47)

จากงานวิจัยของ Alireza Matbouei ในปี 2018 มีรายงานการสังเคราะห์พอลิเมทิลเมทาไครเลตเป็นโครงร่างสามมิติ เพื่อใช้สำหรับการรักษาช่องแฉกกระดูก โดยใช้เครื่อง Laser cutting machine โดยผลที่ได้คือสามารถเป็นทางเลือกที่ดีในการใช้สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อทางกระดูก (48)

จากงานวิจัยของ Hui-Yi Chang ในปี 2019 ได้มีรายงานการเตรียมเส้นใยนาโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic nanofibers) จาก PMMA ด้วยวิธีการอิเล็กโทรสปินนิงโดยใช้ 2-propanol และน้ำ เป็นตัวทำละลาย (49)

จากงานวิจัยของ Balen ในปี 2016 มีรายงานการสังเคราะห์เส้นใยและฟิล์มจาก PMMA/ZnO โดยใช้ acetone/DMSO (2:3, v/v) เป็นตัวทำละลายในสถานะ ศักย์ไฟฟ้า 25 กิโลโวลต์ (kV) ระยะห่าง 25 เซนติเมตร (cm) และอัตราการป้อนสาร 1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (ml/hr) เป็นต้น (50)

จากงานวิจัยของ Parashar ในปี 1999 มีรายงานการผสมพอลิเมอร์ระหว่าง Eudragit RL100 กับ poly(methyl methacrylate) ในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อดูความแข็งแรงเชิงกล พบว่าการผสมระหว่างสองพอลิเมอร์มีความเข้ากันได้ โดยความแข็งแรงเชิงกลจะเพิ่มเมื่อเทียบกับ Eudragit RL100 เดี่ยว ๆ สามารถสรุปได้ว่าสารผสมที่ได้มีความแข็งแรงและความทนทานเพิ่มขึ้น (51)



รูปที่ 2 โครงสร้างของ Poly(methyl methacrylate) (PMMA) (52)

ตารางที่ 2 แสดงสมบัติของ Poly(methyl methacrylate) (PMMA)

สมบัติของ PMMA	ข้อมูล
สี (Color)	ไม่มีสี
อุณหภูมิของการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature)	125 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น (Density)	1.20 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว (Melting point)	200 -230 องศาเซลเซียส
ความทนแรงดึง (Tensile strength)	72 MPa
ความสามารถในการละลาย (Solubility)	ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ละลายน้ำ
การเกิดไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)	ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริก
การสลายตัวด้วยความร้อน (Thermal decomposition)	220 องศาเซลเซียส (ถ้าไม่มีออกซิเจน) 260 องศาเซลเซียส (ถ้ามีออกซิเจน)

4. Growth factors and Stem cells

4.1 Growth factors

เมื่อปี ค.ศ. 1950 Dr. Viktor Hamburger และ Dr. Levi-Montalcini ได้ค้นพบ Growth factors เป็นครั้งแรกจากเอ็มบริโอของไก่ พบ Growth factors 2 ชนิด คือ Nerve Growth Factor (NGFs) และ Epidermal Growth Factor (EGF) ต่อมาทั้ง Dr. Viktor Hamburger และ Dr. Levi-Montalcini ได้รับรางวัลโนเบล ในปี ค.ศ.1986 สาขาสรีรวิทยาและทางการแพทย์ (53)

Growth factors เป็นโปรตีนที่มาจากสายพอลิเปปไทด์ขนาดเล็ก ซึ่งขนาดของ Growth factors ขึ้นอยู่กับจำนวนหรือชนิดของกรดอะมิโน (24) พบมากในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Extracellular Space) โดยหลักการทำงาน คือ มีการกระตุ้นเซลล์ทำให้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น แบ่งตัวเพิ่มขึ้นทำให้เซลล์เกิดการเติบโต กระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ พัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดให้เปลี่ยนเป็นอวัยวะที่จำเพาะ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และควบคุมการตายของเซลล์ซึ่ง Growth factors ออกฤทธิ์ผ่านตัวรับ (Receptor) ที่จำเพาะซึ่งแตกต่างกันแต่ลักษณะของ Growth factors ทำให้เกิดการส่งสัญญาณ (Cell Signaling) และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ (Response) หากไม่มีตัวรับจะไม่สามารถทำงานได้ (25)

Growth factors มีหน้าที่ทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวสามารถนำไปปรับปรุงพันธุวิศวกรรม และสามารถนำไปใช้ซ่อมแซมเนื้อเยื่อ เป็นตัวที่ทำการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งจะออกฤทธิ์โดยการจับกับตัวรับที่จำเพาะ นอกจากนี้แล้วยังมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเนื้อเยื่อ ซ่อมแซมบาดแผล แต่ในกรณี Growth factors มากเกินไปทำให้เกิดผลเสียตามมาได้คือ สามารถทำให้เกิดเป็นมะเร็งได้ (26)

ชนิดของ Growth factors เช่น Fibroblast Growth factor (FGF), Nerve Growth factor (NGF), Epidermal growth factor (EGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factors- β (TGFs- β), Transforming Growth Factor- α (TGF- α), Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1), Insulin-Like Growth Factor-2 (IGF-2) และ Tumor Necrosis Factor (TNF) Superfamily เป็นต้น (54)

4.1.1 *Nerve Growth factors (NGFs)* หรือ Neurotrophins มีอยู่ 4 ชนิด คือ NG, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT3) และ Neurotrophin-4 (NT4) ซึ่งควบคุมการทำงานของระบบประสาทหลายหน้าที่โดยผ่าน p75NTR, TrkA, TrkB และ TrkC receptors

Nerve Growth factors (NGFs) มีมวลโมเลกุลประมาณ 13.5 กิโลดัลตัน สามารถพบได้หลายตำแหน่ง เช่น แมสต์เซลล์ (mast cells), อีโอซิโนฟิล (Eosinophils), ต่อมน้ำลายบริเวณขากรรไกรล่าง (Submaxillary gland), เซลล์จากไขกระดูกในชั้นสโตรมาล (Bone marrow stromal cells) และคีราติโนไซต์ (Keratinocyte) เป็นต้น ซึ่ง NGF ทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท การอยู่รอดของเซลล์ รวมถึงการเรียนรู้ เป็นต้น (54, 55)

จากการทบทวนวรรณกรรมจากงานวิจัยของ Tony M. Dinis ในปี 2014 กล่าวถึงการสังเคราะห์เส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โดยเส้นใยมาจากตัวไหมโดยมี Ciliary neurotrophic factor (CNTF) และ Nerve growth factor (NGF) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งใช้สำหรับการฟื้นฟูเส้นประสาท ผลที่ได้คือสามารถช่วยฟื้นฟูเส้นประสาทได้ (56)

4.1.2 *Epidermal growth factor (EGF)* สามารถพบได้หลายตำแหน่ง เช่น ต่อมน้ำลายบริเวณขากรรไกรล่าง (submaxillary gland) ต่อมใต้ชั้นเยื่อเมือกหรือต่อมของบรูเนออร์ (Submucosal glands /Brunner's glands) ส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของเซลล์มีเซนไคม์ (Mesenchymal Cell) เซลล์เกลีย (Glial cell) และเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelial cells) เป็นต้น (54)

4.1.3 *Fibroblast growth factor (FGF)* สามารถพบในทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง และสามารถพบได้หลายตำแหน่ง คือ พบมากในหลากหลายเซลล์ พบมากในช่องว่างระหว่างเซลล์ (ECM) เป็นต้น โดย FGF family มีทั้งหมด 23 ตัวที่เป็นสมาชิก คือ ตั้งแต่ FGF1 ถึง FGF23 ตัวอย่างเช่น ในหนู (mice) พบ FGF1 ถึง FGF18 และ FGF20 ถึง FGF23 ในมนุษย์พบ FGF1 ถึง FGF14 และ FGF16 ถึง 23 เป็นต้น ซึ่งมวลโมเลกุลของ FGF ที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีค่าประมาณ 17 ถึง 34 กิโลดัลตัน และทุกตัวในจะมีลำดับกรดอะมิโนประมาณ 120 ลำดับ

กระบวนการออกฤทธิ์ของ FGF จะมีการจับกับ Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) และจะมีการกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน RAS/MAP Kinase pathway โดยหน้าที่หลัก ของ FGF มี 4 หน้าที่หลัก คือ ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ (Proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) การพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีลักษณะและหน้าที่เฉพาะ (cell differentiation) และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Angiogenesis) ซึ่ง FGF แต่ละตัวจะมีหน้าที่และเป้าหมายที่แตกต่างกัน ตัวอย่าง เช่น FGF7 มีหน้าที่เกี่ยวกับการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) มีการออกฤทธิ์ที่เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) เป็นต้น ซึ่งในผู้ใหญ่ FGF ทำงานเป็นตัวรักษาสมดุลของร่างกาย และมีหน้าที่ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อรวมถึงตอบสนองต่อการบาดเจ็บ (44, 47)

4.1.4 *Insulin-Like Growth Factor (IGF)* เดิมชื่อ Somatomedin เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายอินซูลินจึงเปลี่ยนมาใช้ชื่อ Insulin-Like Growth Factor (IGF) ในปัจจุบัน Insulin-Like Growth Factor (IGF) ถูกแบ่งเป็นสองชนิดหลัก ๆ คือ IGF-1 (Somatomedin C) ถูกสร้างจากเซลล์ตับและ IGF-2 (Somatomedin A) ถูกสร้างจากเซลล์หลายๆที่ในร่างกาย โดยสามารถพบ IGF ได้ในเนื้อเยื่อต่างๆไปตามร่างกายและสามารถพบในกระแสเลือดได้ ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว IGF-1 และ IGF-2 ที่อยู่ในกระแสเลือด ทั้งสองมีมวลโมเลกุล 150 กิโลดัลตัน

เนื่องจาก IGF-1 เกิดสารเชิงซ้อนกับ IGFBP-3 และ Acid Labile Subunit (ALS) ผลจากการที่เกิดสารเชิงซ้อนจะสามารถป้องกันการเกิดการสลาย (Degradation) เมื่ออยู่ในกระแสเลือดได้ แต่ถ้าเป็น IGF ที่ไม่ได้เกิดสารเชิงซ้อนจะมีมวลโมเลกุลขนาดประมาณ 7.5 กิโลดัลตัน ซึ่งจะมีความคงตัวที่ต่ำกว่าเพราะสามารถเกิดการสลายตัวได้เมื่ออยู่ในกระแสเลือด

IGF-1 (Somatomedin C) มีผลต่อ Growth Hormones แต่ IGF-2 (Somatomedin-2) ไม่ได้มีผลต่อ Growth Hormones โดย IGF ทั้งสองชนิดจะควบคุมการทำงานของเซลล์ โดยไปจับกับตัวรับของเซลล์ที่มีความจำเพาะ (receptor) คือ IGF-1 จะจับกับ IGF-1 receptor และ IGF-2 จะจับกับ IGF-1 receptor หรือ IGF-2 receptor โดยทั้ง IGF-1 และ IGF-2 จะเข้าจับ IGF-1 receptor จะทำให้ Tyrosine kinase มีการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์อย่างเป็นลำดับขั้น จะส่งผลต่อการแบ่งตัวการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ และการอยู่รอดของเซลล์ (57)

IGF-1 และ IGF-2 ประกอบด้วย 4 โดเมน คือ A B C และ D โดย IGF-1 มีกรดอะมิโนทั้งหมด 70 ลำดับกรดอะมิโน โดยโดเมน A และ B เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulphide bonds) และทั้งสองโดเมน เชื่อมกับโดเมน C โดยโครงสร้างของ IGF-1 คล้ายกับ Insulin คือ กรดอะมิโนลำดับที่ 1 ถึง 29 จะเหมือนกับ Insulin B chain ส่วนกรดอะมิโนลำดับที่ 42 ถึง 62 จะเหมือนกับ insulin A chain และส่วนโดเมน C มีกรดอะมิโน 12 ตัวเป็นส่วนประกอบซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า “Connecting” (57)

IGF-2 Prehormone มีกรดอะมิโน 180 ลำดับ (20.1 กิโลดัลตัน) ประกอบด้วย Carboxy-terminal peptide 89 ลำดับกรดอะมิโนและ Signal peptide 24 ลำดับกรดอะมิโน หลังจากเกิดกระบวนการ Translation สุดท้ายจะเหลือกรดอะมิโน 67 ลำดับกรดอะมิโน (7.5 กิโลดัลตัน) โดยโดเมน A และ B เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bonds) และทั้งสองโดเมน เชื่อมกับโดเมน C (58) ซึ่งหลักการทำงานของ IGF-2 สามารถจับกับ Insulin receptor, IGF-1 receptor และ IGF-2 receptor สามารถส่งผลให้เกิดกลไกหลาย ๆ อย่างเช่น

กระตุ้นการขนส่งน้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน การสังเคราะห์โปรตีน DNA RNA กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และการอยู่รอดของเซลล์ เป็นต้น (59-61)

จากงานวิจัยของ Zhiping Qi ในปี 2019 ได้มีการใช้ IGF-1 ซึ่งมีสมบัติในการป้องกันระบบประสาทและสร้างเส้นใยประสาทโดยนำส่งด้วยอิเล็กโทรสปีนนิ่ง ในการศึกษาได้สังเคราะห์เส้นใยนาโนด้วยการใช้ IGF-1 ตรึงกับ graphene oxide (GO)-incorporated poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ด้วยวิธี Immobilize ในการทดลอง in vitro ได้ทำการเพาะเลี้ยง Neural stem cells (NSCs) เพื่อศึกษาผลพบว่า graphene oxide (GO) ทำให้เพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ประสาทและทำให้ NSCs เปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะ (Differentiation) ยิ่งไปกว่านั้นการมี IGF-1 ทำให้เพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ประสาทและทำให้ NSCs เปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหลักการทำ Immobilization คือนำเส้นใยนาโน graphene oxide-incorporated PLGA และ PLGA มาตัดในขนาดที่พอเหมาะและนำไปติดในแต่ละหลุมของ 24-well plate โดยนำสารละลาย IGF-1 ความเข้มข้น 10, 100, และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรใน phosphate buffer saline (PBS) เติมลงในแต่ละ well แต่ใช้ Oscillator ในการสั่นเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นดู binding efficiency และ release profiles โดยใช้ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) การวิเคราะห์ Cell survival ใช้วิธี CCK-8 ดูการทำงานของ NSCs โดย NSCs เพาะเลี้ยงในเส้นใยนาโนชนิดต่าง และมีการวิเคราะห์การแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation) ด้วยวิธี MTT assay ที่ 1, 3 และ 7 วัน (53)

4.2 Stem cells

Stem Cells เป็นสิ่งที่จำเป็นต่ออวัยวะภายในของสิ่งมีชีวิต ในช่วง 3-5 วันจะเรียกว่า Blastocyte และจากนั้นจะมีความสามารถเปลี่ยนและพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีลักษณะจำเพาะ เช่น หัวใจ ปอด ผิวหนัง สเปิร์ม ไข่ และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในบางอวัยวะยกตัวอย่างเช่น เซลล์ไขกระดูก กล้ามเนื้อ สมอง เป็นต้น รวมถึงสามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัดจึงสามารถช่วยในการทดแทนเซลล์เก่าที่เสื่อมสภาพ จึงทำให้มีสมบัติในการซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย แต่

อย่างไรก็ตามก็ยังคงต้องการข้อมูลทางปฏิบัติการเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้ Stem cells ในการรักษา ซึ่งวิธีนี้จะเรียกว่า Regenerative medicine (54)

Stem cells สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากตัวอ่อน (Embryonic Stem Cells : ESCs) และเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตโตเต็มวัย (Adult Stem Cells : ASCs)

4.2.1 เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากตัวอ่อน (Embryonic Stem Cells : ESCs)

เป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Stem Cells) เป็นเซลล์ที่จะกลายเป็นอวัยวะหลังจากเกิดการฝังตัวที่มดลูกระยะเวลาประมาณ 2 เดือนหลังจากการตั้งครรภ์ยกตัวอย่างเช่น ไซโกต (Zygote) ที่มาจากการผสมกันระหว่าง สเปิร์ม (Sperm) กับไข่ (Egg) ที่เกิดการปฏิสนธิกันประมาณ 5 วัน เมื่อไซโกต (Zygote) เกิดการแบ่งตัว จะเกิดเป็น บลาสโตไซสต์ (Blastocyte) และสามารถเกิดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากตัวอ่อน (Embryonic Stem cells : ESCs) จะมีการพัฒนาการต่อไปเป็นอวัยวะต่างๆต่อไป เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ (Muscle cell) เซลล์ไขมัน (Adipocyte) เซลล์ตับ (Hepatocyte) และเซลล์ประสาท (Neurons) เป็นต้น (62, 63)

4.2.2 เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตโตเต็มวัย (Adult Stem Cells : ASCs)

Adult stem cells หรือ Somatic stem cell (ASCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสามารถในการซ่อมแซมเซลล์ที่มีอยู่ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะอื่นภายในร่างกายได้ ยกตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อเช่น เม็ดเลือด ลำไส้ อวัยวะและผิวหนัง เป็นต้น

Adult Stem Cells ต้องมีสมบัติที่สำคัญ 2 อย่าง คือ 1. Self-renewal เป็นสมบัติที่สามารถแบ่งตัวเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเดิมได้ 2. Multipotency หรือ Multi differentiative potential เป็นสมบัติที่สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดอื่นๆในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ เช่น เซลล์เกลีย (glia cells) และเซลล์ประสาท (Neurons) เป็นต้น (55, 57, 58)

โดยในช่วงกลางของปี ค.ศ.1800 ได้เริ่มมีการให้คำนิยามของ Stem Cells ว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถสร้างเซลล์อื่น ๆ ได้ ในปี ค.ศ.1968 ได้มีการทดสอบเกี่ยวกับ Stem Cells ครั้งแรกในไขกระดูกในการรักษาภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องได้สำเร็จ (59) ต่อมาในปี ค.ศ.1998 ได้เริ่มทำการเก็บ Stem Cells human embryoles และได้เพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเรียกเซลล์ต่าง ๆ

เหล่านี้ว่า Human Embryonic Stem cells โดยนำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงมาทำการทดลองแบบ in vitro fertilization procedures (64) ปัจจุบันการวิจัยเกี่ยวกับ Stem cells ได้พัฒนาไปอย่างกว้างไกลและได้ถูกตีพิมพ์อย่างมากมายในวารสารทางวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตโตเต็มวัย (Adult Stem Cells : ASCs) ยังถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคหลายๆอย่าง ยกตัวอย่างเช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (65)

4.3 Schwann cells

Theodor Schwann นักสรีรศาสตร์ชาวเยอรมันได้ค้นพบเซลล์ชวานน์ (Schwann cells) ในระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system) เป็นครั้งแรกในศตวรรษที่ 19 (66)

เซลล์ชวานน์มีหน้าที่บทบาทสำคัญในระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system) ได้แก่ 1. ห่อหุ้ม neuromuscular junction เพื่อควบคุมการส่งสัญญาณประสาท 2. สร้างเนื้อเยื่อไมอีลินรอบ ๆ แอกซอนทำให้เพิ่มความเร็วในการส่งสัญญาณประสาท (67) 3. รักษาความสมบูรณ์ของแอกซอน 4. แสดง Neurotrophic growth factors (NTFs) เช่น BDNF GDNF NGF ฯลฯ 5. เกี่ยวข้องกับการหลั่ง Neurotrophic cytokine เช่น CNTF และ Hormones like erythropoietin 6. ช่วยในการส่งเสริมกระบวนการสมานแผล (68) 7. มีการหลั่ง NTFs หรือ Growth-promoting factors ตัวอื่น ๆ ซึ่งมีบทบาทสำคัญมากในการซ่อมแซมแอกซอน (69) และเซลล์ชวานน์ยังมีความสามารถในการสร้างและซ่อมแซมไมอีลินและแอกซอนในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ทำให้รักษาโรคทางระบบประสาทส่วนกลางได้เช่น โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (Multiple Sclerosis) ที่เกิดจากการทำลายเนื้อเยื่อปลอกหุ้มประสาทหรือไมอีลิน (myelin sheath) ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการซ่อมแซมส่วนที่เสียหายของไขสันหลังได้ (70, 71)

เซลล์ชวานน์ เกิดจาก Neural crest cells และพัฒนาเป็นสองประเภท คือ myelinating Schwann cells และ non-myelinating Schwann cells (66) โดยเซลล์ชวานน์มีหน้าที่เป็นไมอีลินในระบบประสาทส่วนปลาย โดยสร้างปลอกไมอีลินโดนห่อหุ้มพลาสมาเมมเบรนรอบ ๆ แอกซอน พลาสมาเมมเบรนของเซลล์ชวานน์มีปริมาณไขมันสูงมาก และคลอโรสเตรอลมีความสำคัญมากในการเป็นส่วนประกอบของปลอกไมอีลิน ซึ่งปลอกไม

อีลินจะช่วยในการป้องกันเอกซอนและยังช่วยในการเพิ่มความเร็วในการส่งของสัญญาณไฟฟ้าในระบบประสาท การแสดงออกของ Neuregulin-type-III บนเอกซอนมีความจำเป็นในการอยู่รอด และการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ชวานน์ และระดับของการเกิด Myelination จะขึ้นอยู่กับปริมาณของ Neuregulin บนพื้นผิวของเอกซอน

ถึงแม้ว่าเอกซอนจะมีความสามารถในการซ่อมแซมตัวเองแต่มีอัตราการซ่อมแซมที่ช้า และเวลาเป็นสิ่งสำคัญในการซ่อมแซมเส้นประสาท จึงมีวิธีการวิศวกรรมเส้นประสาทเพื่อซ่อมแซมเส้นประสาทอย่างมีประสิทธิภาพถือเป็นสิ่งที่จำเป็น ซึ่งการรักษาแบบ Autologous เป็นวิธีที่เป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการซ่อมแซมเส้นประสาท มีความเสี่ยงต่ำที่จะถูกปฏิเสธจากระบบภูมิคุ้มกันจึงปลอดภัย แต่ข้อเสียของวิธีการนี้ คือเป็นวิธีการที่ยากซับซ้อน มีการสูญเสียของเนื้อเยื่อประสาทบางส่วน และขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นประสาทระหว่างผู้ให้หรือผู้บริจาคและผู้รับไม่ตรงกัน ยังมีวิธีการที่สามารถเพิ่มจำนวนและซ่อมแซมเอกซอนได้อย่างรวดเร็วคือ ใช้วิศวกรรมเส้นประสาทในการซ่อมแซม (Engineered nerve conduits) โดยเป็นวิธีการสำหรับซ่อมแซมส่วนที่บกพร่องของเส้นประสาทหรือเส้นประสาทที่เกิดความเสียหาย จากเส้นประสาทของมนุษย์ (Acellular) หรือวัสดุทางชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ เช่น คอลลาเจน ไคโตซาน Poly (glycolic acid) (PGA) Polycaprolactone (PCL) ด้วยวิธีการที่เหมาะสม (68)

5. การตรึง (Immobilization)

Immobilization หมายถึง การตรึงหรือการที่โมเลกุลใด ๆ ที่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ไว้อย่างสมบูรณ์ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ โดยการถูกยึดติดกับของแข็ง ซึ่งสามารถใช้กับสารชีวโมเลกุลหลากหลาย เช่น เอนไซม์ ออร์แกนเนลล์เซลล์ และเซลล์ของพืชและสัตว์ เป็นต้น (72) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มความสามารถของเซลล์ และการใช้เอนไซม์ โดยมีหลักการพื้นฐานคือ การตรึงของสารชีวโมเลกุลลงบนวัสดุรองรับ เพื่อเพิ่มความคงทนของสารชีวโมเลกุล เพื่อจะสามารถนำมาใช้ใหม่ และเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ (73)

5.1 ประวัติของการตรึง (immobilization)

Immobilization เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปในเชื้อจุลชีพ เกิดการค้นพบจากการสังเกตเชื้อจุลชีพที่เกาะติดอยู่บนพื้นผิวซึ่งเรียกกันว่า ไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งได้ศึกษาและค้นพบในปี 1940 ต่อมาได้มีการศึกษาและทดลองเป็นครั้งแรกในปี 1969 ด้วยการสังเคราะห์ L-amino acids จาก acyl DL-amino acids โดยทำการ immobilize

aminocyclase enzyme จนกระทั่งปี 1970 เทคนิคการ Immobilization ได้ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น อุตสาหกรรมยา สิ่งแวดล้อม และอาหาร ซึ่งจำเป็นที่จะต้องเลือกวัสดุรองรับหรือตัวพา (carrier) ที่เหมาะสม (72)

5.2 วัสดุรองรับที่ใช้ในการตรึง (Support material in immobilization)

วัสดุรองรับเป็นที่เกาะติดของเอนไซม์แบบถาวรหรือเกาะเพียงชั่วคราว ซึ่งวัสดุรองรับมีความหลากหลายมาก แต่ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้จะต้องมีราคาที่ไม่แพง สามารถหาได้ง่าย และปฏิกิริยาระหว่างวัสดุรองรับกับเอนไซม์ต้องเกิดได้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ซึ่งจะสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

5.2.1.1 วัสดุรองรับจากธรรมชาติ (Natural polymers)

5.2.1.1 Alginate เป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายบางชนิด ซึ่งที่นิยมใช้กันมากเป็น Calcium หรือ Magnesium alginate เนื่องจากมีความเฉื่อยในการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้

5.2.1.2 Chitosan และ Chitin เป็นพอลิเมอร์ที่พบได้จากผนังเซลล์ของเห็ด รา หรือโครงสร้างภายนอกของแมลง ซึ่งจะมีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl : - OH) อยู่ ซึ่งจะเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ได้หลายชนิดด้วยพันธะโควาเลนต์

5.2.1.3 Collagen มีสมบัติที่มีความเป็นรูพรุนสูง และสามารถอุ้มน้ำได้มาก และยังมีกรดอะมิโน (amino acids) ที่สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์ได้ แต่จะเกิดการตรึงไว้อย่างถาวรกับวัสดุรองรับ

5.2.1.4 Carrageenan เป็นพอลิเมอร์ที่ได้มากจากสาหร่ายสีแดง มีสมบัติในการก่อก้อน และมีความสามารถในการยึดเกาะกับโปรตีนได้สูง จึงเป็นวัสดุรองรับที่ดีในการทำการตรึง

5.2.1.5 Cellulose เป็นพอลิเมอร์ที่มีราคาถูกและมีอยู่มากในธรรมชาติ มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl : - OH) ที่สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์ที่จะเกิดการตรึงกับเอนไซม์

5.2.2 วัสดุรองรับจากการสังเคราะห์ (Synthetic polymers)

วัสดุรองรับจากการสังเคราะห์ได้ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี 1950 โดยทำให้เกิดการเชื่อมระหว่างสารชีวโมเลกุลกับวัสดุรองรับ โดยที่มิจัยของ Isliker ,Crubhofer และ Manecke โดยทำการใช้แอนติเจน โดยใช้พอลิเมอร์ร่วม (copolymer) เป็น Acrylic acid ร่วมกับ methacrylic acid มาเป็นตัวพา (carrier) ซึ่งจะมีหมู่ oxiran หรือ หมู่ acid anhydride ซึ่งเป็นที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง และมีความ

เหมาะกับการเชื่อมกันของพอลิเมอร์และสารชีวโมเลกุลโดยตรง (direct coupling) ซึ่งต่อมาได้เรียกตัวพาที่ประกอบด้วย Polyacrylamide ว่า Eupergit

5.2.3 วัสดุรองรับแบบอนินทรีย์ (Inorganic material)

5.2.3.1 Zeolites มีรูพรุนขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก มีความสามารถในการดูดซับสูง นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์

5.2.3.2 Ceramics เป็นของแข็งที่ไม่ใช่โลหะ แต่มีส่วนประกอบของโลหะ ที่เชื่อมกับด้วยพันธะไอออนิก และพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งจะมีลักษณะการตรึงที่แตกต่างกันตามชนิดนั้น ๆ (74)

5.3 ชนิดของการตรึง (Type of Immobilization)

5.3.1 Physical Immobilization

5.3.1.1 การดูดซับ (Adsorption)

การดูดซับเป็นวิธีการตรึงสารชีวโมเลกุลที่สามารถย้อนกลับได้ (reversible) ซึ่งขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาทางกายภาพระหว่างสารชีวโมเลกุลและพื้นผิวตัวดูดซับหรือตัวพาที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble carrier) สามารถเกิด ionic binding หรือเกิดพันธะไอออนิกระหว่างวัสดุรองรับกับสารได้ โดยทั้ง 2 ตัวจะต้องมีประจุตรงกันข้ามกัน โดยสารหรือโปรตีนที่มาเกาะหรือถูกดูดซับมักมีสมบัติเป็นแอมโฟเทริก (amphoteric) หรือมีความเป็นกรดและเบสอยู่ในโมเลกุลเดียว ซึ่งการแสดงประจุบนโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับ สภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดหรือด่างหรือขึ้นกับค่า pH (75) โดยวิธีการนี้ถูกใช้มากสำหรับการเกาะติดของเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ทำให้สารชีวโมเลกุลเสียสภาพ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วและประหยัด แต่ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ การเกิดพันธะที่อ่อนระหว่างเอนไซม์และตัวดูดซับ ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่ถูกดูดซับสามารถรั่วหรือหลุดออกจากตัวดูดซับในระหว่างการใช้งานได้ (72)

ตัวดูดซับนั้นมีความหลากหลายมากซึ่งตัวดูดซับที่มาจากธรรมชาติเป็นตัวที่ต้องการเนื่องจากสมบัติทางชีวภาพ มีความสามารถในการย่อยสลายได้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยตัวดูดซับที่เป็นที่นิยม คือ อะลูมินา Carboxymethyl cellulose (CMC) ซิลิกาเจล Polyacrylamide คอลลาเจนและสาหร่าย เป็นต้น (74)

5.3.1.2 การดักจับ (Entrapment)

5.3.1.2.1 การห่อหุ้ม (Encapsulation)

วิธีการห่อหุ้มคือ การตรึงที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับวิธีการดักจับ (entrapment) วิธีการนี้ทำได้โดยการห่อหุ้มส่วนประกอบทางชีวภาพภายในเยื่อเลือกผ่านทรงกลม (spherical semi permeable membranes) (72) ซึ่งวิธีการห่อหุ้มจะมีการดูดซับสารไว้ภายในโครงสร้างและสามารถป้องกันโมเลกุลที่ไม่ต้องการแทรกซึมเข้ามาภายใน ทั้งนี้โครงสร้างที่ห่อหุ้มจะช่วยในการป้องกัน เพิ่มความคงตัว ขนส่งและยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารที่ถูกตรึง โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย (74) โดยอัตราส่วนของขนาดรูพรุนของเยื่อเลือกผ่านต่อขนาดของวัสดุหลัก (core material) เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับวิธีการนี้ โดยข้อดีของวิธีการนี้คือ สามารถป้องกันสารที่ถูกห่อหุ้มจากสภาวะที่รุนแรง ช่วยป้องกันการรั่วไหลของสารที่ถูกตรึงได้ (72)

5.3.1.2.2 การดักจับ (Entrapment)

วิธีการดักจับคือ การตรึงที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible) ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการจับของอนุภาคหรือเซลล์ภายในวัสดุรองรับในรูปแบบของเจล พิล์มหรืออนุภาค เป็นต้น โดยวิธีนี้จะมีการปกป้องสารชีวโมเลกุลที่ถูกตรึงเพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารจากพอลิเมอร์ไปยังสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งข้อดีของวิธีการนี้คือ เป็นวิธีการที่รวดเร็ว ถูก และมีสภาวะที่ไม่รุนแรงสำหรับการเกิดปฏิกิริยา แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ มีความสามารถในการบรรจุสารที่ต่ำ (72) มีการใช้ตัวพาหรือวัสดุรองรับหลายประเภท เช่น วัณ ไคโตซาน อัลจิเนต เซลโลส เซลลูโลส คอลลาเจน เจลาติน อีพอกซีเรซินโพลีเอสเตอร์ และโพลีสไตรีน เป็นต้น ซึ่งเมทริกซ์เหล่านี้มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยอัตราส่วนของขนาดอนุภาคของสารที่ถูกตรึงต่อขนาดรูพรุนของวัสดุรองรับเป็นปัจจัยที่สำคัญมากสำหรับวิธีการนี้ ซึ่งถ้ามีขนาดรูพรุนที่ใหญ่มากจะทำให้สารที่

ถูกตรึงสามารถรั่วไหลออกมาได้ (72) มีการวิจัยว่าวิธีการนี้เป็นที่นิยมใช้สำหรับตรึงจุลินทรีย์ เซลล์พืชและเซลล์สัตว์ มากกว่า เอนไซม์ (74)

5.3.2 Chemical Immobilization

5.3.2.1 การเกิดพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond)

การเกิดพันธะโควาเลนต์เป็นวิธีการตรึงที่สามารถย้อนกลับได้ (reversible) โดยเกิดพันธะระหว่างตัวพอนินทรีย์และเซลล์ (cross linking) วิธีการนี้ส่วนใหญ่จะใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ แต่ไม่ค่อยพบในการใช้ตรึงเซลล์ทั้งหมด (whole cell) เนื่องจากความเป็นพิษของสารเชื่อม (coupling agent) จะส่งผลให้เกิดการสูญเสียความสามารถของเซลล์หรือเอนไซม์ (72)

5.3.2.1.1 Activation of carboxylic groups

พันธะ carbodiimide เกิดจากการจับกันของหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl groups : - COOH) ของวัสดุรองรับ และหมู่เอมีน (amine : -NH₂) ของเอนไซม์ ซึ่งสาร N-hydroxysuccinimide (NHS) เกี่ยวข้องกับ carbodiimide ก่อนจะมีขั้นตอนการสร้างพันธะโควาเลนต์ (71)

5.3.2.1.2 Activation of amino groups

การจับกันระหว่างหมู่เอมีน (amine) ของวัสดุรองรับ และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) ของเอนไซม์ สามารถใช้ carbodiimide แต่ในทางเลือกอื่นสามารถใช้ glutaraldehyde เป็นสารกระตุ้น (activating agent) สำหรับการตรึง โดยในปฏิกิริยาแรก Schiff-base reaction เกิดจากหมู่เอมีนของวัสดุรองรับ และหมู่แอลดีไฮด์ของ glutaraldehyde หลังจากนั้นปฏิกิริยาที่สอง หมู่แอลดีไฮด์ของ glutaraldehyde จะเกิดการจับแบบพันธะโควาเลนต์กับหมู่เอมีนของเอนไซม์ (76)

5.3.2.1.3 Chemisorption

หลักการของวิธีการนี้ ขึ้นกับ Strong affinity และ Semi-covalent bond ระหว่างหมู่ thiol (-SH) และ gold substrates (Au) โดยเอนไซม์ที่มีหมู่ thiol ยกตัวอย่างเช่น oxidoreductases

และ isomerase ซึ่งจะมีบริเวณเร่งปฏิกิริยา 2 ตำแหน่งที่เป็น หมู่ cysteine ซึ่งจะสามารถตรึงบนพื้นผิวของทอง โดยหมู่ thiol (76) จาก งานวิจัยของ Karen ได้กล่าวไว้ว่าการใช้ disulfide bond มีข้อดีในเรื่อง การปลดปล่อยพันธะจากการถูกตรึงออกจากวัสดุรองรับโดยใช้ Low-molecular-weight thiol ที่มีมากเกินพอ เช่น dithiothreitol (DTT) ทำให้วัสดุรองรับสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งเป็นที่นิยมมากใน อุตสาหกรรม แต่ข้อเสียคือวัสดุรองรับมีราคาแพง (77)

5.3.3 Cross-linking

จากปฏิกิริยาระหว่างโม่เลกุล เอนไซม์จะถูก Cross-linked กับวัสดุรองรับ โดยใช้ bifunction reagents โดยใช้พันธะโควาเลนต์ และเอนไซม์จะถูกตรึง แต่อย่างไรก็ตามในการตรึงจะทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการทำงานใน กระบวนการ cross-linking ยกตัวอย่าง bifunction reagent ที่ใช้บ่อย เช่น Glutaraldehyde, Isocyanate และ N,N-ethylene bis maleimide ยิ่งไปกว่า นั้นเอนไซม์ยังสามารถ cross-linked ซึ่งกันและกันได้ ซึ่งจะเกิดเป็น cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) โดยในการเตรียม CLEA นั้นจะต้องทำให้เกิดการ ตกตะกอนก่อน จากนั้นใช้ bifunction reagents จะทำให้เอนไซม์มารวมตัวกัน หลังจากเกิดการรวมตัวกันบริเวณ active sites จะถูกป้องกันไว้เพื่อไม่ให้เอนไซม์ ทำงาน ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Muhammad Bilal มีการใช้ 75% ammonium sulfate เป็นตัวทำให้เกิดการตกตะกอนของ horse-radish peroxidase (HRP) และใช้ glutaraldehyde เป็น cross-linker เพื่อที่จะเกิดเป็น HRP-CLEAs เพื่อที่จะ ลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (73)

6. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein quantitative analysis)

6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

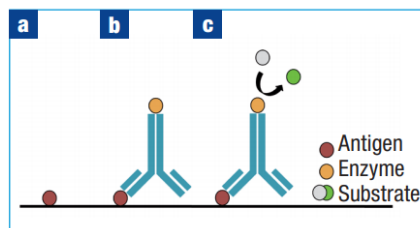
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) เป็นการตรวจที่อาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่เป็นวิธีมาตรฐานหลักในปัจจุบัน คือ enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) เนื่องจากเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูง ง่าย และรวดเร็ว สามารถตรวจเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณของสารต่าง ๆ ได้แก่ แอนติบอดี (antibodies) แอนติเจน (antigens) โปรตีน ไกลโคโปรตีน (glycoproteins) และฮอร์โมน

(hormones) เป็นต้น ส่วนประกอบหลักของวิธี ELISA ประกอบไปด้วย ไมโครเวลเพลท 96 หลุม (96-well plates) แอนติบอดีตรวจจับปฐมภูมิ (primary detection antibody) หรือ แอนติบอดีตรวจจับทุติยภูมิ (secondary detection antibody) แอนติเจน สารเคลือบ แอนติบอดี (coating antibody/antigen) แอนติเจน สารละลายบัฟเฟอร์ สารล้าง สารตั้งต้น (substrates) และโครโมเจน (chromogen) โดยจะขึ้นอยู่กับประเภทของ ELISA หลักการพื้นฐาน คือเคลือบแอนติบอดีตรวจจับปฐมภูมิบนผิวไมโครเวลเพลท ต่อมาเติมตัวอย่างที่สนใจจะเกิดการจับกันผ่านตัวรับที่จำเพาะ จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโดยการใส่สารตั้งต้นไปทำให้เกิดสารที่มีสีขึ้น ซึ่งในแต่ละขั้นตอนต้องทำการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline, PBS)

ELISA แบ่งออกเป็น 4 ประเภทหลัก

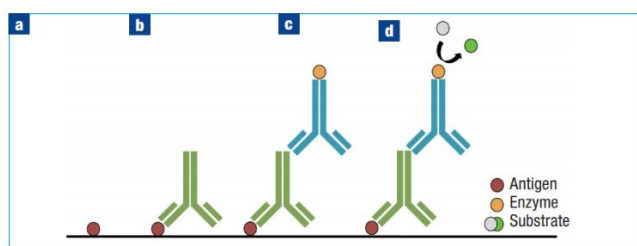
1. Direct ELISA (antigen-coated plate; screening antibody) เป็นวิธี ELISA ที่ง่ายที่สุดในการตรวจวัดแอนติเจน โดย buffered solution ที่ประกอบไปด้วย analyte จะเพิ่มเข้าไปใน 96-well plate โดยใช้เวลาที่ต่างกัน โดยทั่วไปแล้วจะใช้ carbonate-bicarbonate เป็น buffer ซึ่งจะให้มีค่า pH อย่างน้อย 9 จะทำให้แอนติเจนสามารถละลายได้และมีประจุเป็นลบซึ่งจะสามารถไปจับกับ plate ที่มีประจุบวกได้ และต้องเตรียมสารมาตรฐานเป็น positive control ที่รู้ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่แน่นอน และ negative control ที่เป็นสารที่จะไม่แสดงการเปลี่ยนแปลง สำหรับ control เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นตัวยืนยันว่าสารที่ได้นั้นไม่เกิดการปนเปื้อน และในส่วนของ wells จะถูกล้างด้วย phosphate buffered saline ที่ pH ที่ เบ่ นกลาง เพื่ อที่ จะ ล้าง unbound component หรือ debris ต่างๆ เพื่อลดการรบกวนในการตรวจสอบ และเพิ่มการจำเพาะในการวิเคราะห์ นอกจากนี้แล้ว plate ยังถูกล้างด้วย blocking buffer เช่น bovine serum albumin เพื่อที่จะลดการจับแบบไม่จำเพาะในการจับของโปรตีน ซึ่งจะมีอยู่ด้วยกัน 2 ประเภท คือ โปรตีน (Bovine serum albumin, Casine) และสารซักล้าง (Tween 20, Triton X-100) ในส่วนของ direct ELISA เป็นวิธีตรวจสอบขั้นพื้นฐานในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยการใช้ conjugated enzyme ซึ่งจะจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บน plate โดย plate นั้นจะถูกบ่มในด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อที่จะทำให้แอนติเจนและแอนติบอดีเกิด

การจับกัน และล้างด้วย phosphate buffered saline เพื่อล้างแอนติบอดีส่วนเกินจากนั้น จะใส่ substrate สำหรับเอนไซม์ และทิ้งไว้ในสภาวะที่ปราศจากแสงเพื่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างกัน ซึ่งหลังจากที่เกิดอันตรกิริยาจะเกิดการเปลี่ยนสีขึ้นซึ่งจะสามารถอ่านได้ด้วย microplate reader สำหรับการวิเคราะห์จะนำสารที่ต้องการวิเคราะห์ไปเปรียบเทียบกับ standard curve



รูปที่ 3 Direct ELISA

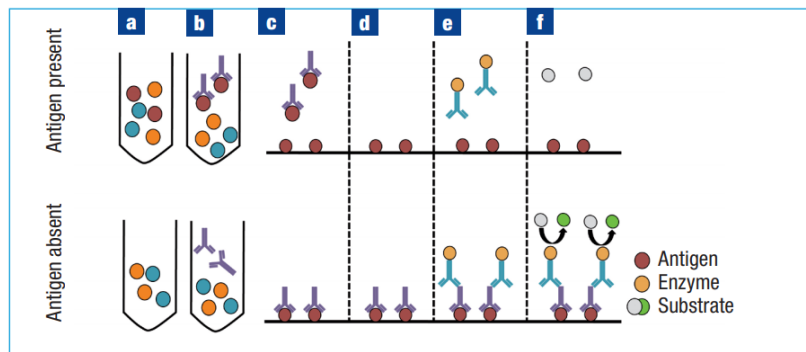
2. Indirect ELISA คล้ายกับ Direct ELISA โดยแอนติบอดีตรวจจับปฐภูมิที่ต่อกับ เอนไซม์จะถูกจับกับแอนติเจนที่ถูกเคลือบบนไมโครเวลเพลท ไมโครเวลเพลทจะถูกบ่มใน เวลาที่เหมาะสมเพื่อให้แอนติบอดีปฐภูมิจับกับแอนติเจนและทำการล้างด้วยสารละลาย phosphate buffered saline เพื่อกำจัดแอนติปฐภูมิส่วนเกิน จากนั้นเติมสารตั้งต้น (substrate) สำหรับเอนไซม์ จะเกิดปฏิกิริยากันระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์โดยทำในสภาวะ ที่ปราศจากแสง และปฏิกิริยาจะถูกหยุดโดยการเติมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (stop solution)



รูปที่ 4 Indirect ELISA

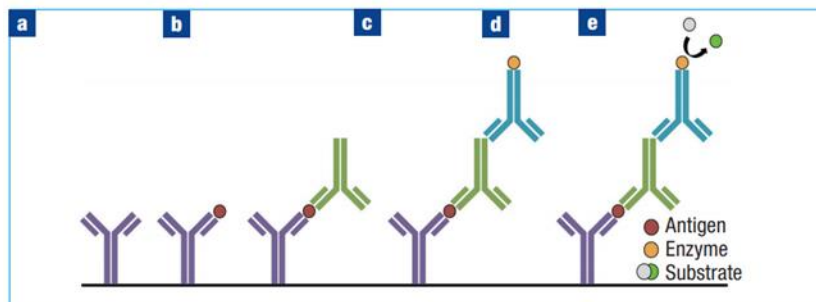
3. Competitive ELISA มีหลักการที่แตกต่างจาก Direct, Indirect ELISA และ Sandwich ELISA โดยแอนติบอดีตรวจจับปฐภูมิจะถูกบ่มร่วมกับสารตัวอย่างที่ไม่บริสุทธิ์ และจับกับแอนติเจนต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่าง แล้วเกิดเป็น antigen-antibody complexes จากนั้นนำ antigen-antibody complexes เติมลง 96-well plate ที่ถูก

เคลือบด้วยแอนติเจน แอนติบอดีตรวจจับปฐภูมิที่ไม่ถูกจับจะจับกับแอนติเจนในหลุม ถ้าเติมตัวอย่างมากแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนที่กั้นหลุมจะมีน้อยลง เมื่อทำการเติมแอนติบอดีตรวจจับทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์และมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตรวจจับปฐภูมิเพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณแอนติเจนตรวจจับปฐภูมิที่จับกับกั้นหลุม แต่ในกรณีนี้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติเจนสูงจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ต่ำ สีจะจางลงกว่าหลุมที่มีแอนติเจนความเข้มข้นต่ำ



รูปที่ 5 Competitive ELISA

4. Sandwich ELISA หลักการคือ แอนติบอดีตรวจจับปฐภูมิจะถูกเคลือบบน 96-well plate เมื่อใส่สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานจะจับกับแอนติบอดีตรวจจับปฐภูมิอย่างจำเพาะเจาะจง จากนั้นใส่แอนติบอดีตรวจจับทุติยภูมิที่ติดฉลาก biotin จะจับอย่างจำเพาะกับสารตัวอย่าง นำไปบ่มร่วมกับเอนไซม์ HRP-Streptavidin ในสภาวะที่ปราศจากแสงจะเกิดการจับกันระหว่าง biotin และเอนไซม์ เมื่อใส่สารละลายตั้งต้น Tetramethylbenzidine (TMB substrate solution) ลงไป เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นแล้วเปลี่ยนสี ซึ่งสามารถดูดกลืนแสง และหาปริมาณสารตัวอย่างได้ (78, 79)



รูปที่ 6 Sandwich ELISA

7. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

จากงานวิจัยหลาย ๆ งานวิจัยพบว่านิยมการใช้เซลล์ชวานน์ (Schwann cells) ของหนูมาทำการทดลองต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น

S16Y (ATCC® CRL2943™) คือ เซลล์ชวานน์ จาก *Rattus norvegicus*
อาหารเลี้ยงเซลล์ (Growth medium) ที่ใช้คือ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + 10 % Fetal bovine serum (FBS)

วิธีการเลี้ยงเซลล์ (80)

1. นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออก
2. ชะล้างผิวเซลล์ด้วย Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) ซึ่งปราศจาก Ca^{2+} และ Mg^{2+} หรือสารละลาย 0.25% w/v Trypsin-EDTA 0.53 มิลลิโมลาร์ เพื่อที่ล้างร่องรอยของซีรัมที่ประกอบด้วย Trypsin inhibitor
3. จากนั้นใส่ 2-3 มิลลิลิตรของสารละลาย Trypsin-EDTA ใส่ลงใน flask และนำไปส่องเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) จนกระทั่งผิวหน้าของเซลล์หลุดกระจาย (โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้เวลา 5-15 นาที)

ควรระมัดระวังเรื่องการจับกันเป็นก้อนห้ามทำการเขย่าหรือกวน flask ในขณะที่รอให้เซลล์หลุดออกมา ในกรณีที่เซลล์หลุดออกมามากให้นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้ง่ายต่อการกระจายตัว

4. จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium) มาทำการปิเปตลงไป 6-8 มิลลิลิตร ลงใน flask
5. จากนั้นทำให้เซลล์ตกตะกอนโดยปิเปตสารจาก flask ใส่หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 125×g เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วทิ้งส่วนที่ใส่ออก (supernatant)
6. จากนั้นทำให้เซลล์กระจายตัว (resuspend) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (growth medium) และทำการอะลิควอตเซลล์ให้อยู่ใน flask เลี้ยงเซลล์ใหม่
7. จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5%

7.1 การวัดปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์

7.1.1 Alamar Blue assay

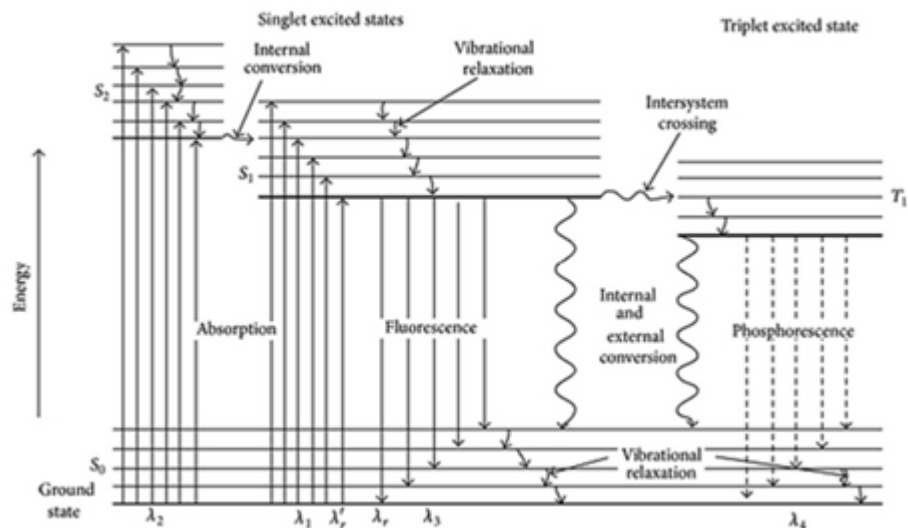
Alamar Blue เป็นสารละลาย resazurin ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้การอยู่รอดของเซลล์เป็นการวัดในเชิงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่ง resazurin ทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ (reagent) ใน Alamar Blue มีสมบัติเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ สามารถซึมผ่านเซลล์ได้ เมื่ออยู่ในรูปของออกซิไดซ์จะมีลักษณะเป็นสารละลายสีฟ้า เมื่อ resazurin ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะไปจับกับ electron acceptor ในกระบวนการ electron transport chain โดยไม่รบกวนกระบวนการทำงานปกติของเซลล์ resazurin จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) และเปลี่ยนไปอยู่ในรูปรีดิวซ์ เกิดเป็น resorufin ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีแดงสามารถวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดย Alamar Blue assay สามารถใช้งานได้หลากหลายและสามารถใช้ได้กับเซลล์ต่าง ๆ ของมนุษย์รวมถึงใช้ในแบคทีเรียและเชื้อรา (81, 82)

7.2 คุณลักษณะพื้นฐานของเซลล์

7.2.1 ฟลูออเรสเซนซ์ไมโครสโคป (Fluorescent microscope)

ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปีเป็นเทคนิคที่ง่าย เป็นเครื่องมือที่มีความไวในการวัด เช่น intensity polarization และ life time ของสารตัวอย่าง ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในทางการแพทย์และทางชีววิทยา ได้มีความก้าวหน้าในการศึกษาเกี่ยวกับนาโนเทคโนโลยี โดยเฉพาะในเรื่องของการสร้างวัสดุนาโนขึ้นมา โดยใช้ความรู้ทางเคมีวิเคราะห์ (analytical chemistry)

โดยส่วนใหญ่แล้วโมเลกุลมักจะมีอยู่โดยทั่วไปในสถานะพื้น (ground state) ที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อได้รับประจุสนามไฟฟ้า electromagnetic radiation (EM) โมเลกุลจะดูดซับพลังงาน (absorption) และเปลี่ยนไปอยู่ในสถานะกระตุ้น (excited state) แล้วปลดปล่อยพลังงาน (emission) ออกมา ซึ่งเราสามารถนำข้อมูลจาก emission spectrum มาใช้สำหรับวิธีการวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ซึ่งที่ใช้ประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์ คือ photoluminescence ได้แก่ fluorescence ซึ่งเกิดจากการที่โมเลกุลดูดกลืนพลังงานแสงเข้าไปจากสถานะพื้น (ground state) แล้วขึ้นไปสู่สถานะกระตุ้น (excited state) จากนั้นปลดปล่อยออกมาเพื่อกลับสู่สถานะพื้น (ground state) ซึ่งกระบวนการเกิดการดูดซับพลังงาน (absorption) และการปล่อยพลังงาน (emission) ของโปรตอนจะแสดงได้ด้วย Energy-level diagram หรือ Jabbonaski diagram



รูปที่ 7 Energy-Level diagram หรือ Jablonski diagram

Energy-Level diagram หรือ Jablonski diagram เป็นแผนภาพที่แสดงระดับพลังงานในโมเลกุล โดยปกติแล้วโมเลกุลจะอยู่ที่ระดับพลังงานต่ำสุดหรือ ground singlet state (S_0) และ excited state (S_1, S_2)

ข้อดีของการวิเคราะห์ด้วย photoluminescence คือ เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความไวสูง (sensitivity) มีความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้นที่กว้างและมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามสารที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะต้องเป็นสารที่สามารถดูดกลืนรังสี UV-VIS ได้ และจะต้องมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปแบบ fluorescence นอกจากนี้ สภาวะการวิเคราะห์ยังส่งผลต่อการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก จึงต้องมีการควบคุมสภาวะการวิเคราะห์อย่างเหมาะสม (83, 84)

8. การออกแบบการทดลอง (Design of experiment : DOE)

เป็นเครื่องมือทางสถิติเพื่อทำการทดลองอย่างเป็นระบบและวิเคราะห์ข้อมูลอย่างมีประสิทธิภาพ การออกแบบการทดลองเพื่อค้นหาผลกระทบของปัจจัยที่สนใจ (85) ซึ่งเทคนิคการออกแบบการทดลองแบ่งได้เป็น 4 รูปแบบ ได้แก่

8.1 การทดลองแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบ สำหรับศึกษาปัจจัยที่สองระดับ (2^k Full Factorial Design)

การทดลองแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบ สำหรับศึกษาปัจจัยที่สองระดับ เป็นเทคนิคการออกแบบการทดลองที่นิยม เนื่องจากสามารถศึกษาปัจจัยได้หลายปัจจัยพร้อมกันได้ และ

สามารถสรุปผลของปัจจัยหลัก (main factor) และผลกระทบร่วมหรืออันตรกิริยาระหว่างปัจจัยได้ (interaction) เป็นเทคนิคการออกแบบการทดลองที่มีการกำหนดระดับของปัจจัยหลักไว้ที่ระดับสูง และระดับต่ำ เท่านั้น โดยมีจำนวนของการทดลอง จะมีจำนวนเท่ากับ 2^k ซึ่ง k คือ จำนวนปัจจัย

ข้อเสียของการทดลองแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบสำหรับศึกษาปัจจัยที่สองระดับ คือ จำนวนการทดลองที่มีจำนวนมาก จึงไม่เหมาะสมกับปัจจัยจำนวน 3 ปัจจัยขึ้นไป (86)

8.2 การทดลองแบบแฟกทอเรียลบางส่วน สำหรับศึกษาปัจจัยที่สองระดับ (2^{k-q} Fractional Factorial Design)

การทดลองแบบแฟกทอเรียลบางส่วนสำหรับศึกษาปัจจัยที่สองระดับซึ่งพัฒนามาจากการทดลองแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบเพราะสามารถลดจำนวนของการทดลองลงได้ครึ่งหนึ่ง แต่มีความแม่นยำที่น้อยกว่า โดยในความเป็นจริงเมื่อดำเนินการทดลองจะมีเพียงปัจจัยหลัก (main effect) และปัจจัยร่วม (interaction) เท่านั้นที่มีความสำคัญ ซึ่งในการทดลองสามารถเลือกการทดลองในส่วนที่เกิดอันตรกิริยากันสูงสุดเป็นค่าลบหรือค่าบวกก็ได้ เช่น ABC ได้ค่า -, + (A คือปัจจัยแรก B คือปัจจัยสอง C คือปัจจัยสาม) เป็นต้น จึงสามารถลดขนาดการทดลองลงได้ (87)

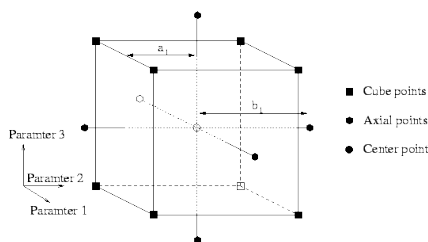
8.3 การทดลองแบบวิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface Methodology : RSM)

เป็นการออกแบบการทดลองที่เหมาะสมกับการทดลองตัวแปรต้นและตัวแปรตามที่มีความสัมพันธ์แบบ quadratic หรือความสัมพันธ์ที่ไม่ใช่เส้นตรง (non-linear) (88)

8.3.1 การทดลองแบบ Central Composite (Central Composite Design : CCD)

การทดลองแบบ Central Composite เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการวิเคราะห์ในกรณีที่ต้องการสมการเส้นโค้ง เป็นการทดลองที่คล้ายคลึงกับการทดลองแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบ สำหรับศึกษาปัจจัยที่สองหรือมากกว่าสองระดับ โดยที่มีการเพิ่มการทดลองแนวแกน (axial points) ขึ้นมา ทำให้สามารถวิเคราะห์สมการกำลังสองได้กล่าวคือ จะปรับตัวแปรที่ต้องการศึกษาไป ตัวแปรละ 3 ค่า (นิยามแทนด้วยสัญลักษณ์ -1, 0, +1) แต่แทนที่จะปรับตัวแปรแบบ Full combination หรือ full Factorial กลับเลือกบาง runs หรือบางสภาวะการทดลองที่จำเป็น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อการสร้างแบบจำลองทางสถิติ

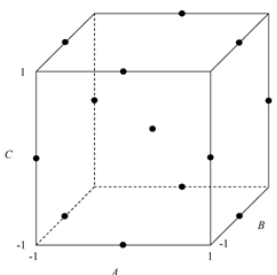
โดย model ที่ได้ จะยังคงมี ทั้ง main Effect, interaction และ quadratic terms โดยใช้ทรัพยากรไม่มากจนเกินไป โดยการทดลองประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ 1. factorial Points ซึ่งในที่นี้เป็นการนำ 2-level full factorial มาเป็นส่วนหนึ่งของการทดลองนั่นเอง 2. axial points เป็นการ ปรับค่าตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งในขณะที่ fix ให้ค่าตัวแปรอื่นอยู่ที่ค่ากลางและ 3. Center Points เป็นการปรับค่าของตัวแปรทุกตัวแปรที่ค่ากลาง



รูปที่ 8 Central Composite Design

8.3.2 การทดลองแบบ Box-Behnken (Box Behnken Design)

การทดลองแบบ Box-Behnken เป็นการออกแบบการทดลองที่มี 3 ระดับคือ สูง กลางและต่ำ คล้ายกับการทดลองแฟกทอเรียลเต็มรูปแบบ สำหรับศึกษาปัจจัยที่สองระดับที่มีการกำหนดตำแหน่งค่ากลาง แต่จะไม่มี การทดลองที่ตำแหน่งมุมจึงทำให้มีจำนวนการทดลองที่น้อยกว่า Central Composite และยัง สามารถสร้างสมการกำลังสองได้เช่นเดียวกับ Central Composite (89)



รูปที่ 9 Box Behnken Designs

8.4 การทดลองแบบแต่ละปัจจัยมีจำนวนไม่เท่ากัน (General Mixed Level Design)

ในบางกรณีเราไม่สามารถออกแบบการทดลองให้ทุกปัจจัยมีแค่สองหรือสามระดับเท่ากันได้ เช่นปัจจัยแรกแบ่งได้ 2 ระดับ ปัจจัยที่สองแบ่งได้สามระดับและปัจจัยที่สามแบ่งได้สี่ระดับ เป็นต้น ดังนั้น หากต้องการออกแบบการทดลองให้แต่ละปัจจัยมีจำนวนไม่เท่ากัน

เราจะใช้วิธีที่เรียกว่า การทดลองแบบแต่ละปัจจัยมีจำนวนไม่เท่ากัน (General Mixed Level Design) (90)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1.1 Eudragit RL100 (Evonik, Germany)
- 3.1.2 พอลิเมทิลเมทาไครเลต (Polymethyl methacrylate MW. 350,000 g/mol ; PMMA) (SIGMA-ALDRICHUSAS, USA)
- 3.1.3 เอทานอล (Ethanol)
- 3.1.4 ไดมัลทิลฟอร์มามิด (Dimethylformamide, DMF) (RCI Labscan , Thai)
- 3.1.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline) (gibco , UK)
- 3.1.6 Human beta-NGF (SIGMA-ALDRICH® , USA)
- 3.1.7 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (MERCK® , Germany)
- 3.1.8 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (SIGMA-ALDRICH® , USA)
- 3.1.9 1.5% Glutaraldehyde (SIGMA-ALDRICH® , USA)
- 3.1.10 Hexamethyldisilazane (HMDS) (SIGMA-ALDRICH® , USA)
- 3.1.11 Resazurin sodium salt (SIGMA-ALDRICH® , USA)

3.2 วัสดุอุปกรณ์

- 3.2.1 Micropipette (RAININ r Pipet-Lite XLS, USA)
- 3.2.2 Beaker ขนาด 20 50 100 250 และ 400 มิลลิลิตร (SCHOTT® , Germany)
- 3.2.3 Biological safety cabinet class 2 (ESCO® , AC2-651, USA)
- 3.2.4 Cell Culture Flasks (Corning® , USA)
- 3.2.5 CO₂ Incubator (SL® , US)

- 3.2.6 Drop shape analyzer (FTA[®] , 1000B, USA)
- 3.2.7 aluminium foil (DIAMOND[®] , China)
- 3.2.8 Fourier transform infrared spectroscopy (Thermo[®] , Nicolet 6700 FT-IR,USA)
- 3.2.9 magnetic stirrer (DiLigent ST-1200EC[®] , Thai)
- 3.2.10 magnetic stirrer และ stirrer bar (IKA[®] Ro10, Becthai Bangkok Equipment & Chemical CO., Ltd., Thailand)
- 3.2.11 Microwell plate (Nuncion[®] , Denmark)
- 3.2.12 Microplate reader (FLUOstar Omega[®] , Germany)
- 3.2.13 Microscope (OLYMPUS[®] , CKX41, USA)
- 3.2.14 needle (Nipro[®] , Japan)
- 3.2.15 Refrigerated centrifuge (MPW-260R, Poland)
- 3.2.16 Scanning electron microscope (LEO 1450VP, EDAX[®], USA)
- 3.2.17 Shaking incubator (Hercuvan[®] , Germany)
- 3.2.18 Single Syringe Pump (NEW ERA PumpSystemSInc., USA)
- 3.2.19 Syringe (Nipro[®], Thai)
- 3.2.20 Texture analyzer (TA, XT Plus, England)
- 3.2.21 Tips LTS 1 ml (RAININ[®] , USA)
- 3.2.22 SPECTROstar Omega Microplate reader (BMGLABTECH[®])
- 3.2.23 X-ray Diffractometer (Miniflex two[®])
- 3.2.24 Duran bottle (DURAN[®] , Germany)
- 3.2.25 Glass stirring rod
- 3.2.26 Tachometer (BENETECH[®] , China)
- 3.2.27 Human beta-NGF ELISA Kit (SIGMA-ALDRICHUSA[®], USA)
- 3.2.28 Sputter coater 7620 (Polaron Range.)

3.3 ทบทวนวรรณกรรม (Review literature)

เนื่องจากการทำงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการนำส่งโปรตีนผ่านเส้นใยนาโนจากวิธีการอิเล็กทรอนิกส์พินนิง จึงได้ทำการทบทวนวรรณกรรมในเรื่องต่าง ๆ ได้แก่ อิเล็กทรอนิกส์พินนิง ชนิดและสมบัติของพอลิเมอร์ Eudragit RL100 และพอลิเมอร์อื่น ๆ สมบัติของโปรตีนต่าง ๆ เช่น growth factors วิธีวิเคราะห์เส้นใยนาโน โปรตีนและการเลือกเซลล์ เป็นต้น

3.4 การออกแบบการทดลอง (Design of experiment : DOE)

กำหนดปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของ Eudragit RL100 (%w/v) ความเข้มข้นของพอลิเมทิลเมทาไครเลต (%w/v) และสัดส่วนของปริมาณพอลิเมอร์ระหว่าง Eudragit RL100 กับพอลิเมทิลเมทาไครเลต จากนั้นกำหนดระดับของแต่ละปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของ Eudragit RL100 (35%, 40%, 45% w/v) ความเข้มข้นของพอลิเมทิลเมทาไครเลต (13%, 14%, 15% w/v) และสัดส่วนของปริมาณพอลิเมอร์ระหว่าง Eudragit RL100 กับพอลิเมทิลเมทาไครเลต (ใส่ Eudragit RL100 อย่างเดียว ใส่พอลิเมทิลเมทาไครเลตอย่างเดียวและใส่พอลิเมอร์ทั้งสองอย่างละครึ่งของปริมาณที่เตรียมทั้งหมด) และนำข้อมูลทั้งปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยกับระดับของปัจจัยเพื่อออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรม Minitab version 18 ซึ่งใช้รูปแบบการทดลองแบบ Central Composite Design ซึ่งทำให้ได้สภาวะการทดลองของแต่ละครั้ง และจำนวนครั้งของการทดลองทั้งหมดออกมาซึ่งจำนวนครั้งของการทำการทดลองได้จากสมการที่ 1

$$\text{จำนวนครั้งของการทำการทดลอง} = \text{Factorial Points} + \text{Center Points} \& \text{Axial Points} \dots\dots(1)$$

3.5 การเตรียมเส้นใยนาโนด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์พินนิง

3.5.1 การเตรียมโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์พินนิง พอลิเมทิลเมทาไครเลต (PMMA) โดยใช้เครื่องอิเล็กทรอนิกส์พินนิง

เตรียมพอลิเมทิลเมทาไครเลต (PMMA) โดยใช้ตัวทำละลายคือ ไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ ที่ความเข้มข้น 12%, 13% และ 14% w/v โดยใช้ magnetic stirrer ผสมให้เข้ากันจนละลายหมดด้วยความร้อน 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายบรรจุลงกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิเมตร ที่ต่อเข้ากับเข็มโลหะขนาด 20G นำไปวางบน syringe pump และต่อหัวเข็มเข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15

กิโลโวลต์ อัตราการปล่อยสารละลาย 0.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับวัสดุรองรับ 15 เซนติเมตร อัตราเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับ 1200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

3.5.2 การเตรียมโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรสปินนิ่ง

เตรียม Eudragit RL100 โดยใช้ตัวทำละลายคือ เอทานอลและไดเมทิลฟอรัมไรต์ ไมดีนอัตราส่วน 6.5 : 3.5 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 35%, 40% และ 45% w/v โดยใช้ magnetic stirrer ผสมให้เข้ากันจนละลายหมดเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายบรรจุลงกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ต่อเข้ากับเข็มโลหะขนาด 20G นำไปวางบน syringe pump และต่อหัวเข็มเข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ อัตราการปล่อยสารละลาย 0.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับวัสดุรองรับ 15 เซนติเมตร อัตราเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับ 1200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

3.5.3 การเตรียมโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาไครเลตโดยใช้เครื่องอิเล็กโทรสปินนิ่ง

เตรียม Eudragit RL100 ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมพอลิเมทิลเมทาไครเลตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามสัดส่วนที่เท่ากัน ตัวอย่างเช่นถ้าเตรียมพอลิเมอร์ผสมปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ใช้อัตราส่วนของ Eudragit RL100 และพอลิเมทิลเมทาไครเลต ในปริมาตรที่เท่ากันคือ 10 มิลลิลิตร และนำมาผสมกันโดยใช้ magnetic stirrer โดยใช้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายบรรจุลงกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ต่อเข้ากับเข็มโลหะขนาด 20G นำไปวางบน syringe pump และต่อหัวเข็มเข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์ อัตราการปล่อยสารละลาย 0.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับวัสดุรองรับ 15 เซนติเมตร อัตราเร็วในการหมุนของวัสดุรองรับ 1200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง

3.6 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและเคมีของเส้นใยนาโน

3.6.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสชัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (*scanning electron microscopy: SEM*)

ตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสชัน ให้มีขนาด 0.5 X 0.5 เซนติเมตร นำไปติดบน stub จากนั้นนำไปเคลือบทองด้วยเครื่อง Sputter coater 7620 (Polaron Range.) จากนั้นนำตัวอย่างไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning electron microscope (LEO 1450VP, EDAX®, USA) หาค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนและการจัดเรียงตัวจากภาพถ่าย SEM ด้วยโปรแกรมในการวิเคราะห์ภาพ (JMicroVision V.1.2.7, Switzerland) เป็นจำนวน 100 ตัวอย่าง

3.6.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสชัน ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR)

ตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสชัน ให้มีขนาด 5 X 5 เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวางไว้บริเวณโลหะที่มีลักษณะเป็นวงกลม จากนั้นทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (Thermo Scientific™ Nicolet™ IS™ 5 FTIR Spectrometer) เมื่อบริเวณส่วน probe ของเครื่องที่มี monolithic diamond crystal สัมผัสกับตัวอย่างจะได้สเปกตรัมของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสชัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้ออกมาด้วยโปรแกรม OMNIC Paradigm Software ในช่วงความยาวคลื่น 400 - 4000 เซนติเมตร⁻¹

3.6.3 การตรวจสอบความเป็นผลึกของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสชัน ด้วยเครื่อง powder X-ray diffractometer (PXRD)

ตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสชันที่มีขนาด 5 x 5 เซนติเมตร จากนั้นใส่ตัวอย่างในเครื่อง PXRD จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ โดยใช้แหล่งกำเนิดเป็น Nickel-filtered Cu radiation และสภาวะที่ใช้ คือ 30 กิโลโวลต์ (kV) 10 มิลลิแอมป์ (mA) และใช้ทีตา (theta) ที่ 5-40 ที่ตาร์ท (theta) และนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SmartLab Studio-II software

3.6.4 การวิเคราะห์ลักษณะการหยดตัวของน้ำ (*Drop Shape Analyzer*)

ศึกษาลักษณะของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โดยดูความชอบน้ำของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ของพื้นผิว วิเคราะห์หุ้มสัมผัสของหยดน้ำบนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเครื่อง Drop Shape Analyzer (FTA 100, First Ten Angstroms Inc, Portsmouth, VA) โดยหยดน้ำกลั่นจากปลายหลอดเข็มฉีดยาลงบนพื้นผิวของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ถ่ายภาพของหยดน้ำทันทีที่หยดน้ำสัมผัสกับผิวของแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์นานาโนทุก 20 วินาที เป็นเวลา 60 วินาที ผ่านเครื่องวิเคราะห์ภาพ (image analyzer) และวัดมุมระหว่างหยดน้ำ และพื้นผิวของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์

3.7 การตรึงโปรตีนลงโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์

3.7.1 การตรึงโปรตีนบนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์

การตรึงโปรตีนบนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โดยใช้กระบวนการ ionic adsorption โดยทำการตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ให้มีขนาดประมาณ 1.5×1.5 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 2 มิลลิกรัม นำไปฆ่าเชื้อด้วย UV ทั้งสองด้านของแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ โดยใช้เวลาในการฆ่าเชื้อด้านละ 30 นาที จากนั้นนำไปตรึงบน cell crown ใน 24-well plate และใส่สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1000 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมที่มีเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ ระยะเวลาละลายที่เคลือบเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทั้งหมดที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเส้นใยที่บรรจุโปรตีนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy: SEM)

ตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ให้มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร นำไปติดบน stub จากนั้นนำไปเคลือบทองด้วยเครื่อง Sputter coater 7620 (Polaron Range.) จากนั้นนำตัวอย่างไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning electron microscope (LEO 1450VP, EDAX®, USA) หาค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์และการจัดเรียงตัว จากภาพถ่าย SEM ด้วยโปรแกรมในการวิเคราะห์ภาพ (JMicroVision V.1.2.7, Switzerland) เป็นจำนวน 100 ตัวอย่าง

3.7.3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยนาโนด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR)

ตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ให้มีขนาด 5 x 5 เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวางไว้บริเวณโลหะที่มีลักษณะเป็นวงกลม จากนั้นทำการตรวจสอบหมู่โครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (Thermo Scientific™ Nicolet™ IS™ 5 FTIR Spectrometer) เมื่อบริเวณส่วน probe ของเครื่องที่มี monolithic diamond crystal สัมผัสกับตัวอย่างจะได้สเปกตรัมของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้ออกมาด้วยโปรแกรม OMNIC Paradigm Software ในช่วงความยาวคลื่น 400 - 4000 เซนติเมตร⁻¹

3.7.4 การตรวจสอบความเป็นผลึกของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเครื่อง powder X-ray diffractometer (PXRD)

ตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่มีขนาด 5x5 เซนติเมตร จากนั้นใส่ตัวอย่างในเครื่อง PXRD จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ โดยใช้แหล่งกำเนิดเป็น Nickel-filtered Cu radiation และสภาวะที่ใช้ คือ 30 กิโลโวลต์ (kV) 10 มิลลิแอมป์ (mA) และใช้ทีตา (theta) ที่ 5-40 ทีตาร์ท (theta) และนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SmartLab Studio-II software

3.7.5 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วย ELISA test kit

ภายใน Elisa test kit ประกอบด้วย

1. Human Beta-NGF Antibody-coated ELISA Plate (Item A)
2. Wash buffer (Item B)
3. Lyophilized Human beta-NGF Protein Standard (Item C)
4. Biotinylated Human beta-NGF Detection Antibody (Item F)
5. HRP-Streptavidin (Item G)
6. TMB Reagent (HRP Substrate, Item H)
7. Elisa stop solution (Item I)
8. Assay/Sample Diluent Buffer (Item E2)

3.7.5.1 การเตรียมสาร

ขั้นตอนที่ 1 น้ำยาทดสอบและตัวอย่างโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินที่บรรจุโปรตีนวางไว้ในอุณหภูมิห้อง (18-25 องศาเซลเซียส) ก่อนใช้งาน

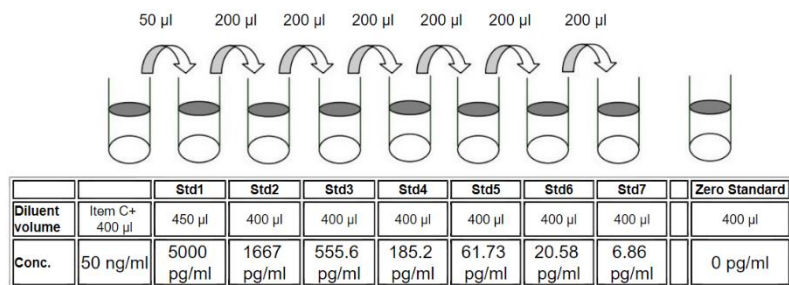
ขั้นตอนที่ 2 การเตรียม Assay/Sample Diluent Buffer dilution

เจือจาง Assay / Sample Diluent Buffer (Item E2) 5 เท่า ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนก่อนใช้ 1x Assay/Sample Diluent Buffer

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (Sample dilution)

นำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ 450 ไมโครลิตรของ phosphate buffer เพื่อจะได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม จากนั้นทำการดูดออกมา 50 ไมโครลิตร นำไปผสมกับ 450 ไมโครลิตร เพื่อจะได้ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม

ขั้นตอนที่ 4 การเตรียม target protein standard



รูปที่ 10 ความเข้มข้นของ protein standard

สปินขวด Lyophilized Human beta-NGF Protein Standard (Item C) เล็กน้อย จากนั้นเติม Item E2 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ลงขวด Item C เพื่อเตรียมเป็น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของ standard solution ผสมจนกลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปต 50 ไมโครลิตร ของสารละลาย beta-NGF standard ลงในหลอดทดลองพร้อมกับ ปิเปต 450 ไมโครลิตรของ Item E2 เพื่อเตรียมเป็น 5,000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตรของ standard solution ทำการปิเปต 400 ไมโครลิตรของ Item E2 ลงแต่ละหลอดทดลองที่เหลือ ใช้ 5,000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตรของ standard solution เพื่อเตรียมดังภาพ โดยผสมให้เข้ากันก่อนที่จะนำไปใช้หลอดทดลองต่อไป โดย

หลอด zero standard คือ Item E2 ปริมาณ 400 มิลลิลิตร (0 พิโคกรัม ต่อมิลลิลิตร)

ขั้นตอนที่ 5 การเตรียม Wash Buffer 1 ขวด

ในกรณีที่ Wash Buffer (20x) (Item B) มีผลึกคริสตัลเกิดขึ้น ให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิห้องและผสมให้เข้ากันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เจือจาง 20 มิลลิลิตรของ Wash Buffer ด้วยน้ำปราศจากไอออนหรือน้ำกลั่น ปรับให้เป็น 400 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 6 การเตรียม Biotinylated Detection Antibody

สปินขวด Biotinylated Human beta-NGF Detection Antibody (Item F) ก่อนใช้ เติม Item E2 ปริมาณ 100 มิลลิลิตรลงในขวด Item F จากนั้นปิเปตขึ้นและลงเพื่อผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 5 วัน) นำ สารละลาย Item F เจือจางด้วย Item E2 80 เท่า

ขั้นตอนที่ 7 การเตรียม HRP-Streptavidin Concentrate

สปินขวด HRP-Streptavidin (item G) และจากนั้นปิเปตขึ้นและลงเพื่อผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนที่จะนำไปใช้ เนื่องจากในการเก็บสาร อาจจะทำให้เกิดการตกตะกอนได้ นำ Item G ไปเจือจาง 800 เท่าด้วย item E2 ตัวอย่างเช่น ทำการสปินขวด item G และทำการผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปต จากนั้นทำการปิเปต 15 ไมโครลิตรด้วย HRP-Streptavidin concentrate ลงในหลอดทดลองที่มี Item E2 ปริมาณ 12 มิลลิลิตร จะได้ สารละลายเจือจาง HRP-Streptavidin solution 800 เท่า (ห้ามทำการผสมแล้วทิ้งไว้ข้ามคืน)

3.7.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Human beta-NGF (% content)

1. นำแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปีนมาตรึงด้วยโปรตีนความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปีนที่บรรจุโปรตีนลงในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ที่ pH 7.4 ใน

สภาวะอุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส และเก็บ Sample ที่ 1 2 และ 3 เดือน เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sandwich ELISA ต่อไป

2. นำ reagents และสารละลายตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิตั้งที่ (18-25 องศาเซลเซียส) ก่อนใช้งาน

3. เติมน้ำ 100 ไมโครลิตรของ standard แต่ละความเข้มข้น และสารละลายตัวอย่างลงในหลุม จากนั้นปิดฝาและนำไปปั่นเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิตั้งที่พร้อมกับเขย่าเบาๆ

4. ทิ้งสารละลายและล้างแต่ละหลุม 4 ครั้ง ด้วย 300 ไมโครลิตร Wash buffer โดยใช้ multi-channel pipette ซึ่งในแต่ละครั้งควรดูดของเหลวทิ้งอย่างสมบูรณ์ หลังจากการล้างครั้งสุดท้าย ให้พลิก plate และซับด้วยกระดาษสะอาด

5. เติมน้ำ 100 ไมโครลิตรของ Biotinylated Detection Antibody ลงในแต่ละหลุม นำไปปั่นที่อุณหภูมิตั้งที่พร้อมกับเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ดูดสารละลายออกและทำการล้างตามขั้นตอนที่ 3

7. เติมน้ำ Biotinylated Detection Antibody ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และปิดฝา นำไปปั่นที่อุณหภูมิตั้งที่พร้อมกับเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 45 นาที

8. ดูดสารละลายออกและทำการล้างตามขั้นตอนที่ 3

9. เติมน้ำ 100 ไมโครลิตร ของ ELISA Colorimetric TMB Reagent (Item H) ลงในแต่ละหลุม นำไปปั่นที่อุณหภูมิตั้งที่และปราศจากแสง พร้อมกับเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 30 นาที

10. ขั้นตอนสุดท้ายเติมน้ำ 50 ไมโครลิตร ของ Stop Solution ลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ที่ 450 นาโนเมตร ทันที

11. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค ELISA และหา % content จากสมการ(1)

$$\% \text{ content} = \text{Le} / \text{Li} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

โดยกำหนดให้ Le = ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่วัดได้หลังจากการตรึง

Li = ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนทั้งหมดที่บรรจุเริ่มต้น

3.7.6 ศึกษาการปลดปล่อยโปรตีน Nerve Growth Factors (NGFs)

ศึกษาการปลดปล่อยของโปรตีนโดยนำโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินที่บรรจุโปรตีนแช่ลงในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Shaking incubator ที่ 0.083, 0.25, 0.5, 1, 7, 14 วัน (ดูขั้นตอนการวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.7.5.2)

3.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท

เซลล์ประสาทต้นกำเนิดที่ใช้คือเซลล์ชวานน์ที่แยกได้จากเซลล์ประสาทหนู (*Rattus norvegicus*) (CRL-2941™) American type culture collection (ATCC) เลี้ยงใน cell culture flask ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS) + penicillin + streptomycin + Non essential® + Glutamax® จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5%

สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์และสัญญาณวิทยาของเซลล์บนเส้นใย นำโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินตรึงไว้ใน 24-well plates ด้วย cell crown บรรจุ 1 มิลลิลิตรของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ลงโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินโดยจะมีความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อหลุม

3.8.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินที่บรรจุโปรตีน

สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยนำเซลล์ที่รู้จำนวนแน่นอนลงใน 24 well plate ได้แก่ 0, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000 เซลล์ ตามลำดับ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (n=3) จากนั้นทำการบ่มให้เซลล์ติดกับ plate โดยใช้ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ปิดเปิด 100 ไมโครลิตรของ Alamar blue stock solution (5 mM) ใส่ลงแต่ละหลุม นำตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 5% ของคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ โดยในแต่ละชั่วโมงให้แล้วเปิดสารละลาย 200 ไมโครลิตรลงแต่ละหลุมของ black 96-well plate และทำการวัด fluorescence โดยความเข้มข้น

ของ fluorescence อยู่ที่ 530 excitation และ 590 emission โดยใช้เครื่อง SPECTROstar Omega Microplate reader (BMGLABTECH®)

ทำการตรึงโปรตีนบนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปีนโดยกระบวนการ ionic adsorption โดยทำการตัดตัวอย่างแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปีนให้มีขนาดประมาณ 1.5 x 1.5 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 2 มิลลิกรัม นำไปฆ่าเชื้อด้วย UV ทั้งสองด้านของแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปีน โดยใช้เวลาในการฆ่าเชื่อด้านละ 30 นาที

การเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทหนูจะถูกประเมินโดย Alamar blue assay ณ วันที่ 1, 4, และ 7 หลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ปิเปต 100 ไมโครลิตรของ Alamar blue stock solution (5 mM) ใส่ลงแต่ละหลุม นำตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 5% ของคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากทำการบ่มเรียบร้อยแล้วปิเปตสารละลาย 200 ไมโครลิตรลงแต่ละหลุมของ black 96-well plate และทำการวัด fluorescence โดยความเข้มข้นของ fluorescence อยู่ที่ 530 excitation และ 590 emission โดยใช้เครื่อง SPECTROstar Omega Microplate reader (BMGLABTECH®)

3.8.2 การศึกษาสัญญาณวิทยาของเซลล์บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปีน

ศึกษาสัญญาณวิทยาของเซลล์ชวานที่บนโครงร่างเส้นใยนาโนแต่ละชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หลังจากบ่มมาเป็นเวลา 7 วัน ทำการล้างเส้นใยนาโนด้วย 0.1 M PBS และตรึงด้วย 1.5% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.1 M PBS และทำให้แห้งโดยใช้ ethanol ที่ความเข้มข้น 50%, 70%, 90%, และ 100% อย่างละ 1 มิลลิตร เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ ปิเปต hexamethyldisilazane (HMDS) 1 มิลลิตร ลงโครงร่างเส้นใยนาโน เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วดูด HMDS ที่เหลือออกทิ้งไว้ใน fume hood ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

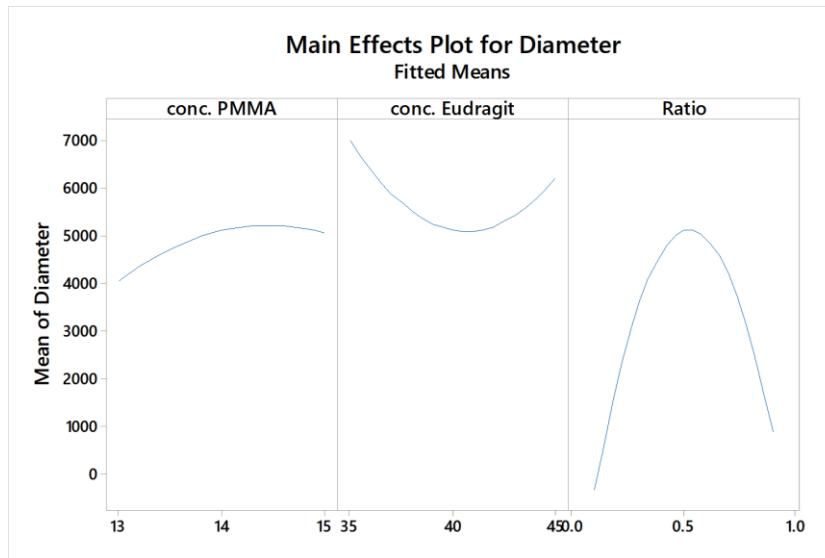
การทำการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง แสดงค่าเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์บนเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปีน Eudragit RL100 ผสมพอลิเมทิลเมทาโครเลตที่บรรจุโปรตีน วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย T-test และมีค่า P value < 0.05 คือ มีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13.0

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การออกแบบการทดลอง (Design of experiment : DOE)

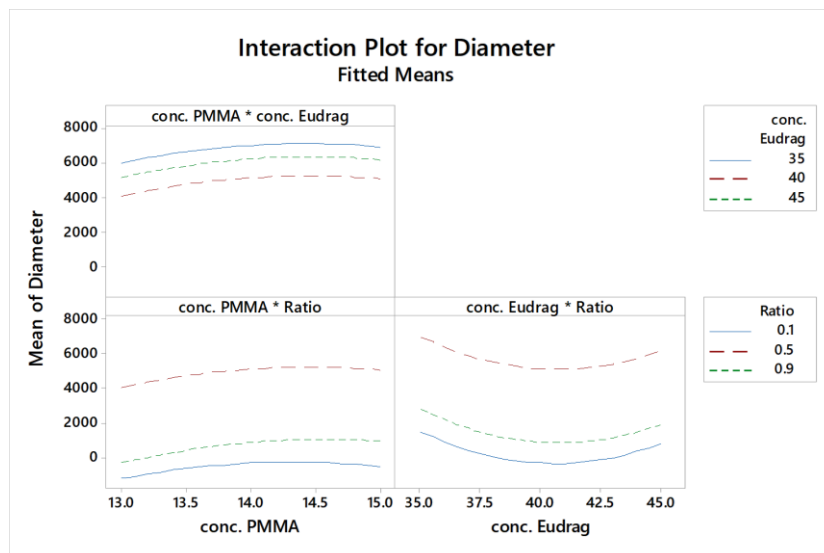
ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นของ PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ

run order	PMMA (%w/v)	Eudragit RL100 (%w/v)	ratio	diameter (nm)
1	13	35	0.1	331.94
2	15	35	0.1	332.52
3	13	45	0.1	529.91
4	15	45	0.1	502.22
5	13	35	0.9	1351.00
6	15	35	0.9	1822.81
7	13	45	0.9	1223.86
8	15	45	0.9	1874.85
9	13	40	0.5	3438.76
10	15	45	0.5	7346.54
11	14	35	0.5	9565.47
12	14	45	0.5	5316.64
13	14	40	0.1	373.52
14	14	40	0.9	1831.63
15	14	40	0.5	3917.13
16	14	40	0.5	4249.43
17	14	40	0.5	4706.91
18	14	40	0.5	5308.91
19	14	40	0.5	4732.38
20	14	40	0.5	4604.75

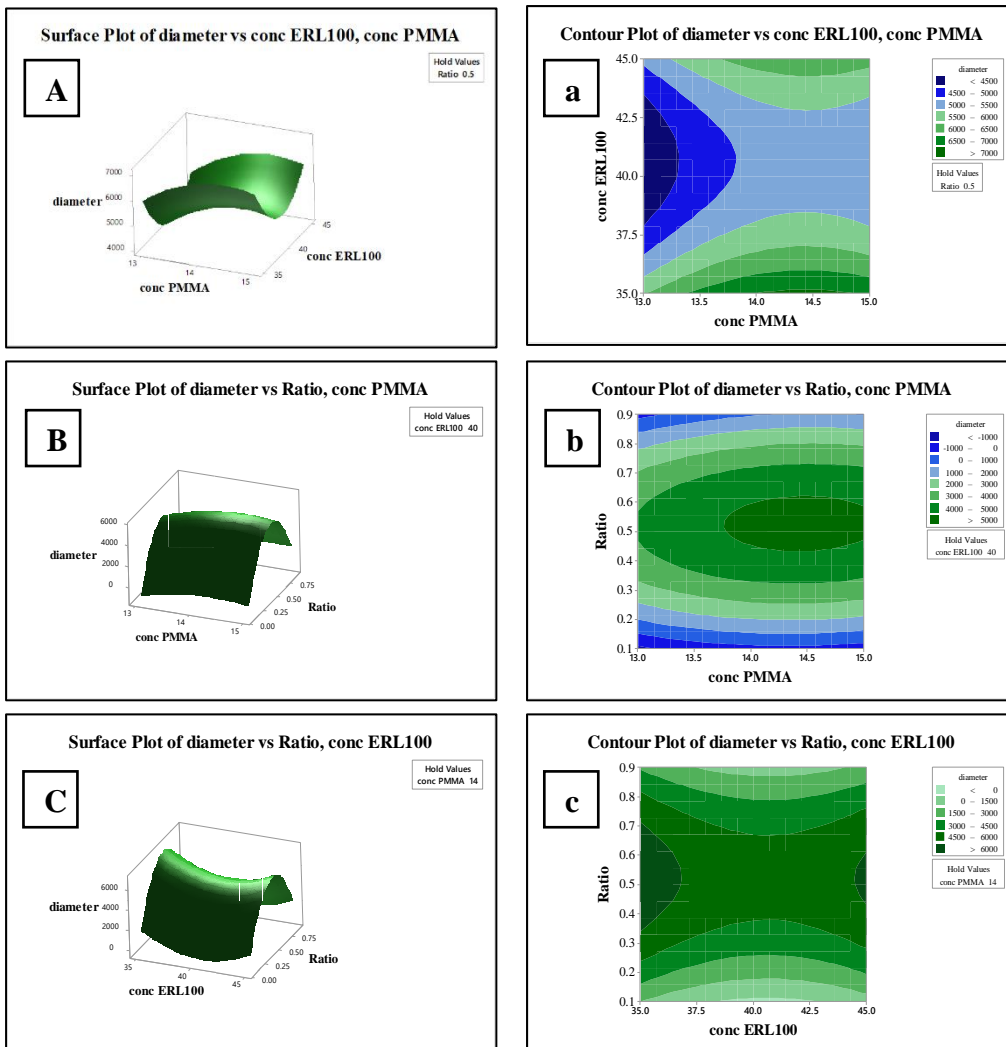


รูปที่ 11 Perturbation plot ของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ

จากรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ PMMA และ Eudragit RL100 ไม่ค่อยส่งผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย แต่การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง PMMA และ Eudragit RL100 จะส่งผลต่อขนาดของเส้นใยมาก

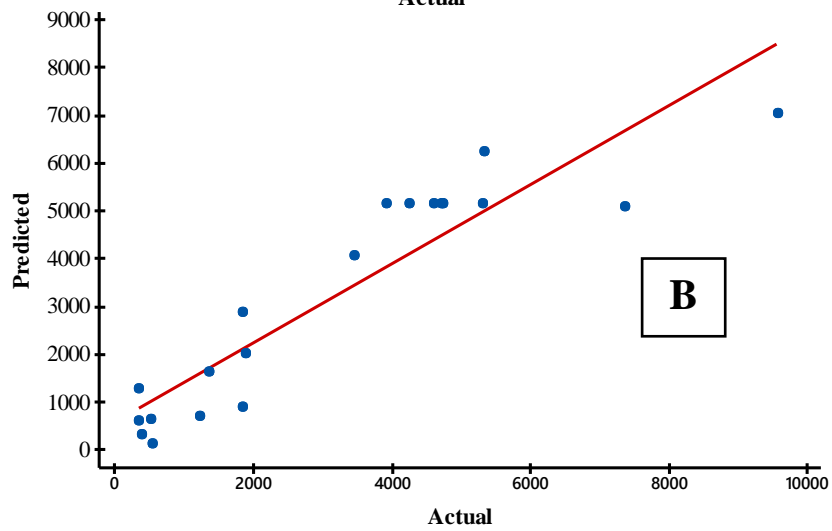
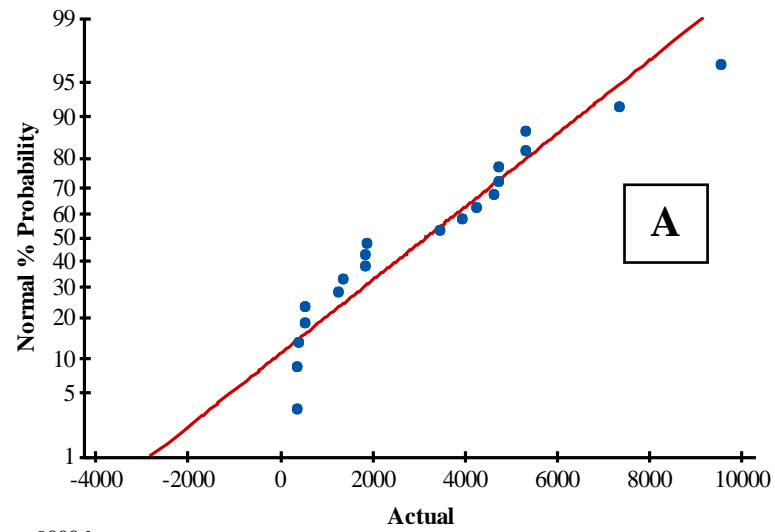


รูปที่ 12 Interaction plot ระหว่าง pairwise variables ของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ

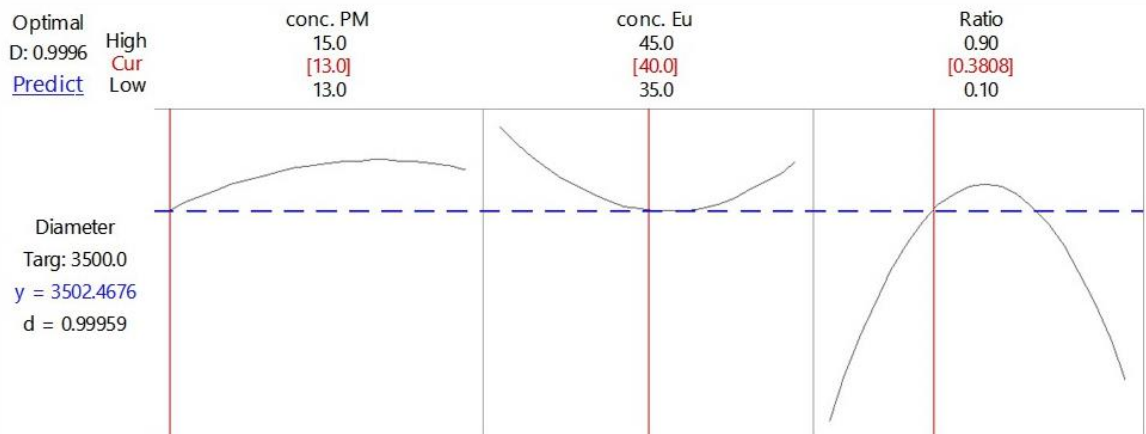


รูปที่ 13 Response surface and contour plots for the mutual effects ของ: (A) และ (a) ความเข้มข้นของ PMMA กับความเข้มข้นของ Eudragit RL100 (B) และ (b) ความเข้มข้นของ PMMA กับอัตราส่วน (C) และ (c) ความเข้มข้นของ Eudragit RL100 กับอัตราส่วน จากการออกแบบการทดลองทำให้ได้สมการที่สามารถทำนายค่า เส้นผ่านศูนย์กลางของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ

$$\text{Diameter} = -18444 + 15955 \text{ conc. Eudragit} - 4869 \text{ conc. PMMA} + 27921 \text{ ratio} - 564 \text{ conc. Eudragit} * \text{conc. Eudragit} + 59.4 \text{ conc. PMMA} * \text{conc. PMMA} - 30336 \text{ ratio} * \text{ratio} + 4 \text{ conc. Eudragit} * \text{conc. PMMA} + 359 \text{ conc. Eudragit} * \text{ratio} - 28 \text{ conc. PMMA} * \text{ratio}$$



รูปที่ 14 กราฟแสดงการวิเคราะห์เส้นผ่านศูนย์กลางของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ : (A) Normal probability plot (B) กราฟระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางจากการทำนายกับในทางปฏิบัติ



รูปที่ 15 แสดงการทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่จะได้เส้นผ่านศูนย์กลาง 3,500 นาโนเมตร โดยหากต้องการขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3,500 นาโนเมตรจะต้องใช้ PMMA ความเข้มข้น 13 %w/v Eudragit RL100 ความเข้มข้น 40 %w/v และอัตราส่วนระหว่าง Eudragit RL100 ผสม PMMA เท่ากับ 60:40 เป็นต้น

ตารางที่ 4 แสดงความแตกต่างของแต่ละสภาวะการทดลองที่เลือกใช้ในการผลิตโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ PMMA (%w/v)	ความเข้มข้นของ Eudragit RL100 (%w/v)	ความเข้มข้นของ NGF (ng/ml)
C1	13	-	-
C2	-	40	-
C3	13	40	-
CL1	13	-	100
CL2	-	40	100
CL3	13	40	100

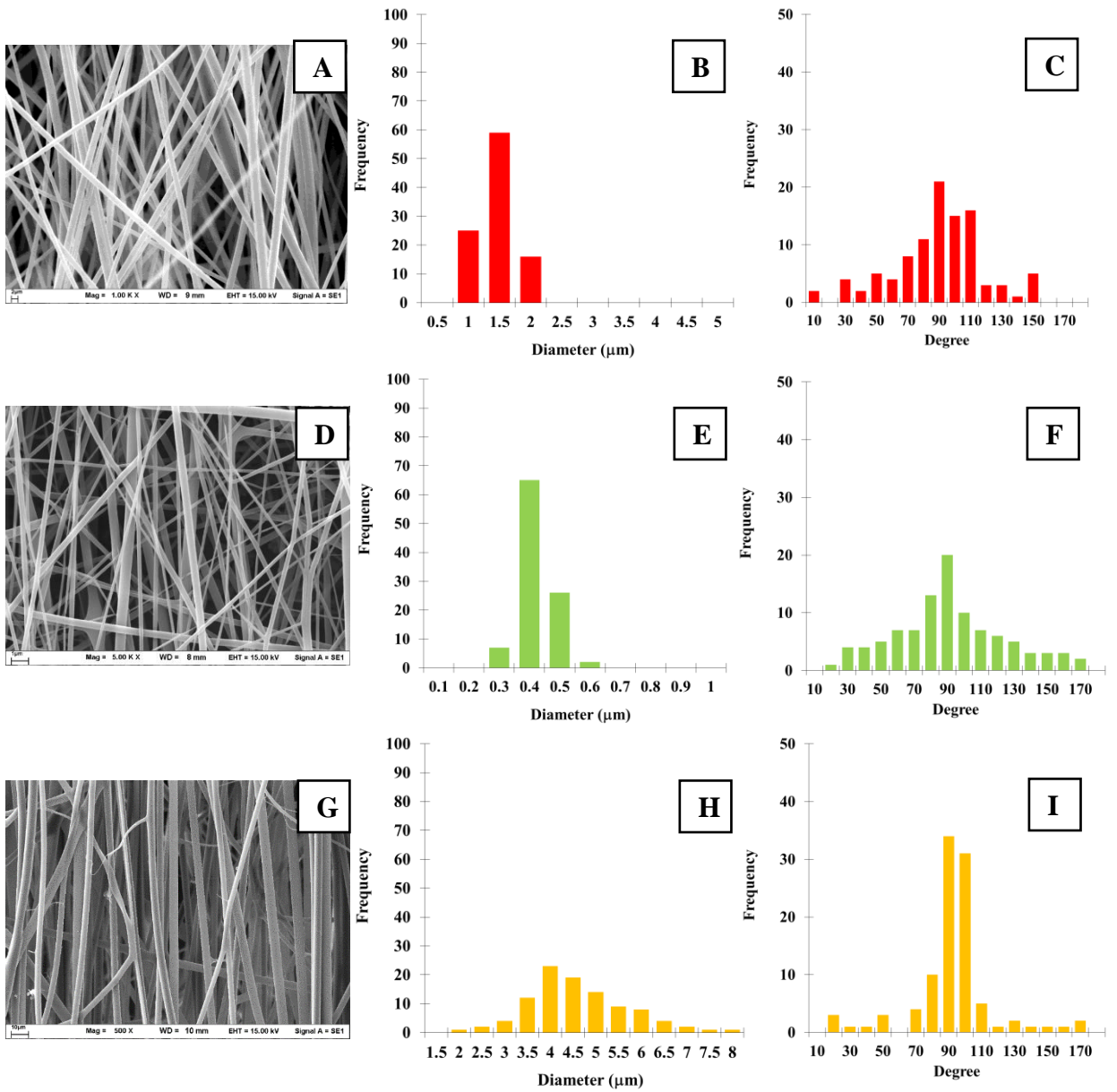
จากตารางที่ 4 แสดงสภาวะการผลิตโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ โดยเลือกจากการทำนายสภาวะเพื่อที่จะได้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 3,500 นาโนเมตร ประกอบด้วย PMMA 13% w/v และ Eudragit RL100 40% w/v โดยอัตราส่วนระหว่าง Eudragit RL100 กับ PMMA ที่ใช้ คือ 60 ต่อ 40 จึงทำการเปรียบเทียบกับ PMMA 13% w/v และ Eudragit RL100 40% w/v รวมทั้งสิ้น 3 สภาวะการทดลอง

4.2 ศึกษาสมบัติและลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1, C2 และ C3

4.2.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองค์การจัดเรียงของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1, C2 และ C3

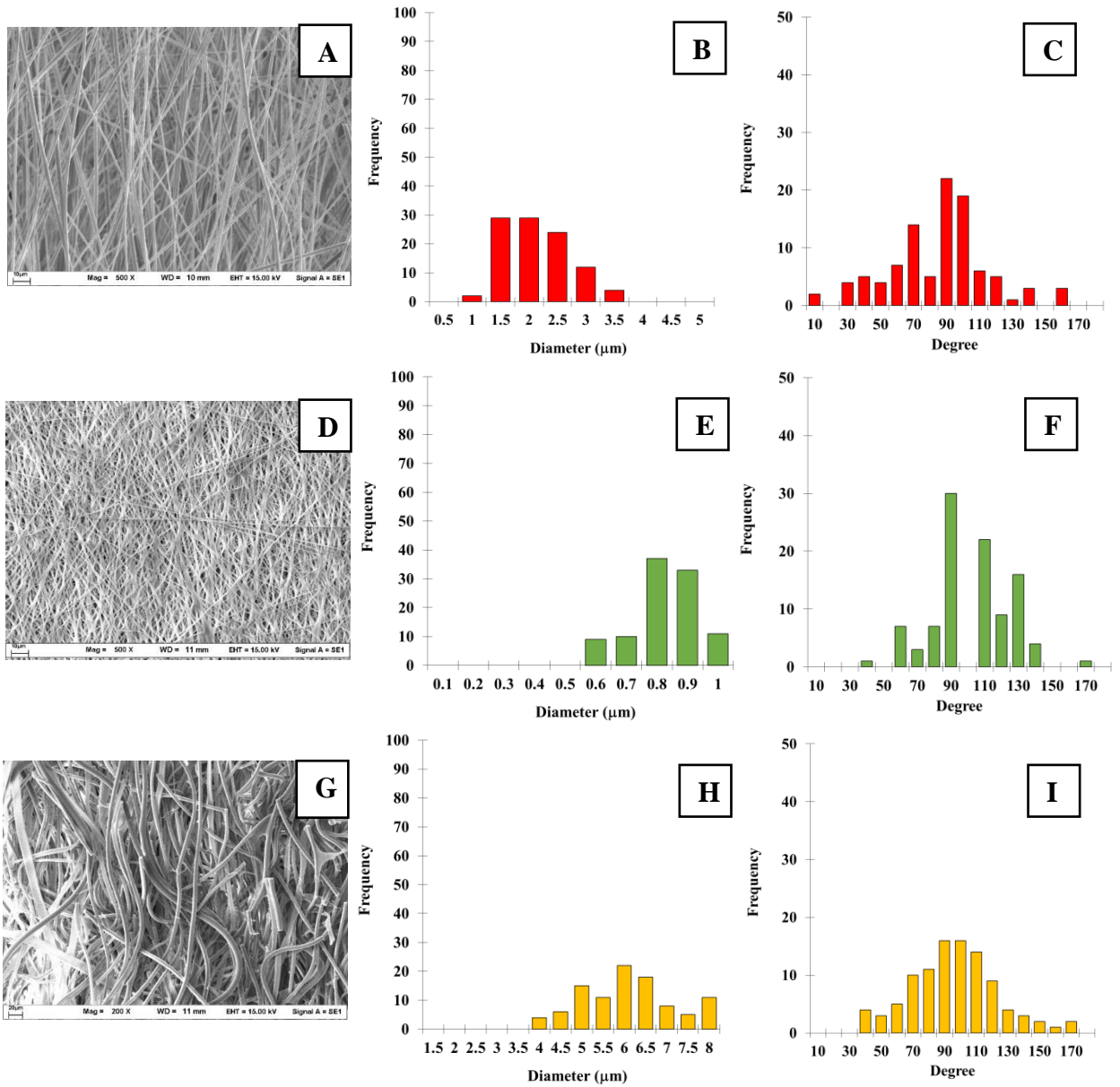
ตารางที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1 C2 และ C3

ตัวอย่าง	ลักษณะของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์		
C1			เส้นใยสีขาว มีลักษณะฟูเรียงกันเป็นชั้น มีความยืดหยุ่น
C2			เส้นใยสีขาว
C3			เส้นใยสีขาว เรียงกันเป็นแนวเดียวกันชัดเจน



รูปที่ 16 แสดงลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ : (A) C1 (D) C2 และ (G) C3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ : (B) C1 (E) C2 และ (H) C3 และองศาการจัดเรียงตัวของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ : (C) C1 (F) C2 และ (I) C3

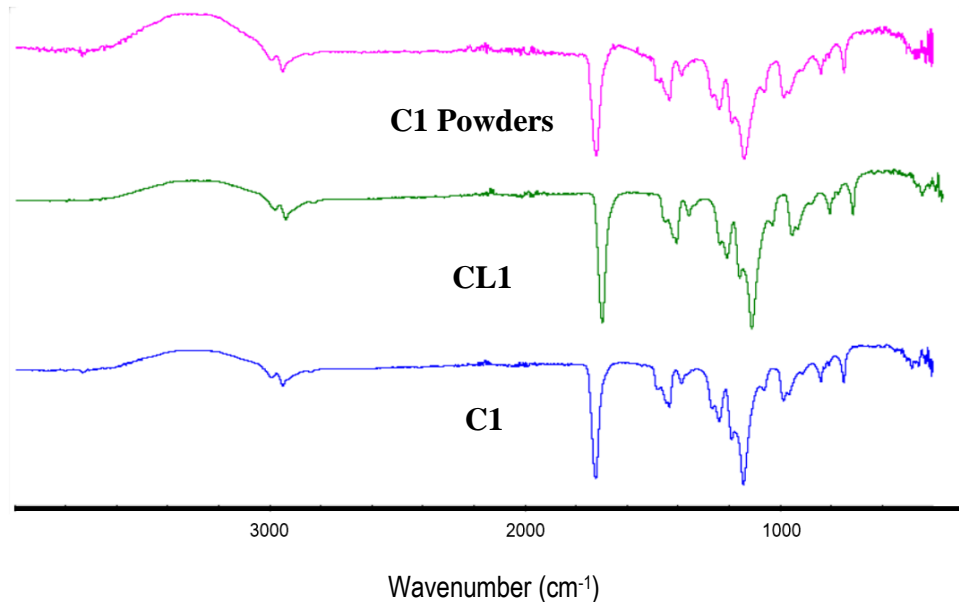
4.3 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่บรรจุ NGFs



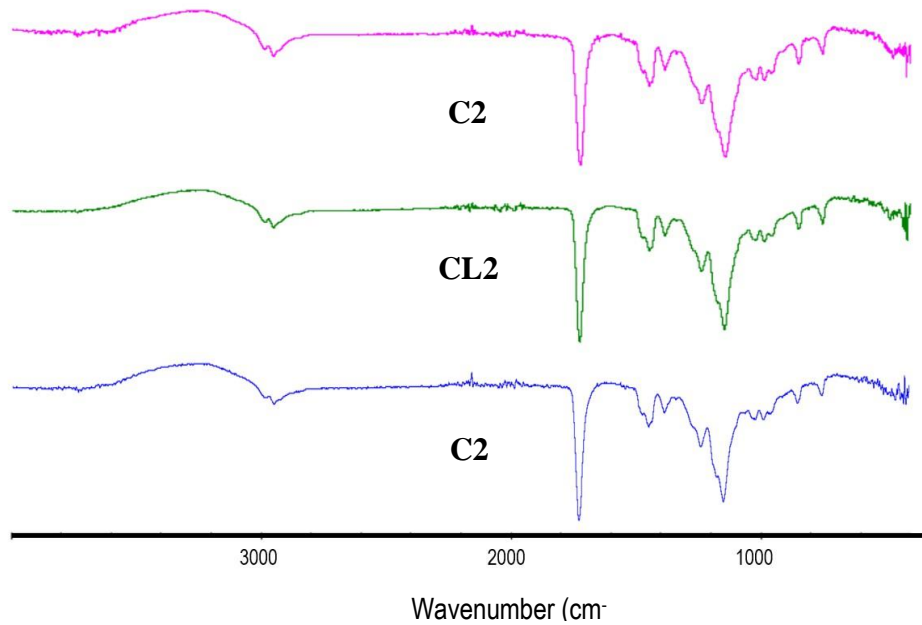
รูปที่ 17 แสดงลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ : (A) CL1, (D) CL2 และ (G) CL3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ : (B) CL1, (E) CL2 และ (H) CL3 และองศาการจัดเรียงตัวของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ : (C) CL1, (F) CL2 และ (I)

CL3

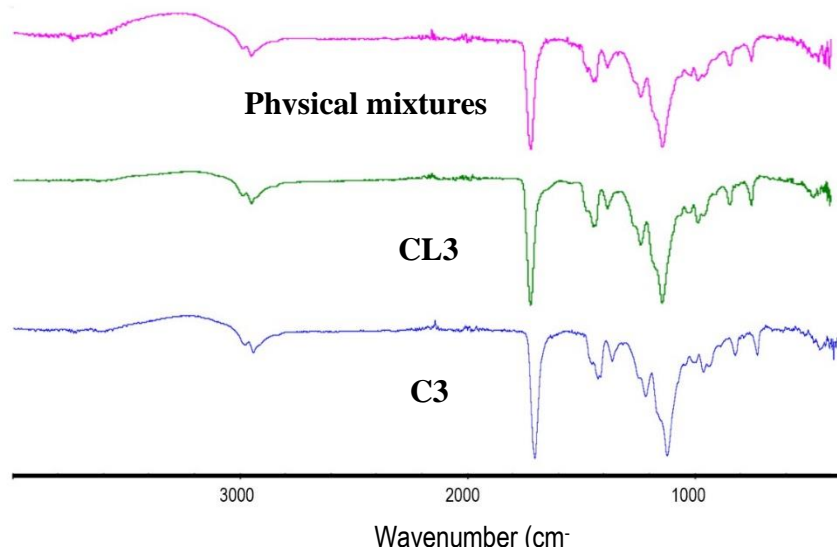
4.4 ศึกษาหมู่โครงสร้างของผงและเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเครื่อง FTIR



รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างผง C1 เส้นใย C1 และเส้นใย CL1

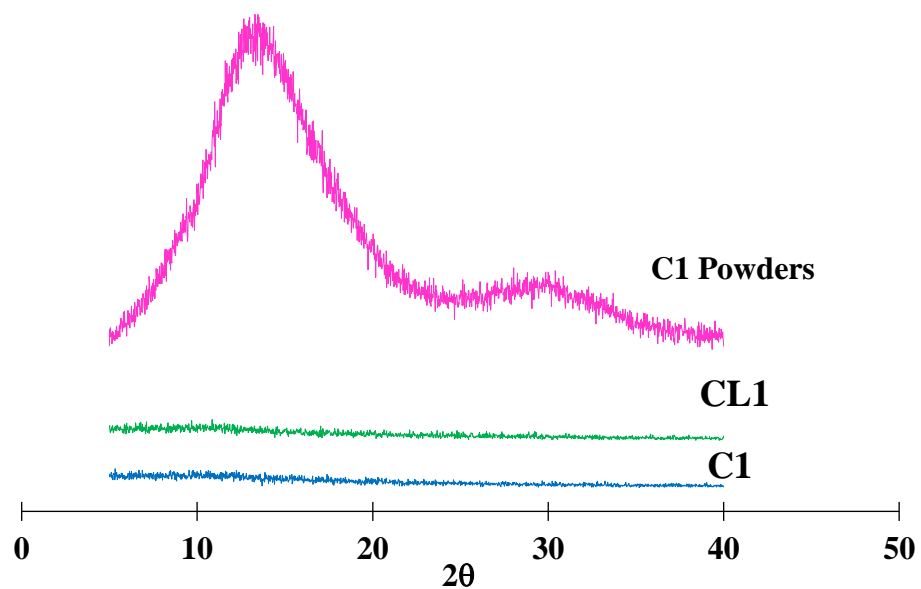


รูปที่ 19 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างผง C2 เส้นใย C2 และเส้นใย CL2

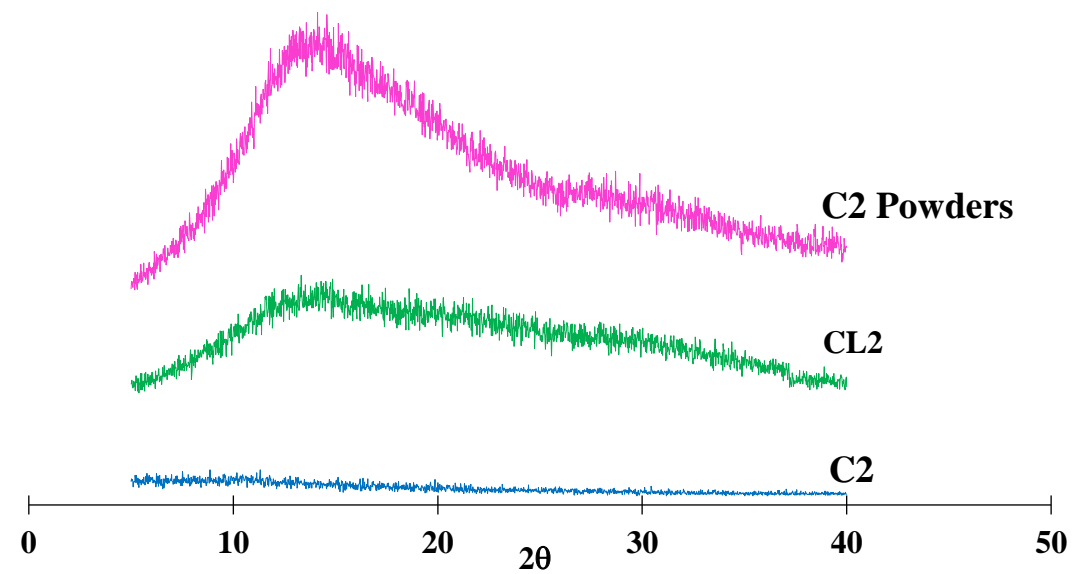


รูปที่ 20 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างผง C3 (Physical mixtures) เส้นใย C3 และเส้นใย CL3

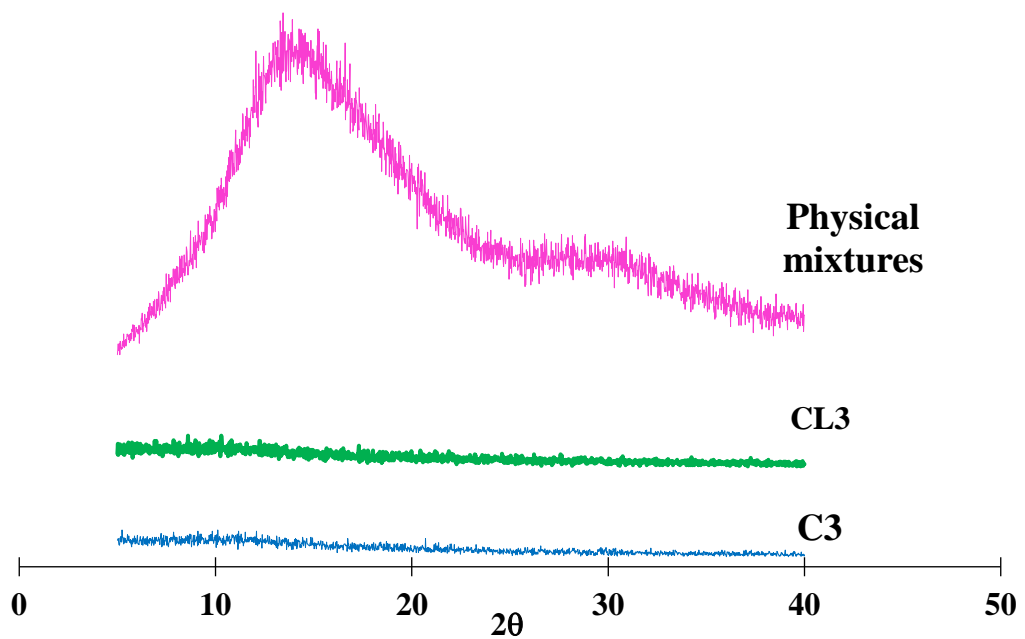
4.5 ผลการทดสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทอด้วยเครื่อง Powder X-Ray Diffraction (PXRD)



รูปที่ 21 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C1 เส้นใย C1 และเส้นใย CL1

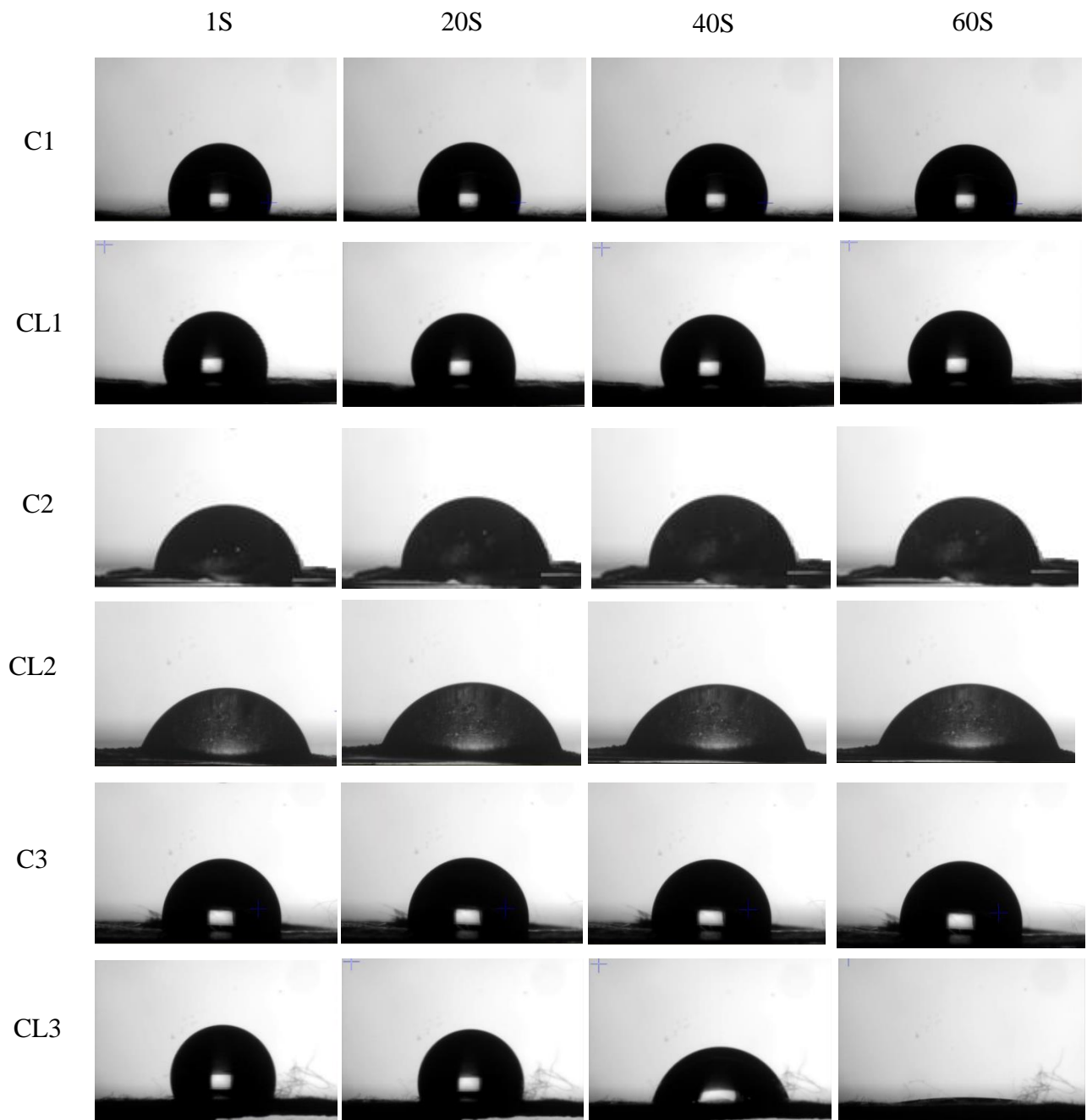


รูปที่ 22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C2 เส้นใย C2 และเส้นใย CL2



รูปที่ 23 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C3 (Physical mixtures) เส้นใย C3 และเส้นใย CL3

4.6 ผลการวิเคราะห์ลักษณะการหยดตัวของหยดน้ำด้วยเครื่อง Drop shape analyzer



รูปที่ 24 แสดงมุมของหยดน้ำที่อยู่บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์

ตารางที่ 6 แสดงมุมของหยดน้ำที่อยู่บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์

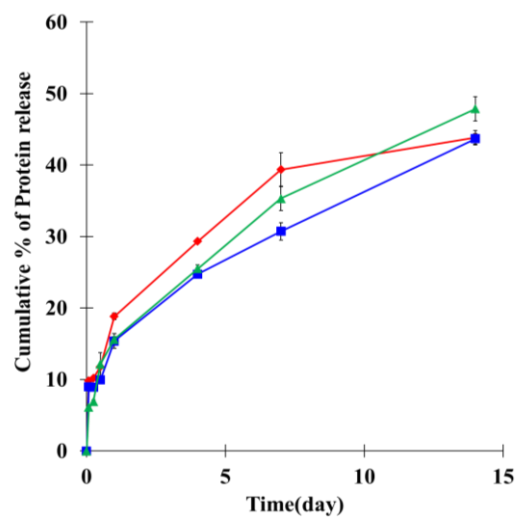
ตัวอย่าง	เวลา (วินาที)	ขนาดมุม (องศา)			ค่าเฉลี่ย
C1	1	103	104	109	105.33 ± 3.21
	20	100	101	107	102.67 ± 3.79
	40	107	106	110	107.67 ± 2.08
	60	109	108	109	108.67 ± 0.58
CL1	1	108	115	111	111.33 ± 3.51
	20	112	115	113	113.33 ± 1.53
	40	110	111	110	110.33 ± 0.58
	60	107	114	113	111.33 ± 3.79
C2	1	76	75	77	76.00 ± 1.00
	20	74	75	71	73.33 ± 2.08
	40	75	75	76	73.33 ± 0.58
	60	76	77	75	76.00 ± 1.00
CL2	1	62	66	62	63.33 ± 2.31
	20	63	66	65	64.67 ± 1.53
	40	69	68	62	66.33 ± 3.79
	60	63	63	64	63.33 ± 0.58
C3	1	91	90	93	91.33 ± 1.53
	20	90	92	91	91.00 ± 1.00
	40	91	89	90	90.00 ± 1.00
	60	88	89	90	89.00 ± 1.00
CL3	1	108	109	109	108.67 ± 0.58
	20	106	105	104	105.00 ± 1.00
	40	71	72	69	70.67 ± 1.53
	60	8	9	8	8.33 ± 0.58

จากรูป 22 และตารางที่ 7 แสดงมุมของหยดน้ำที่อยู่บนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน โดยทำการถ่ายภาพทันทีที่หยดน้ำสัมผัสกับแผ่นเส้นใย มุมสัมผัสกับหยดน้ำของพอลิเมอร์ C1, CL1, C2, CL2, C3 และ CL3 มีค่าเฉลี่ยที่ 60 วินาทีที่มีค่าเท่ากับ 108.67, 111.33, 76.00, 63.33, 89.00 และ 8.33 องศา ตามลำดับ

4.7 ศึกษาการปลดปล่อยของ NGFs

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณ NGFs ที่บรรจุบนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน C1, C2 และ C3

ตัวอย่าง	% content
CL1	47.23 ± 4.71
CL2	57.72 ± 0.51
CL3	72.02 ± 0.83



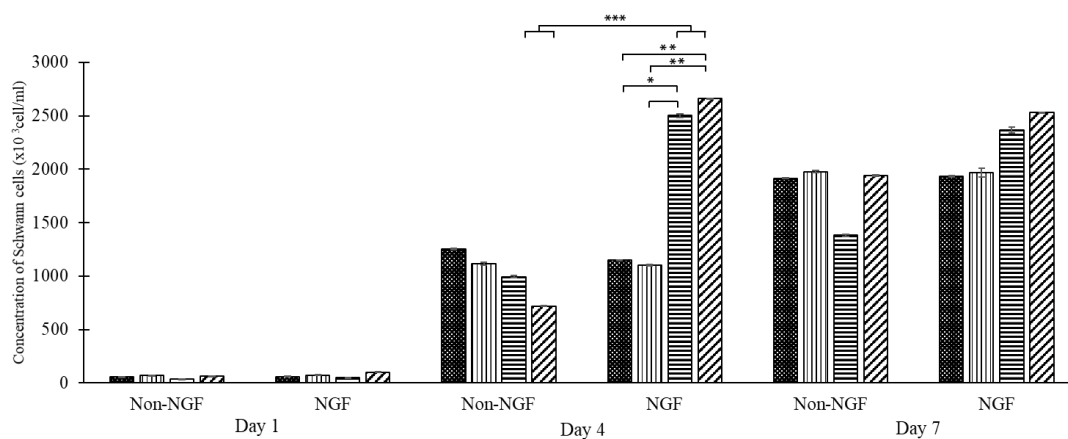
รูปที่ 25 การปลดปล่อยโปรตีนจากเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินในช่วงเวลาต่าง ๆ

(◆ CL1, ▲ CL2, ■ CL3)

ตารางที่ 8 การปลดปล่อย NGFs จากโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ในช่วงเวลาต่าง ๆ

ตัวอย่าง	Curve fitting constant (R ²)			
	Zero order	First order	Higuchi	Peppas (n)
CL1	0.8121	0.4199	0.9593	0.9524 (0.3358)
CL2	0.9042	0.4714	0.9852	0.9387 (0.3345)
CL3	0.9100	0.5156	0.9940	0.9804 (0.4184)

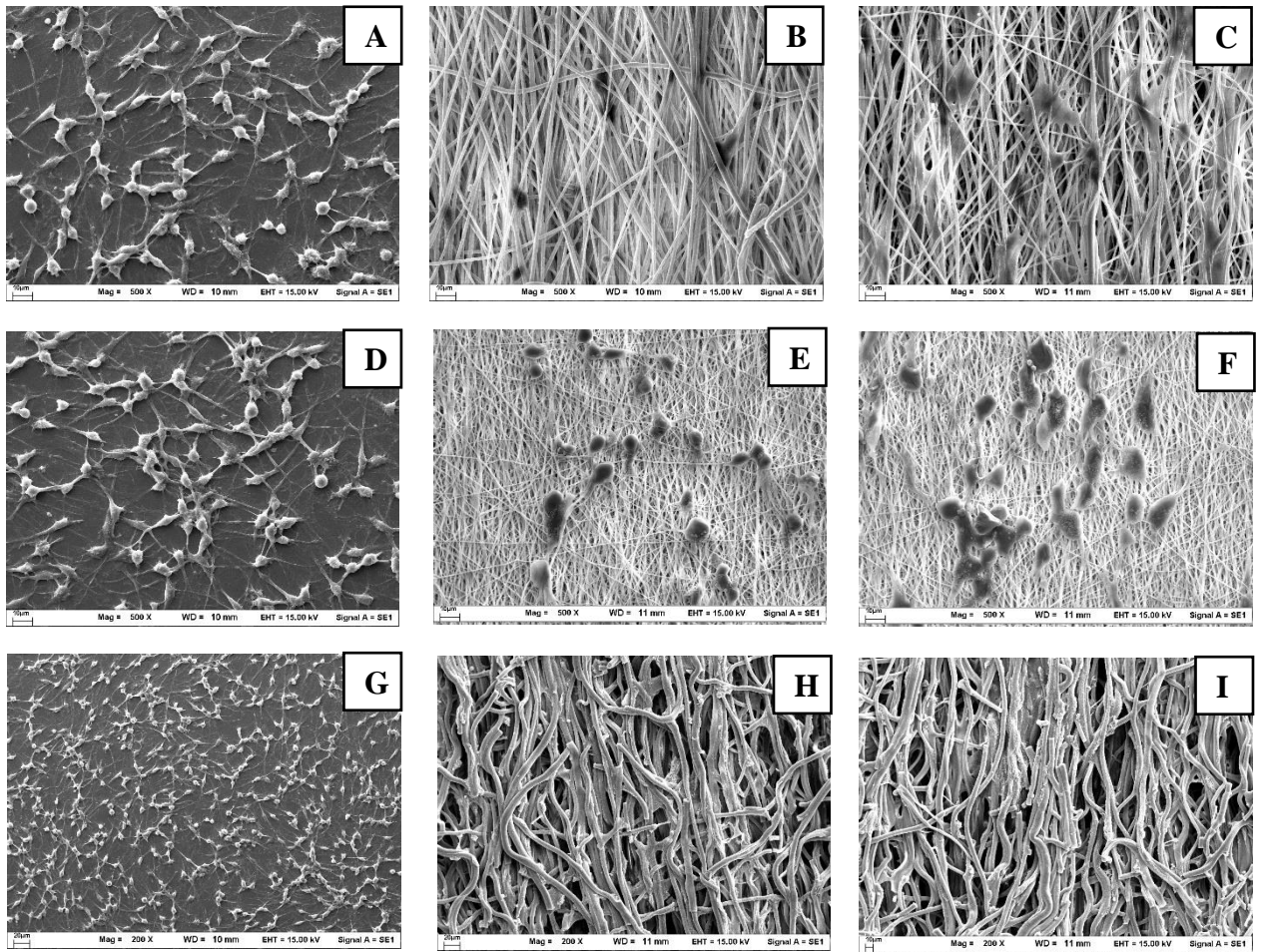
4.8 วิเคราะห์ปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ด้วยวิธี Alamar Blue assay



รูปที่ 26 ความเข้มข้นของเซลล์ชวานน์ที่เวลาต่าง ๆ

(control, C1, C2, C3)

จากรูปที่ 26 แสดงปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ เมื่อเปรียบเทียบ CL2 และ CL3 ในวันที่ 4 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์มากกว่า C2 และ C3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (***) และเมื่อเปรียบเทียบ C2 และ C3 ในวันที่ 4 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์มากกว่า C1 และ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*) (**)



รูปที่ 27 ภาพถ่าย SEM ของเซลล์ชวานน์ (A,D) กำลังขยาย 500 เท่า (G) กำลังขยาย 200 เท่า เซลล์ชวานน์บนแผ่นเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน C1 (B), CL1 (C), C2 (E), CL2 (F) กำลังขยาย 500 เท่า C3 (H) CL3 (I) กำลังขยาย 200 เท่า

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 การออกแบบการทดลอง

จากรูปที่ 11 (A) Normal probability plot แสดงถึงการเรียงตัวของข้อมูลที่ไม่เป็นแบบ normal distribution (91) และ (B) กราฟระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางจากการทำนายกับเส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้ในทางปฏิบัติ แสดงถึงความเหมาะสมของการออกแบบการทดลองจากสมการทำนายเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน เพื่อดูว่าผลของเส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้จริงมีความเบี่ยงเบนไปจากเส้นผ่านศูนย์กลางที่สมการทำนายไปมากน้อยเพียงใด ซึ่งสามารถสังเกตได้จากเส้นมาตรฐาน จะเห็นได้ว่าข้อมูลมีการกระจายตัวจากเส้นมาตรฐานมากซึ่งบ่งบอกว่าสมการทำนายเส้นผ่านศูนย์กลางนั้นมีความสามารถในการทำนายที่ต่ำ

จากรูปที่ 11 Perturbation plot ของเส้นใย PMMA และ Eudragit RL100 ที่ผสมในอัตราส่วนต่างๆ ทำให้ทราบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดของเส้นใยนั้นขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง PMMA และ Eudragit RL100 และรูปที่ 11 Response surface และ Contour plot แสดงให้เห็นถึง กราฟ (A) และ (a) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Eudragit RL100 และความเข้มข้นของ PMMA ที่มีผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง จากกราฟแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่มีผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด คือ ความเข้มข้นของ Eudragit RL100 ต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ 40% จึงจะได้เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วงที่น้อยกว่า 4500 nm ในกรณีที่เพิ่มความเข้มข้นของ Eudragit RL100 ให้มากกว่าหรือน้อยกว่าในช่วงนี้จะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดใหญ่ขึ้น กราฟ (B) และ (b) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ratio และ conc PMMA ที่มีผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง จากกราฟแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ที่ส่งผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางคือ conc PMMA และ ratio ซึ่งความเข้มข้นที่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 3500 nm ต้องให้ความเข้มข้นอยู่ที่ 13.0 และ ratio ที่ 0.4 จึงจะมีความเหมาะสม กราฟ (C) และ (c) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ratio และ conc Eudragit RL100 ที่มีผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง จากความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นต้องใช้ Eudragit RL100 ความเข้มข้น 40% และ ratio ที่ 0.3 แต่ในทางปฏิบัติเมื่อนำทั้งสองมาผสมกันทำให้เกิดการแยกชั้นขึ้น จึงจำเป็นที่

ต้องปรับ ratio เป็น 0.4 เพื่อให้ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แต่สิ่งที่ตามมาคือทำให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดใหญ่ขึ้น

จากรูปที่ 12 แสดงการทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่จะได้เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ 3,500 นาโนเมตร ซึ่งจากสมการทำนายเส้นผ่านศูนย์กลาง หากต้องการขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3,500 นาโนเมตรจะต้องใช้ PMMA ความเข้มข้น 13%w/v และ Eudragit RL100 ความเข้มข้น 40 %w/v และอัตราส่วนระหว่าง Eudragit RL100 กับ PMMA เท่ากับ 40 ต่อ 60 นำมาผสมกันเพื่อให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ต้องการ

5.2 ศึกษาสมบัติและลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1, C2 และ C3

5.2.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1, C2 และ C3

จากตารางที่ 5 แสดงภาพถ่ายลักษณะทางกายภาพของแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1 พบลักษณะของเส้นใยสีขาว ฟู เรียงกันเป็นชั้น แผ่นเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C2 มีลักษณะเส้นใยสีขาว โครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C3 พบลักษณะแผ่นเส้นใยสีขาว เรียงกันเป็นแนวเดียวกันชัดเจน ซึ่งการนำ C1 มาผสมกับ C2 จะช่วยเพิ่มขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ C2

จากภาพถ่าย SEM กำลังขยาย 1,000 เท่า และ 500 เท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1 และ C2 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยคือ $1,223.86 \pm 256.19$ และ 373.52 ± 50.52 นาโนเมตร การจัดเรียงตัวของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1 และ C2 มีการจัดเรียงตัวของเส้นใยแบบทางเดียว องค์การการจัดเรียงตัวส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 90-110 องศา แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีการกระจายขององค์การการจัดเรียงตัวในองศาอื่นๆ โดย C2 มีการกระจายขององค์การการจัดเรียงตัวมากกว่า C1 จากภาพถ่าย SEM กำลังขยาย 500 เท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย คือ $4,361.49 \pm 1,072.99$ นาโนเมตร มีการจัดเรียงตัวของเส้นใยแบบทางเดียว องค์การการจัดเรียงตัวส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 90-100 องศา และมีการกระจายขององค์การการจัดเรียงตัวในองศาอื่น ๆ เพียงเล็กน้อยเมื่อนำทั้งสองพอลิเมอร์มาผสมกัน จะได้เส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีการจัดเรียงตัวในทางเดียวเพิ่มขึ้นอย่างมาก

5.3 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่บรรจุโปรตีน Nerve Growth Factors (NGFs)

จากรูปที่ 17 ภาพถ่าย SEM กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ CL1 และ CL2 มีลักษณะขรุขระเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่ไม่ได้บรรจุ NGFs และมีการจัดเรียงตัวของเส้นใยที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเล็กน้อย ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ CL1 และ CL2 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย คือ 1878.07 ± 588.97 และ 785 ± 155.78 นาโนเมตร ตามลำดับ มีการเรียงตัวของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ในทางเดียวแต่น้อยกว่า C1 และ C2 โดยมีองศาการจัดเรียงส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 90-110 องศา แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีการกระจายขององศาการจัดเรียงตัวในองศาอื่น ๆ จากภาพถ่าย SEM กำลังขยาย 200 เท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ CL3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย คือ $5,835.55 \pm 1,113.33$ นาโนเมตร มีการจัดเรียงตัวของโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่แตกต่างไปจาก C3 คือมีการจัดเรียงในทางเดียวน้อยลงโดยมีองศาการจัดเรียงตัวอยู่ในช่วง 70-130 องศา ซึ่งมีค่ากระจายกว่า C3 ที่มีองศาการจัดเรียงตัวอยู่ในช่วง 90-100 องศา ซึ่งเกิดจากการมีโปรตีนมาเกาะบนโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทำให้การจัดเรียงตัวเปลี่ยนไป

5.4 ศึกษาหมู่โครงสร้างของผงและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเครื่อง FTIR

จากรูปที่ 18 19 20 เป็นการศึกษาหมู่โครงสร้างของผงและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ ด้วยเครื่อง FTIR โดยตัดแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนให้มีขนาด 5 cm x 5 cm แล้วนำไปเข้าเครื่อง FTIR Spectrometer จากนั้นนำกราฟที่ได้มาแปรผลเพื่อศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปจากการรวมกันของสารที่อยู่ในรูปแบบต่างๆ โดยนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับระหว่าง C1, C2 และ C3 โดยพอลิเมอร์จะอยู่ในรูปแบบของแผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ แผ่นโครงร่างเส้นใยนาโนที่ทำการบรรจุโปรตีนลงไป, และพอลิเมอร์ที่อยู่ในรูปแบบผง

กราฟการเปรียบเทียบโครงสร้างของผง C1 เส้นใย CL1 และเส้นใย C1 พบว่า สเปกตรัมของ C1 มี C=O stretching ที่เลขคลื่น 1723 cm^{-1} C-O stretching ที่ 1139 cm^{-1} แต่ที่ความยาวคลื่นในส่วน of transmittance ของผง C1 จะมีค่ามากกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่น เนื่องจากมีการสั่นสะเทือนของโมเลกุลที่เกิดขึ้นน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเส้นใย C1 และเส้นใย CL1 ซึ่งจากกราฟแสดงผลได้ว่า เส้นใย CL1 จะทำให้ transmittance มีค่าต่ำที่สุด

การเปรียบเทียบโครงสร้างของผง C2 เส้นใย CL2 และเส้นใย C2 มี C=O stretching ที่เลขคลื่น 1720 cm^{-1} และ C-H stretching ที่ เลขคลื่น 2945 cm^{-1} สเปกตรัมของเส้นใย CL2 และเส้นใย C2 C=O stretching ที่เลขคลื่น 1731 cm^{-1} และ C-H stretching ที่เลขคลื่น 2995 cm^{-1} นอกจากนี้ยังพบ C-N stretching ที่เลขคลื่น 1144 cm^{-1}

กราฟการเปรียบเทียบโครงสร้างของผง C3 Physical mixtures เส้นใย CL3 และเส้นใย C3 มี C-H stretching ที่เลขคลื่น 2948 cm^{-1} และ C=O stretching ที่เลขคลื่น 1720 cm^{-1} และ C-N stretching ที่เลขคลื่น 1144 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่า C3 เกิดจากการผสมของ C1 และ C2 เมื่อดูจากกราฟที่ได้จะแสดงให้เห็นว่า peak ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการผสมของ peak ของ C1 และ C2

จากกราฟทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการผสม NGFs ลงไปนั้นทำให้เกิด peak ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเล็กน้อยซึ่งเกิดจากการที่ผสม NGFs ในปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากซึ่งความสามารถในการตรวจจับของ FTIR อาจไม่เพียงพอ

5.5 ผลการทดสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของเส้นใยด้วยเครื่อง Powder X-Ray Diffraction (PXRD)

จากรูปที่ 21 22 23 เป็นการศึกษาสมบัติความเป็นผลึกของแผ่นโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์สปันด้วยเครื่อง powder X-ray diffractometer (PXRD) โดยการนำแผ่นโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์สปันตัดให้มีขนาด 5 cm x 5 cm แล้วนำไปวางไว้ที่ sample holder แล้วนำเข้าเครื่อง PXRD โดย setting ที่ 4 theta /1min initial และ 5 theta to 45 theta เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C1 CL1 และเส้นใย C1 ลักษณะกราฟที่ได้ทั้งหมดมี peak ที่สั้นแคบซึ่งเป็นลักษณะเด่นของผลึกที่อยู่ในรูปของแข็งอสัณฐาน (amorphous form) และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C2 เส้นใย CL2 และเส้นใย C2 ก็พบว่าลักษณะ peak ของ C2 ในรูปแบบผงมีลักษณะที่เป็นเส้นโค้งซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ C2 ค่า 2 theta ที่ 14 (92) และเมื่อทำการนำเส้นใย CL2 และเส้นใย C2 พบว่า peak ที่ได้นั้นมีลักษณะที่ราบเรียบแตกต่างจากรูปแบบผง C2 ซึ่งแสดงให้เห็นสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไป แต่ถึงอย่างไรก็ตามทั้ง 3 รูปแบบก็ยังเป็นรูปของแข็งอสัณฐาน (amorphous form) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C3 (physical mixtures), เส้นใย CL3 และเส้นใย C3 ผลที่ได้คือ ผง C3 มีลักษณะที่เป็นเส้นโค้งซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ C2 ค่า 2 theta ที่ 14 เช่นกัน แต่ลักษณะที่เพิ่มเติมขึ้นมาคือช่วง 35-30 ของ 2 theta peak จะไม่ลักษณะราบเรียบซึ่งเกิดจากการผสม C1 ในรูปแบบผง ทำให้ peak ที่ได้เป็นลักษณะดังกล่าว เส้นใย CL3 และเส้นใย C3 นั้นมีลักษณะที่ราบเรียบไม่มี peak เกิดขึ้น จากผลการทดสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของเส้นใยด้วยเครื่อง

powder X-Ray Diffraction (PXRD) จึงสรุปผลได้ว่าพอลิเมอร์ทุกรูปแบบมีการจัดเรียงโครงสร้างผลึก อยู่ในรูปแบบของแข็งอสัณฐาน (amorphous form)

5.6 ผลการวิเคราะห์ลักษณะการหยดตัวของของเหลวด้วยเครื่อง Drop shape analyzer

จากรูปที่ 24 และตารางที่ 6 เป็นการแสดงมุมของหยดน้ำที่ทำกับแผ่นเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โปรสปีนเป็นเวลา 1 นาที ซึ่งในกรณีมีมุมสัมผัสมีค่าน้อยกว่า 90 องศาแสดงถึงความชอบน้ำ (Hydrophilicity) และกรณีมีมุมสัมผัสมีค่ามากกว่า 90 องศาแสดงถึงพอลิเมอร์มีความชอบน้ำน้อย ซึ่งจากการทดลองพบว่า CL3 มีความชอบน้ำมากที่สุดและ CL1 มีความชอบน้ำน้อยที่สุด โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป CL3 มีขนาดมุมลดลงอย่างชัดเจนแต่พอลิเมอร์ตัวอื่นเมื่อเวลาผ่านไปขนาดมุมมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก

5.7 ศึกษาการปลดปล่อยของ NGFs

การทดสอบการปลดปล่อยของ NGFs จากโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โปรสปีนที่บรรจุโปรตีน CL1, CL2 และ CL3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.085, 0.25, 0.5, 1, 5, 7 และ 14 วัน ในสารละลาย PBS ที่ pH 7.4 จากตารางที่ 8 ปริมาณโปรตีนที่บรรจุลงพอลิเมอร์เท่ากับ 47.23, 57.72 และ 72.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากตารางที่ 9 ทั้งสามตัวอย่างช่วงแรกมีการปลดปล่อยแบบอย่างรวดเร็ว (burst release) จลศาสตร์การปลดปล่อยของ CL1, CL2 และ CL3 เมื่อพิจารณาจากค่า R^2 ใกล้เคียงกับแบบจำลอง Higuchi โดยมีค่าเท่ากับ 0.9593, 0.9852 และ 0.9940 ตามลำดับ CL1 เกิดการพองตัวและกร่อนของพอลิเมอร์ เนื่องจากหมู่ ester ของ PMMA เมื่อเวลาผ่านไปจะทำปฏิกิริยา hydrolysis กับโมเลกุลน้ำในสารละลาย PBS (93) รวมกับการเขย่าจึงทำให้ NGF ที่เกาะอยู่ระหว่างผิวของเส้นใย PMMA ปลดปล่อยออกมา ในทางเดียวกัน CL2 มีการดึงน้ำเข้าพองตัวเป็นขั้นเจลดร่วมกับการกร่อน แต่เนื่องจากสมบัติความชอบน้ำทำให้มีระยะทางการแพร่ (diffusion path length) สูงขึ้นจึงมีการปลดปล่อยช้ากว่า PMMA เมื่อเวลาผ่านไป (94)

5.8 วิเคราะห์ปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ด้วยวิธี Alamar Blue assay

การศึกษากการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์บนโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โปรสปีน C1, CL1, C2, CL2, C3 และ CL3 โดยมีกระจกและกระจกที่บรรจุโปรตีนเป็นกลุ่มควบคุม เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงยึดเกาะอยู่บนกลุ่มควบคุมและโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โปรสปีนทุกกลุ่มและมีการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาผ่านไป โดยวันที่ 4 โครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โปรสปีน CL2 และ CL3 มีความเข้มข้นของเซลล์สูงที่สุด และมีความเข้มข้นของเซลล์สูงกว่า C2, C3, CL1 และกลุ่มควบคุมอย่างมี

นัยสำคัญ แต่ทั้งโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ CL2 และ CL3 เมื่อเทียบกัน พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ CL1 มีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดในวันที่ 7 แต่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บรรจุ NGFs และกลุ่มโครงสร้างเส้นใย C1 และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บรรจุ NGFs จากสมบัติความชอบน้ำของ Eudragit RL100 ที่เหมาะสมสำหรับเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ (14, 15) ทำให้ CL3 มีความชอบน้ำมากขึ้นและมีการเจริญเติบโตมากกว่า CL1 ที่มีสมบัติชอบน้ำน้อยรวมถึงการจัดเรียงตัวทางเดียว ละช่องว่างระหว่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทำให้เซลล์ชวานน์สามารถเกาะและเจริญเติบโตคล้ายกับเซลล์ประสาทมนุษย์ (13) นอกจากนี้การปลดปล่อย NGFs ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีสมบัติช่วยในเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ (56) จากกลุ่มโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่บรรจุ NGFs ทำให้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์มากขึ้น

จากรูปที่ 27 ภาพถ่าย SEM กำลังขยาย 200 และ 500 เท่า ของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ C1, CL1, C2, CL2, C3, CL3 และกลุ่มควบคุม โครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทั้งหมดและกลุ่มควบคุมมีการยึดเกาะของเซลล์ชวานน์บนเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ โดยโครงสร้างเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่บรรจุ NGFs พบการเกาะของเซลล์หนาแน่นกว่าโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ที่ไม่ได้บรรจุ NGFs

เอกสารอ้างอิง

1. Ding B, Wang X, Yu J. Electrospinning: Nanofabrication and applications: William Andrew; 2018.
2. Asmatulu R, Khan W. Historical background of the electrospinning process. *Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*. 2018:17-39.
3. Narayan R. *ENCYCLOPEDIA OF BIOMEDICAL ENGINEERING*. Wang M, Laurencin C, Yu X, editors: Oliver Walter; 2019. 578 p.
4. Zhang C, Li Y, Wang P, Zhang H. Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020.
5. Manuel CBJ, Jesús VGL, Aracely SM. Electrospinning for drug delivery systems: drug incorporation techniques. *Electrospinning-Material, Techniques, and Biomedical Applications*. 2016:14.
6. McClellan P, Landis WJ. Recent applications of coaxial and emulsion electrospinning methods in the field of tissue engineering. *BioResearch open access*. 2016;5(1):212-27.
7. Zhang C, Li Y, Wang P, Li J, Weiss J, Zhang H. Core-shell nanofibers electrospun from O/W emulsions stabilized by the mixed monolayer of gelatin-gum Arabic complexes. *Food Hydrocolloids*. 2020:105980.
8. Wu J, Wang N, Zhao Y, Jiang L. Electrospinning of multilevel structured functional micro-/nanofibers and their applications. *Journal of Materials Chemistry A*. 2013;1(25):7290-305.
9. Chiono V, Tonda-Turo C. Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. *Progress in neurobiology*. 2015;131:87-104.
10. Menorca R, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand clinics*. 2013;29(3):317-30.
11. MW K. . Growth Factors and Other Cellular Regulators 2020 [updated April 4, 2020. Available from: <https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php>.

12. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*. 2003;63(15):2223-53.
13. Xia H, Sun X, Liu D, Zhou Y, Zhong D. Oriented growth of rat Schwann cells on aligned electrospun poly (methyl methacrylate) nanofibers. *Journal of the neurological sciences*. 2016;369:88-95.
14. Shen X, Yu D, Zhu L, Branford-White C, White K, Chatterton NP. Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit® L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2011;408(1-2):200-7.
15. Marais E, Hamman J, Plessis LD, Lemmer R, Steenekamp J. Eudragit® L100/N-trimethylchitosan chloride microspheres for oral insulin delivery. *Molecules*. 2013;18(6):6734-47.
16. Pikiş S, Goldstein J, Spektor S. Potential neurotoxic effects of polymethylmethacrylate during cranioplasty. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2015;22(1):139-43.
17. Ngadiman NHA, Noordin M, Idris A, Kurniawan D. A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 2017;231(7):597-616.
18. Carter M, Shieh JC. *Guide to research techniques in neuroscience : Chapter 5 Microscopy*: Academic Press; 2015. 119-45 p.
19. Petit S, Madejova J. Fourier transform infrared spectroscopy. *Developments in Clay Science*. 5: Elsevier; 2013. p. 213-31.
20. Picraux ST. Nanotechnology []. *Encyclopædia Britannica, inc.*; 2018 [updated November 21, 2018. Available from: <https://www.britannica.com/technology/nanotechnology>].
21. Jain R, Shetty S, Yadav KS. Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020:101604.

22. Shahriar S, Mondal J, Hasan MN, Revuri V, Lee DY, Lee Y-K. Electrospinning nanofibers for therapeutics delivery. *Nanomaterials*. 2019;9(4):532.
23. Nikalje AP. Nanotechnology and its applications in medicine. *Med chem*. 2015;5(2):081-9.
24. Ko FK, Wan Y. *Introduction to nanofiber materials*: Cambridge University Press; 2014.
25. Boddula R, Ahamed MI, Asiri AM. *Electrospun Materials and Their Allied Applications*: John Wiley & Sons; 2020.
26. Sultana N, Hassan MI, Lim MM. *Composite synthetic scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*: Springer; 2015. 61 p.
27. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(13):1989-2006.
28. Long Y-Z, Yan X, Wang X-X, Zhang J, Yu M. *Electrospinning: The Setup and Procedure*. *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*: Elsevier; 2019. p. 21-52.
29. Nangare S, Jadhav N, Ghagare P, Muthane T, editors. *Pharmaceutical applications of electrospinning*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*; 2020: Elsevier.
30. Khanlou HM, Ang BC, Talebian S, Barzani MM, Silakhori M, Fauzi H. Multi-response analysis in the processing of poly (methyl methacrylate) nano-fibres membrane by electrospinning based on response surface methodology: fibre diameter and bead formation. *Measurement*. 2015;65:193-206.
31. Jannesari M, Varshosaz J, Morshed M, Zamani M. Composite poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:993.
32. Dorati R, Pisani S, Maffei G, Conti B, Modena T, Chiesa E, et al. Study on hydrophilicity and degradability of chitosan/poly(lactide-co-polycaprolactone) nanofibre blend electrospun membrane. *Carbohydrate polymers*. 2018;199:150-60.

33. Natthan C, Anshisa B, Napat K, Ry P, Thapakorn C, Praneet O. Electrospinning of polymethyl methacrylate for nerve tissue engineering 2019.
34. Zhang H, Liang J, Ding Y, Li P. The controlled release of growth factor via modified coaxial electrospun fibres with emulsion or hydrogel as the core. *Materials Letters*. 2016;181:119-22.
35. Torkamani AE, Syahariza ZA, Norziah MH, Wan AKM, Juliano P. Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from *Momordica charantia* fruit within zein/gelatin shell core fibers via coaxial electrospinning. *Food bioscience*. 2018;21:60-71.
36. Yuan H, Zhou Q, Zhang Y. Improving fiber alignment during electrospinning. *Electrospun Nanofibers: Elsevier*; 2017. p. 125-47.
37. Haider A, Haider S, Kang I-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*. 2018;11(8):1165-88.
38. Coelho DS, Veleirinho B, Alberti T, Maestri A, Yunes R, Dias PF, et al. *Electrospinning Technology: Designing Nanofibers toward Wound Healing Application. Nanomaterials-Toxicity, Human Health and Environment: IntechOpen*; 2018.
39. Wang C, Wang J, Zeng L, Qiao Z, Liu X, Liu H, et al. Fabrication of electrospun polymer nanofibers with diverse morphologies. *Molecules*. 2019;24(5):834.
40. *Developments in Surface Contamination and Cleaning : Methods for Assessing Surface Cleanliness*. Kohli R, Mittal KL, editors: Matthew Deans; 2019.
41. Mazzola L, Bemporad E, Carassiti F. An easy way to measure surface free energy by drop shape analysis. *Measurement*. 2012;45(3):317-24.
42. Saad SM, Neumann AW. Axisymmetric drop shape analysis (ADSA): An outline. *Advances in colloid and interface science*. 2016;238:62-87.
43. Patra CN, Priya R, Swain S, Jena GK, Panigrahi KC, Ghose D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;3(1):33-45.

44. Aisha AF, Abdulmajid AMS, Ismail Z, Alrokayan SA, Abu-Salah KM. Development of polymeric nanoparticles of Garcinia mangostana xanthenes in eudragit RL100/RS100 for anti-colon cancer drug delivery. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015.
45. PubChem. Methyl methacrylate National Center for Biotechnology Information [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-methacrylate>].
46. Ali U, Karim KJBA, Buang NA. A review of the properties and applications of poly (methyl methacrylate)(PMMA). *Polymer Reviews*. 2015;55(4):678-705.
47. Mohammad Khanlou H, Chin Ang B, Talebian S, Muhammad Afifi A, Andriyana A. Electrospinning of polymethyl methacrylate nanofibers: optimization of processing parameters using the Taguchi design of experiments. *Textile Research Journal*. 2015;85(4):356-68.
48. Matbouei A, Fathi A, Rabiee SM, Shirzad M. Layered manufacturing of a three-dimensional polymethyl methacrylate (PMMA) scaffold used for bone regeneration. *Materials Technology*. 2019;34(3):167-77.
49. Chang H-Y, Chang C-C, Cheng L-P, editors. Preparation of hydrophobic nanofibers by electrospinning of PMMA dissolved in 2-propanol and water. *MATEC Web of Conferences*; 2019: EDP Sciences.
50. Balen R, da Costa WV, de Lara Andrade J, Piai JF, Muniz EC, Companhoni MV, et al. Structural, thermal, optical properties and cytotoxicity of PMMA/ZnO fibers and films: Potential application in tissue engineering. *Applied Surface Science*. 2016;385:257-67.
51. Parashar P, Ramrakhiani M, Datt S. Mechanical strength of blends of Eudragit RL 100 and poly (methyl methacrylate). *Polymer testing*. 1999;18(7):495-500.
52. Nyangasi L, Andala D, Onindo C, Wanyonyi A, Chepngetich J. Processing parameters for electrospinning poly (methyl methacrylate)(PMMA)/titanium isopropoxide composite in a pump-free setup. *AAS Open Research*. 2018;1(27):27.

53. Cohen S. Origins of growth factors: NGF and EGF. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(49):33793-7.
54. King MW. Growth Factors and Other Cellular Regulators 2020 [updated April 4, 2020. Available from: <https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php>.
55. Bothwell M. Ngf, bdnf, nt3, and nt4. *Neurotrophic factors*: Springer; 2014. p. 3-15.
56. Dinis TM, Vidal G, Jose RR, Vigneron P, Bresson D, Fitzpatrick V, et al. Complementary effects of two growth factors in multifunctionalized silk nanofibers for nerve reconstruction. *PLoS One*. 2014;9(10).
57. Martín-Estal I, De La Garza R, Castilla-Cortazar I. Intrauterine growth retardation (IUGR) as a novel condition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol 170*: Springer; 2016. p. 1-35.
58. O'Dell SD, Day IN. Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II). *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30(7):767-71.
59. Brahmkhatri VP, Prasanna C, Atreya HS. Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. *BioMed research international*. 2015;2015.
60. Keelapang P. Insulin like growth factor-I in clinical. *Chula Med* 1994;38(12):787-804.
61. Ratajczak MZ, Kucia M, Liu R, Shin D-M, Bryndza E, Masternak MM, et al. RasGrf1: genomic imprinting, VSEs, and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(7):692.
62. Chagastelles PC, Nardi NB. Biology of stem cells: an overview. *Kidney international supplements*. 2011;1(3):63-7.
63. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1-22.
64. STEM CELLS University of Nebraska Medical Center2020 [Available from: <https://www.unmc.edu/stemcells/educational-resources/importance.html>.
65. Murnaghan I. History of Stem Cell Research 2020 [updated Jan 23,2020. Available from: <http://www.explorestemcells.co.uk/historystemcellresearch.html>.

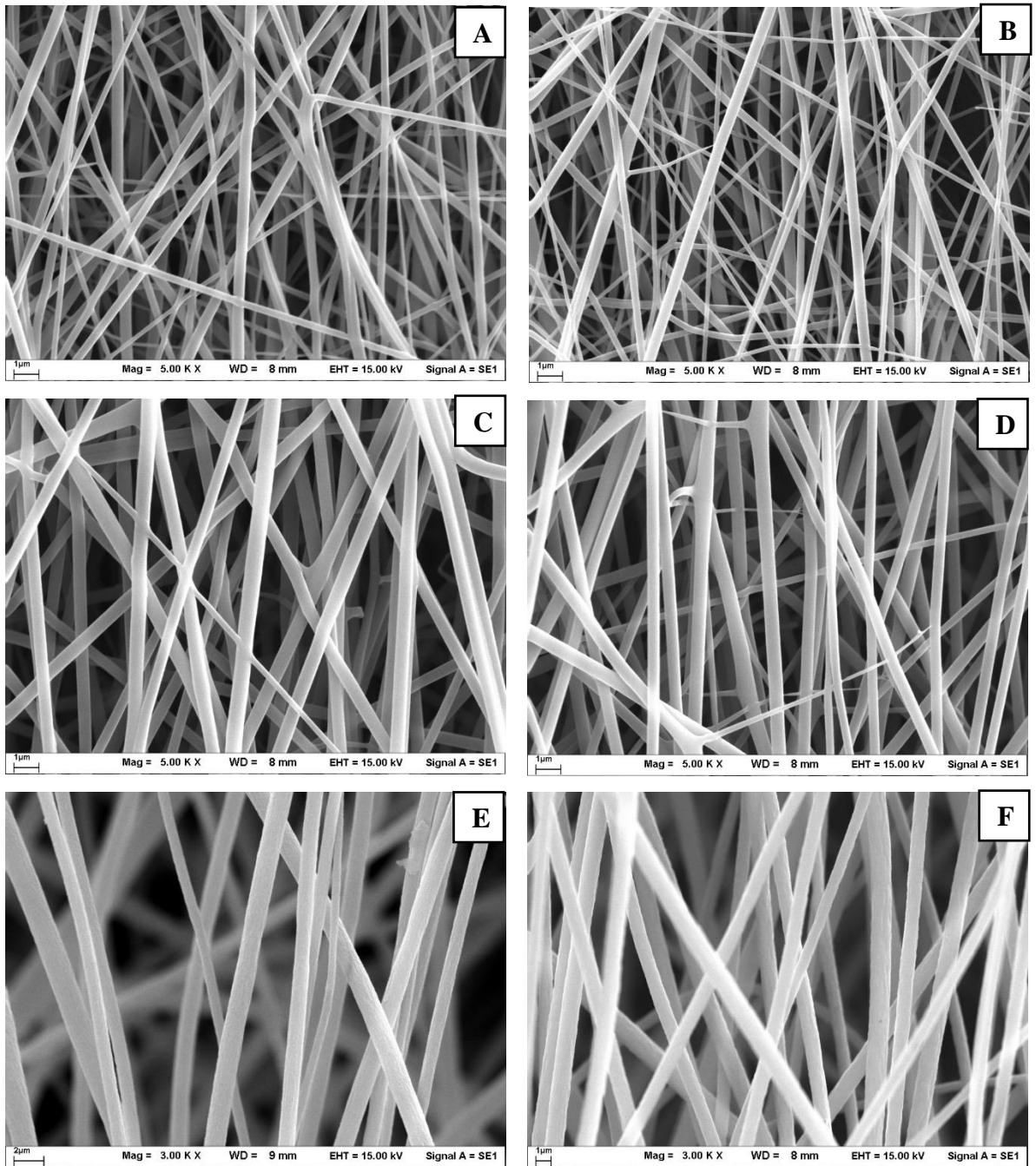
66. Hill M. Neural Crest - Schwann Cell Development 2020 [Available from: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Neural_Crest_-_Schwann_Cell_Development].
67. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Current biology : CB*. 2016;26(20):R971-r5.
68. Lotfi L, Khakbiz M, Moosazadeh Moghaddam M, Bonakdar S. A biomaterials approach to Schwann cell development in neural tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2019;107(11):2425-46.
69. Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2010;15(2):93-103.
70. Cerqueira SR, Lee Y-S, Cornelison RC, Mertz MW, Wachs RA, Schmidt CE, et al. Decellularized peripheral nerve supports Schwann cell transplants and axon growth following spinal cord injury. *Biomaterials*. 2018;177:176-85.
71. Robinson E. Discovery could lead to new therapies for nervous system disorders 2019 [Available from: <https://news.ohsu.edu/2019/07/05/discovery-could-lead-to-new-therapies-for-nervous-system-disorders>].
72. Bayat Z, Hassanshahian M, Cappello S. Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. *The open microbiology journal*. 2015;9:48.
73. Krasňan V, Stloukal R, Rosenberg M, Rebroš M. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016;100(6):2535-53.
74. Ahmad M. Immobilization method review. 2015.
75. Betancor L, López-Gallego F, Noelia Alonso-Morales, Dellamora G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, et al. Immobilization of Enzymes and Cells :Glutaraldehyde in Protein Immobilization. 2 ed: Springer; 2006. 449 p.
76. Nguyen HH, Kim M. An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*. 2017;26(6):157-63.

77. Ovsejevi K, Manta C, Batista-Viera F. Reversible covalent immobilization of enzymes via disulfide bonds. *Immobilization of Enzymes and Cells*: Springer; 2013. p. 89-116.
78. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*. 2016;77(7):C98-C101.
79. Sanen K, Martens W, Georgiou M, Ameloot M, Lambrechts I, Phillips J. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;11(12):3362-72.
80. ATCC. S16Y (ATCC® CRL-2943™) 2020 [Available from: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2943.aspx#culturemethod><https://www.atcc.org/products/all/CRL-2943.aspx#culturemethod>].
81. Back SA, Khan R, Gan X, Rosenberg PA, Volpe JJ. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *Journal of neuroscience methods*. 1999;91(1-2):47-54.
82. Tanaka TQ, Williamson KC. A malaria gametocytocidal assay using oxidoreduction indicator, alamarBlue. *Molecular and biochemical parasitology*. 2011;177(2):160-3.
83. Royer CA. Approaches to teaching fluorescence spectroscopy. *Biophysical journal*. 1995;68(3):1191.
84. Croney JC, Jameson DM, Learmonth RP. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2001;29(2):60-5.
85. Sethuramiah A, Kumar R. *Statistics and Experimental Design in Perspective*. sn; 2016. p. 129-59.
86. Yamauchi A, Tanimoto J, Hagishima A. An analysis of network reciprocity in Prisoner's Dilemma games using Full Factorial Designs of Experiment. *BioSystems*. 2011;103(1):85-92.

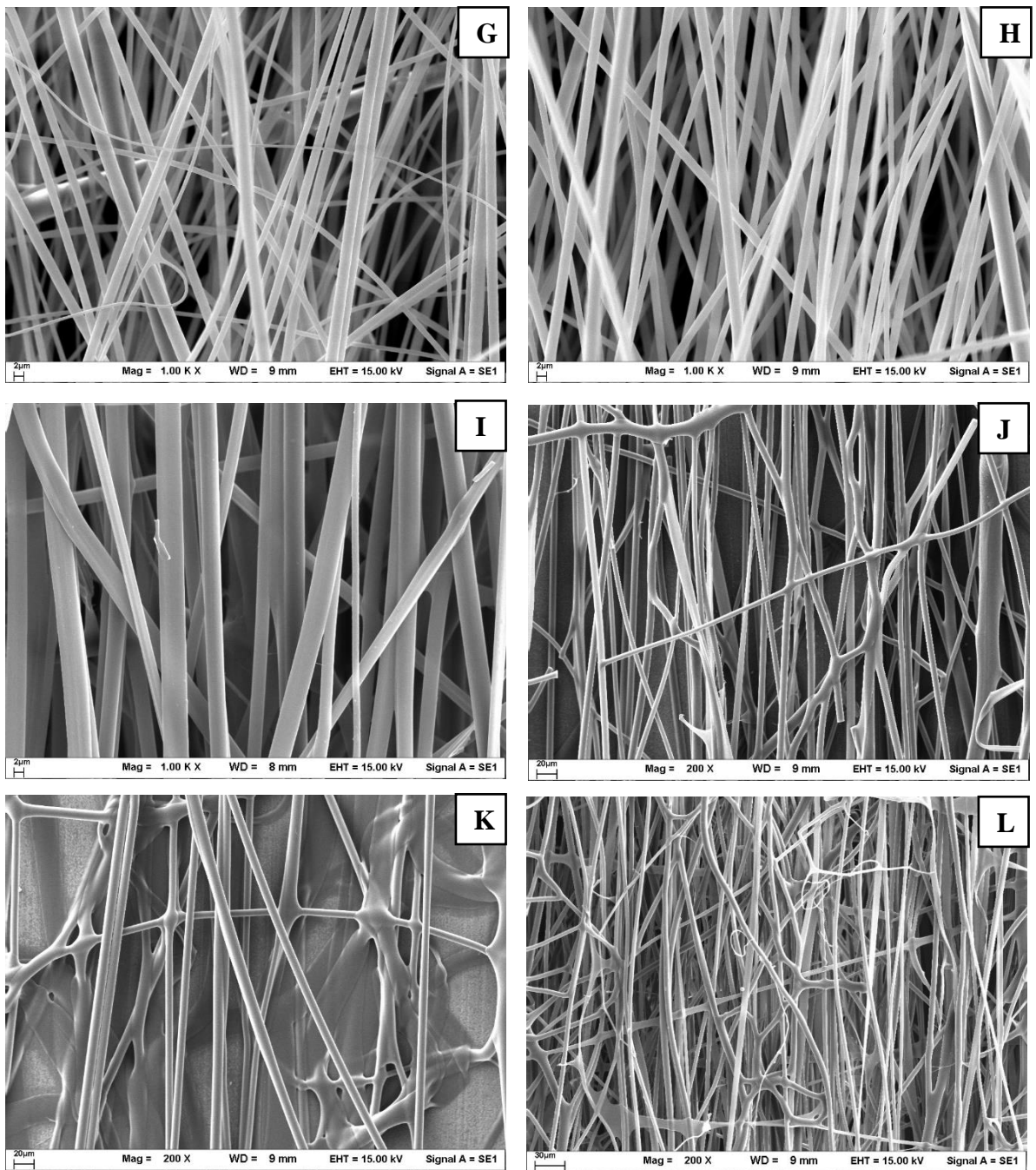
87. Gunst RF, Mason RL. Fractional factorial design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 2009;1(2):234-44.
88. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 2010;2(2):128-49.
89. Ferreira SC, Bruns R, Ferreira H, Matos G, David J, Brandao G, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*. 2007;597(2):179-86.
90. Yamada S, Matsui M, Matsui T, Lin DK, Takahashi T. A general construction method for mixed-level supersaturated design. *Computational statistics & data analysis*. 2006;50(1):254-65.
91. Ghelich R, Jahannama MR, Abdizadeh H, Torknik FS, Vaezi MR. Central composite design (CCD)-Response surface methodology (RSM) of effective electrospinning parameters on PVP-B-Hf hybrid nanofibrous composites for synthesis of HfB₂-based composite nanofibers. *Composites Part B: Engineering*. 2019;166:527-41.
92. Sukhbir S, Yashpal S, Sandeep A. Development and statistical optimization of nefopam hydrochloride loaded nanospheres for neuropathic pain using Box- Behnken design. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016;24(5):588-99.
93. N'Diaye M, Pascaretti-Grizon F, Massin P, Baslé MF, Chappard D. Water absorption of poly (methyl methacrylate) measured by vertical interference microscopy. *Langmuir*. 2012;28(31):11609-14.
94. Mathematical models of drug release. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*2015. p. 63-82.

ภาคผนวก

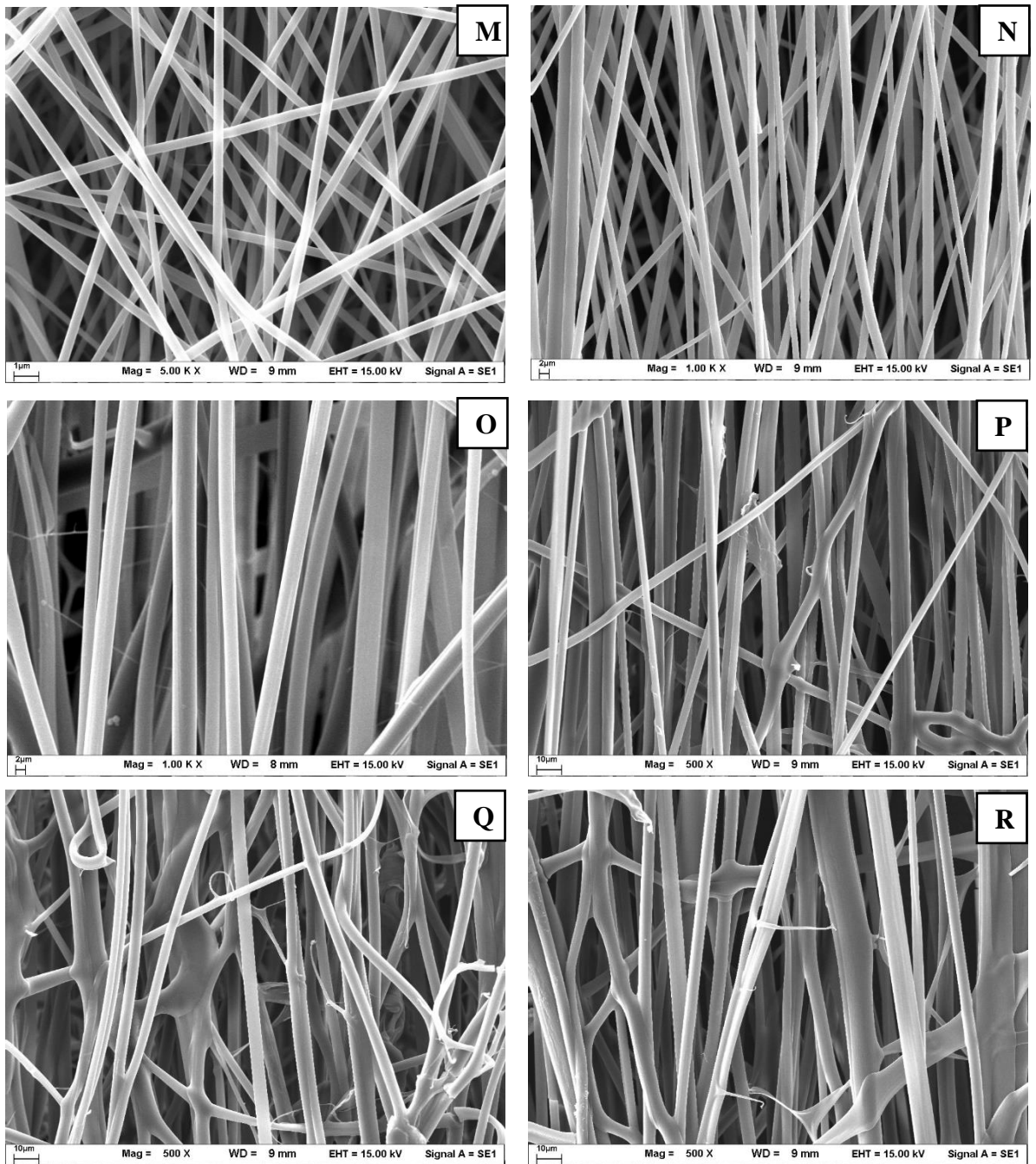
1. ลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์



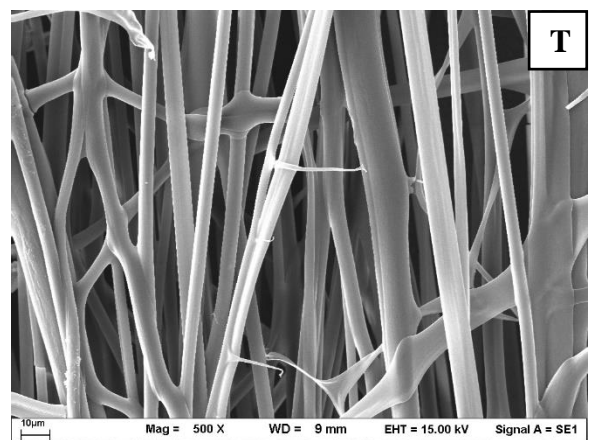
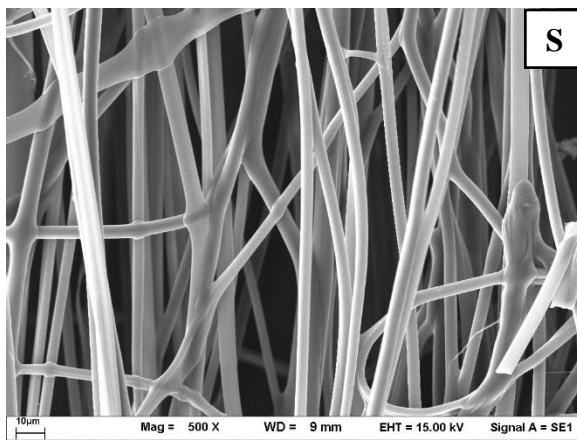
รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ของแต่ละสภาวะของการออกแบบการทดลอง : (A) สภาวะที่ 1 (B) สภาวะที่ 2 (C) สภาวะที่ 3 (D) สภาวะที่ 4 (E) สภาวะที่ 5 (F) สภาวะที่ 6



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปินของแต่ละสภาวะของการออกแบบการทดลอง : (G) สภาวะที่ 7 (H) สภาวะที่ 8 (I) สภาวะที่ 9 (J) สภาวะที่ 10 (K) สภาวะที่ 11 (L) สภาวะที่ 12

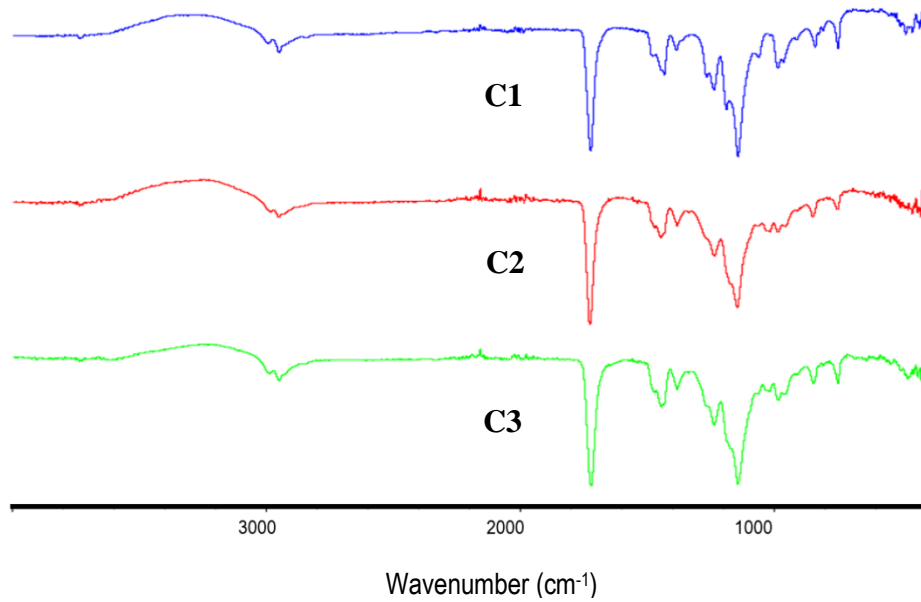


รูปที่ 3 แสดงลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ปั่นของแต่ละสภาวะของการออกแบบการทดลอง : (M) สภาวะที่ 13 (N) สภาวะที่ 14 (O) สภาวะที่ 15 (P) สภาวะที่ 16 (Q) สภาวะที่ 17 (R) สภาวะที่ 18

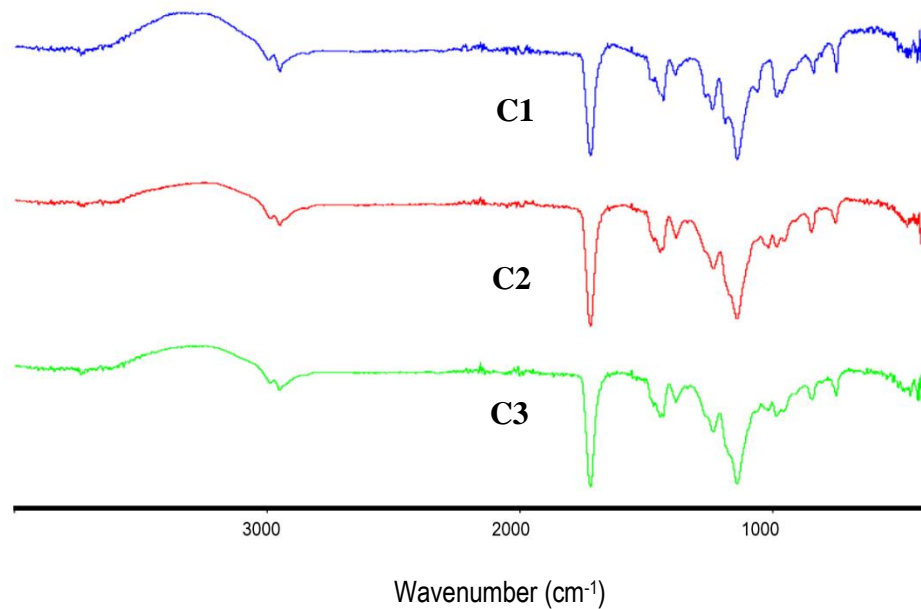


รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางกายภาพของเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ของแต่ละสภาวะของการออกแบบ
การทดลอง : (S) สภาวะที่ 19 (T) สภาวะที่ 20

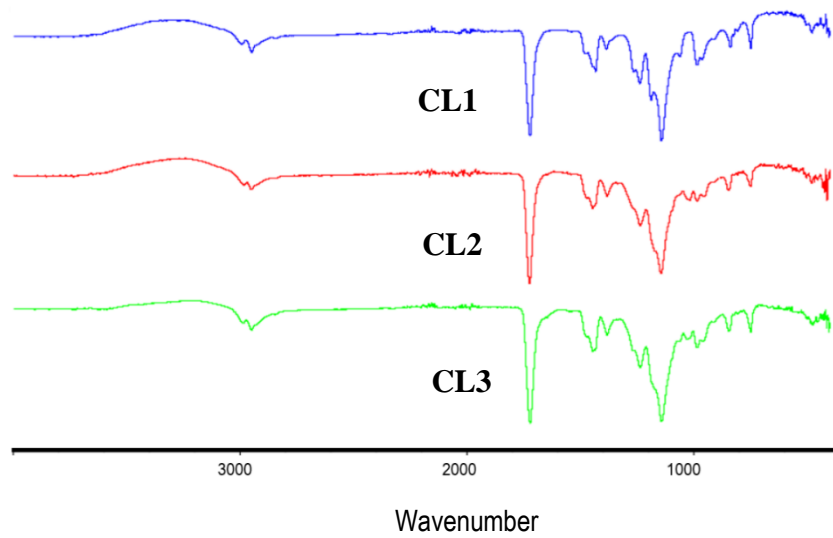
2. ศึกษาหมู่โครงสร้างของผงและเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ด้วยเครื่อง FTIR



รูปที่ 5 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างผง C1, C2 และ C3 (Physical mixtures)

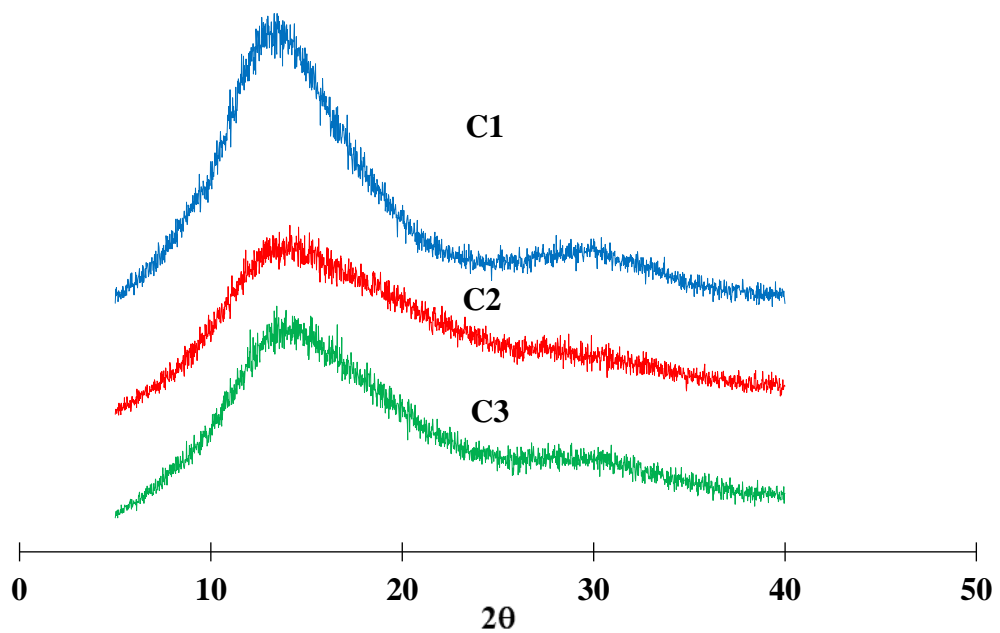


รูปที่ 6 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างเส้นใย C1, C2 และ C3

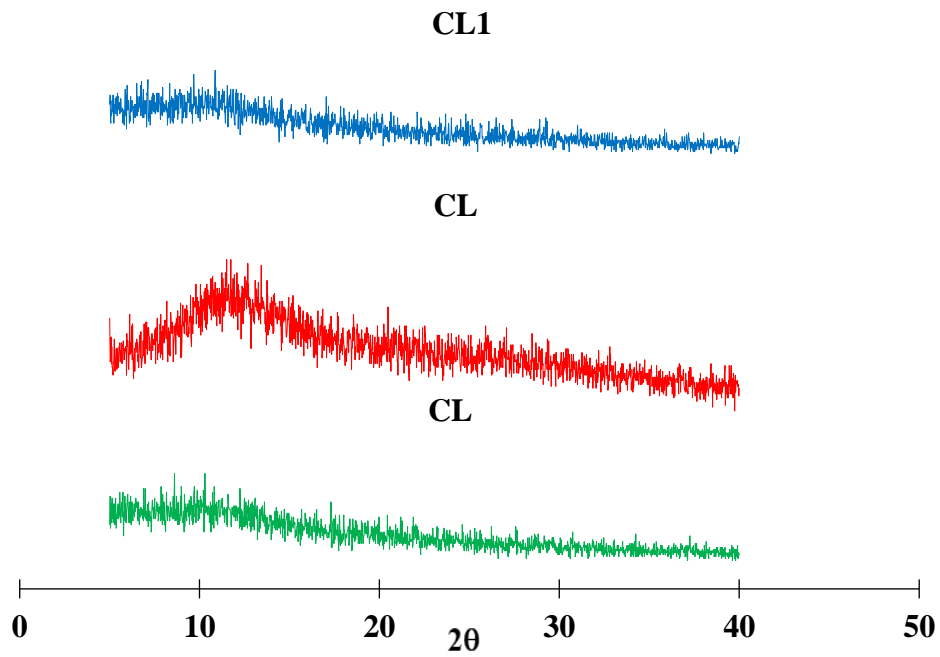


รูปที่ 7 กราฟเปรียบเทียบ FTIR spectrum ระหว่างเส้นใย CL1, CL2 และ CL3

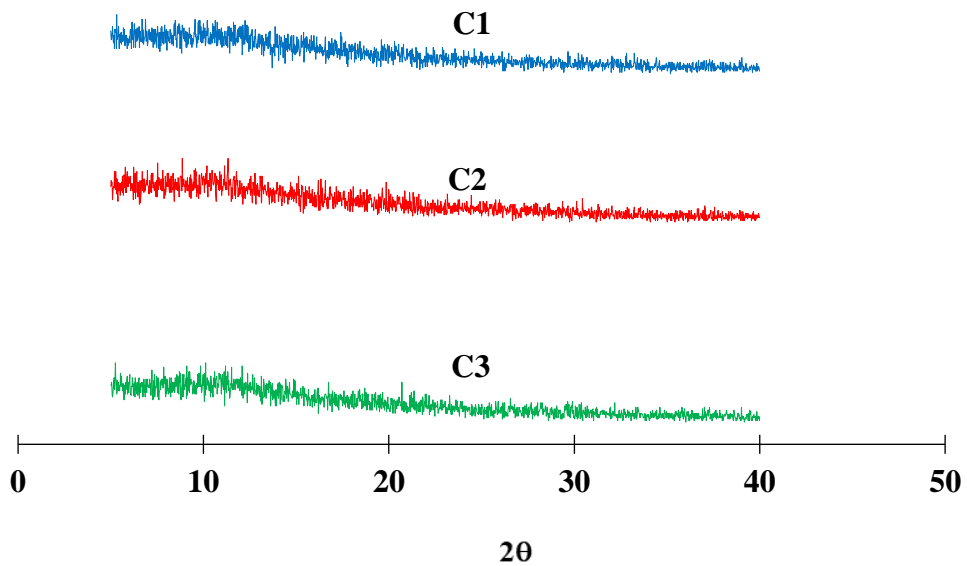
3. ผลการทดสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของเส้นใยด้วยเครื่อง Powder X-Ray Diffraction (PXRD)



รูปที่ 8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างผง C1, C2 และ C3 (Physical mixture)



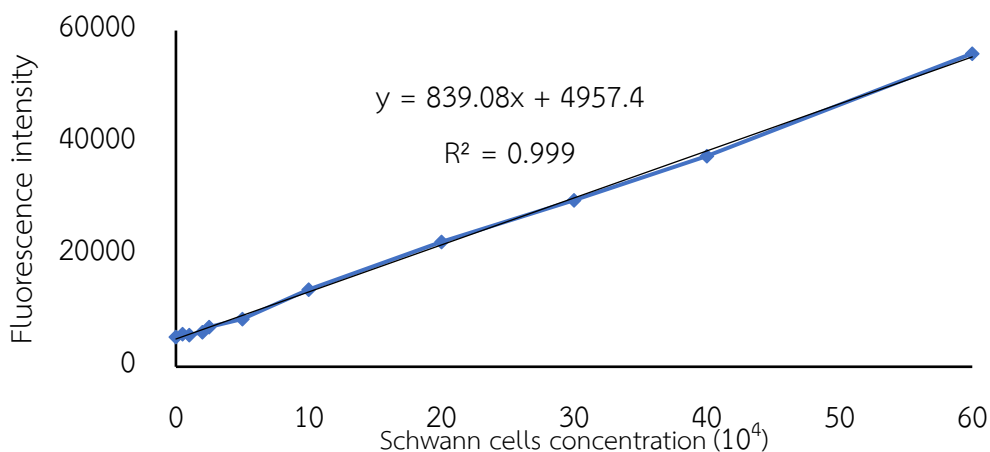
รูปที่ 9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึกระหว่างเส้นใย CL1, CL2 และ CL3



รูปที่ 10 กราฟแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโครงสร้างผลึก spectrum ระหว่างเส้นใย C1, C2 และ C3

4. วิเคราะห์ปริมาณการเจริญเติบโตของเซลล์ชวานน์ด้วยวิธี Alamar Blue assay

4.1 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้น ต่าง ๆ ของเซลล์ชวานน์



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของเซลล์

ตารางที่ 1 ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โพรพิลีนและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์โพรพิลีนที่บรรจุโปรตีน วันที่ 1

ตัวอย่าง	ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์			ค่าเฉลี่ย	ความเข้มข้นของเซลล์
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	10257.71	10258.32	9740.38	10085.47	61121.24
Control ที่บรรจุ NGFs	9644.958	10335.96	10345.98	10108.97	61401.26
C1	11204.9	11850.48	9653.699	10903.03	70865.66
CL1	9376.908	11698.03	12718.27	11264.4	75172.84
C2	8993.325	8101.396	6977.36	8024.027	36550.98
CL2	8376.719	9691.66	10265.84	9444.741	53484.4
C3	10624.55	10303.86	9849.984	10259.47	63195.06
CL3	13511.11	12913.64	14167.69	13530.81	102186.1

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิงและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิงที่บรรจุโปรตีน วันที่ 4

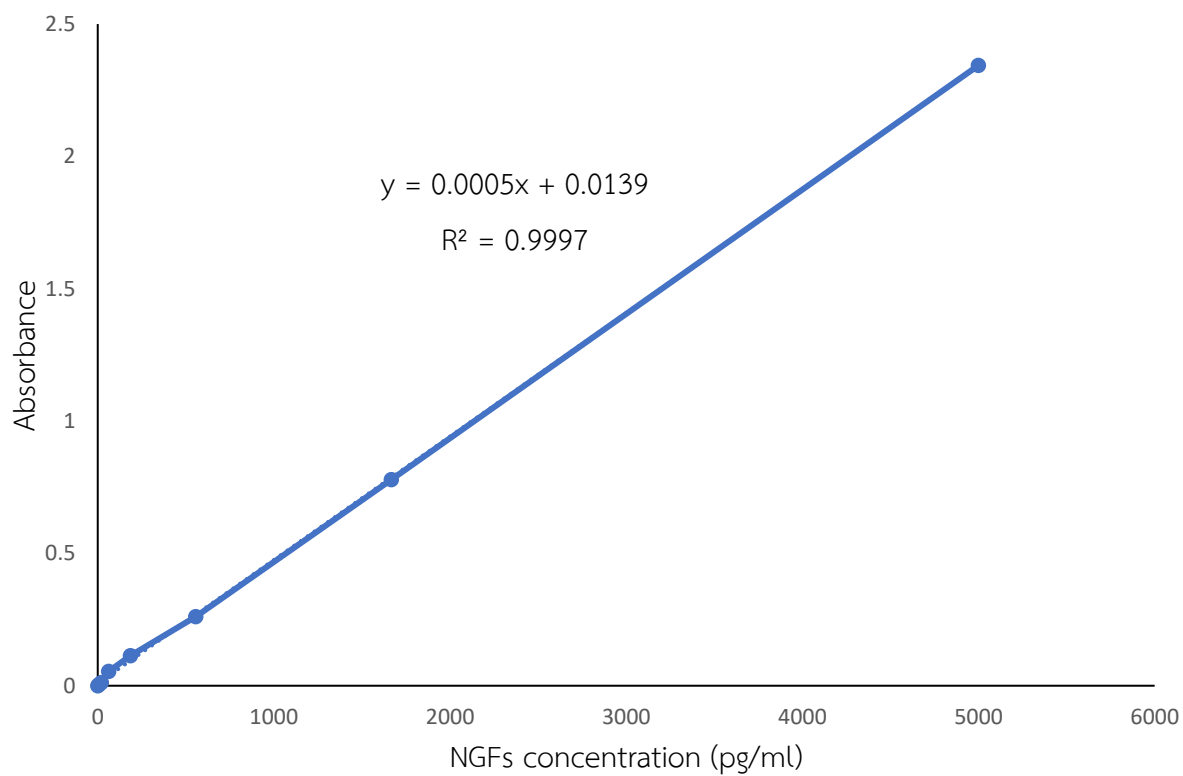
พอลิเมอร์	ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์			ค่าเฉลี่ย	ความเข้มข้นของเซลล์
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	103189	108241	118888	110106	1253261
Control ที่บรรจุ NGFs	100308	101900	101579	101262.3	1147854
C1	84349	102101	109263	98571	1115776
CL1	101942	99955	89737	97211.33	1099570
C2	82481	83282	99717	88493.33	995660.7
CL2	229659	217394	197321	214791.3	2501000
C3	68442	64437	62979	65286	719053.6
CL3	227219	233814	223221	228084.7	2659443

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิงและโครงร่างเส้นใยนาโนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซิงที่บรรจุโปรตีน วันที่ 7

พอลิเมอร์	ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์			ค่าเฉลี่ย	ความเข้มข้นของเซลล์
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	160603	170226	166361	165730	1916241
Control ที่บรรจุ NGFs	159540	170994	170644	167059.3	1932085
C1	161291	165591	185860	170914	1978029
CL1	129048	169119	211784	169983.7	1966940
C2	113550	117147	132006	120901	1381926
CL2	177734	200858	232194	203595.3	2367556
C3	163051	163838	176179	167689.3	1939594
CL3	172928	173239	171657	172608	2533118

5. ศึกษาการปลดปล่อยของ Nerve Growth Factors (NGFs)

5.1 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Nerve Growth Factors (NGFs)



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Nerve Growth Factors (NGFs)