



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®]
และ RL100[®] สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

Development of aligned Eudragit RS100[®] and RL100[®] electrospun
nanofibers for nerve tissue engineering

ภก.ผศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

รหัสโครงการ ๒๕๖๑๐๙A๑๐๘๐๐๓๖

สัญญาเลขที่ ๒๐๖/๒๕๖๑

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์เรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®]
และ RL100[®] สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

Development of aligned Eudragit RS100[®] and RL100[®] electrospun
nanofibers for nerve tissue engineering

ภก.พศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้งสถานที่ทำการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาว อารีรัตน์ ศรีพัฒนพร ที่ช่วยทำวิจัยในส่วนของความเป็นพิษต่อเซลล์ นายรัฐนันท์ ไทยตรง นิสิตช่วยวิจัย ขอขอบคุณ ภก. ฐาปกรณ์ เจริญยิ่ง นักศึกษาปริญญาเอก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้อ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ผู้ทำวิจัย

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ภก.ผศ.ดร. ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย
จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน)
มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง
(ภาษาไทย) การพัฒนาเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®]
สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท
(ภาษาอังกฤษ) Development of aligned Eudragit RS100[®] and RL100[®] electrospun
nanofibers for nerve tissue engineering
รหัสโครงการ256109A1080036.... / สัญญาเลขที่...206/2561.....ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น
400,500 บาท (สี่แสนห้าร้อยบาทถ้วน)
ระยะเวลาการดำเนินงาน 2 ปี 6 เดือน (ระหว่างวัน เดือน ปี)
ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึง 31 มีนาคม พ.ศ. 2563

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

หัวหน้าผู้วิจัย ภก.พศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี 6 เดือน

บทคัดย่อ

เทคนิคการปั่นเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวนำมาใช้ทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย ได้แก่ โครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อ วัสดุปิดแผล และระบบนำส่งยา การวิจัยนี้ เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาทผลิตได้สำเร็จด้วยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว เทคนิค การกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองค์การการจัดเรียงตัวของเส้นใย สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โครงสร้างทางเคมีและโครงสร้างผลึกของ เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี และ X-ray diffractometer การศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้เซลล์ประสาทหนู (Schwann cells) สำหรับการประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์และสัญญาณวิทยาของเซลล์ บนเส้นใย ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า สามารถเตรียมเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตรเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] อยู่ในรูปอสัณฐานและมีโครงสร้างทางเคมีคงเดิมเมื่อผ่านกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ประสาทหนู (Schwann cells) และเซลล์สามารถเจริญเติบโตทางเดียวตามแนวของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น สรุปผลการวิจัย เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] มีศักยภาพนำไปประยุกต์ใช้เป็นโครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อของเซลล์ประสาทได้

กุญแจคำ เส้นใยนาโน, วิศวกรรมเนื้อเยื่อ, เซลล์ประสาท, อิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัว

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Research title Development of aligned Eudragit RS100[®] and RL100[®] electrospun nanofibers for nerve tissue engineering

Investigator Assistant Professor Dr. Natthan Charernsriwilaiwat

Project period 2 year 6 month

Abstract

Electrospinning technique is widely investigated in medical applications such as tissue engineering scaffolds, wound dressing and drug delivery. In this study, the aligned nanofiber scaffold of Eudragit RS100[®] and RL100[®] was successfully fabricated via electrospinning technique for nerve tissue engineering scaffold. The diameter distribution and degree of alignment of Eudragit RS100[®] and RL100[®] nanofiber scaffold were observed by scanning electron microscope (SEM). The chemical and crystalline structure of Eudragit RS100[®] and RL100[®] nanofiber scaffold were analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Powder X-ray diffractometer (PXRD). Cell culture studies using rat Schwann cells were determined to evaluate cell proliferation cell alignment and morphology. The results implied that the diameter of fiber was in the nanometer region. The Eudragit RS100[®] and RL100[®] nanofiber scaffold were in an amorphous form and its chemical structure was not destructive after the electrospinning process. The Eudragit RS100[®] and RL100[®] nanofiber scaffold showed biocompatibility with rat Schwann cells and growing parallel to the aligned fibers. In conclusion, the Eudragit RS100[®] and RL100[®] nanofiber scaffold may have the ability to apply to nerve tissue engineering scaffold.

Keywords nanofibers, tissue engineering, nerve cells, electrospinning

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

| | หน้า |
|---|------|
| กิตติกรรมประกาศ | i |
| บทสรุปสำหรับผู้บริหาร | ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | iv |
| สารบัญเรื่อง | v |
| สารบัญตาราง | vi |
| สารบัญภาพ | vii |
| สารบัญตารางภาคผนวก | ix |
| สารบัญภาพภาคผนวก | x |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย | xi |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| - ความสำคัญและที่มาของปัญหา | 1 |
| - วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 3 |
| - ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย | |
| - สารเคมี | 9 |
| - อุปกรณ์ | 10 |
| - ระเบียบวิธีวิจัย | 11 |
| บทที่ 3 ผลการวิจัย | 14 |
| บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย | 26 |
| ผลผลิตที่ได้จากโครงการ | 27 |
| รายงานการเงิน | 32 |
| เอกสารอ้างอิง | 33 |
| ภาคผนวก | 36 |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | 45 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่เตรียมด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง | 16 |
| ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติเชิงกลของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว | 22 |
| ตารางที่ 3 แสดง Degree of swelling (%) ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว | 23 |

สารบัญภาพ

| | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Eudragit [®] RL100 and Eudragit [®] RS100 | 7 |
| รูปที่ 2 แสดงกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) | 11 |
| รูปที่ 3 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ condition RS1-4 และ RL1-4 | 15 |
| รูปที่ 4 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ condition RS5-6 และ RL5-6 | 16 |
| รูปที่ 5 ภาพถ่าย จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 5000 เท่า ของเส้นใยอิเล็กโตรสปิน PMMA (A) random และ (B) alignment | 17 |
| รูปที่ 6 กราฟเปรียบเทียบการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองค์การจัดเรียงของเส้นใย PMMA □ random และ ■ alignment | 17 |
| รูปที่ 7 ภาพถ่าย จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 5000 เท่า ของเส้นใยอิเล็กโตรสปิน Eudragit [®] RS100 (A) random และ (B) alignment | 18 |
| รูปที่ 8 กราฟเปรียบเทียบการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองค์การจัดเรียงของเส้นใย Eudragit [®] RS100 □ random และ ■ alignment | 18 |
| รูปที่ 9 ภาพถ่าย จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 5000 เท่า ของแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปิน Eudragit [®] RL100 (A) random และ (B) alignment | 19 |
| รูปที่ 10 กราฟเปรียบเทียบการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองค์การจัดเรียงของเส้นใย Eudragit [®] RL100 □ random และ ■ alignment | 19 |
| รูปที่ 11 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RS100 และ Eudragit [®] RS100 powder | 20 |
| รูปที่ 12 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RL100 และ Eudragit [®] RL100 powder | 20 |
| รูปที่ 13 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว PMMA และ PMMA powder | 21 |
| รูปที่ 14 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว PMMA, Eudragit [®] RS100 และ Eudragit [®] RL100 | 21 |
| รูปที่ 15 PXRD pattern ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว PMMA, Eudragit [®] RS100 และ Eudragit [®] RL100 | 22 |

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 16 จำนวนเซลล์ประสาทหนู Schwann cells เซลล์ บนแผ่นแก้ว (control) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ โตรสปั้นเรียงตัวแบบสุ่ม PMMA เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โตรสปั้นเรียงตัวทางเดียว PMMA (*มีนัยสำคัญ ทางสถิติ p-value < 0.05) | 23 |
| รูปที่ 17 จำนวนเซลล์ประสาทหนู Schwann cells เซลล์ บนแผ่นแก้ว (control) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ โตรสปั้นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RS100 เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โตรสปั้นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RS100 | 24 |
| รูปที่ 18 จำนวนเซลล์ประสาทหนู Schwann cells บนแผ่นแก้ว (control) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โตรส ปั้นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RL100 เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โตรสปั้นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RL100 | 24 |
| รูปที่ 19 แสดงรูปร่างของเซลล์ประสาทหนู Schwann cells ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน กำลังขยาย 500x บนแผ่นแก้ว (A) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โตรสปั้นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RS100 (B) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โตรสปั้นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RL100 (C) เส้นใย อิเล็กทรอนิกส์โตรสปั้นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RS100 (D) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โตรสปั้นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RL100 (E) | 25 |

สารบัญตารางภาคผนวก

| | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RS100 | 37 |
| ตารางที่ 2 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RS100 | 38 |
| ตารางที่ 3 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RL100 | 39 |
| ตารางที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RL100 | 40 |
| ตารางที่ 5 องค์การการจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RS100 | 41 |
| ตารางที่ 6 องค์การการจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RS100 | 42 |
| ตารางที่ 7 องค์การการจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit [®] RL100 | 43 |
| ตารางที่ 8 องค์การการจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit [®] RL100 | 44 |

สารบัญภาพภาคผนวก

| | |
|---|------|
| | หน้า |
| รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ประสาทเทียบกับค่าความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนต์ | 45 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

| | |
|------------------|--|
| % w/v | Percent weight by volume |
| % w/w | Percent weight by weight |
| °C | Degree Celsius |
| µg | Microgram |
| µL | Microliter |
| µm | Micrometer |
| µM | Micromolar |
| CFU | <i>Colony-forming unit</i> |
| cm | Centimeter |
| DPPH | 2,2-di(4- <i>tert</i> -octylphenyl)-1-picrylhydrazyl |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| et al. | and others |
| EtOH | Ethanol |
| FBS | Fetal bovine serum |
| g | Gram |
| h | Hour(s) |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IC ₅₀ | The half maximal inhibitory concentration |
| J | Joule |
| kDa | Kilodalton |
| kV | Kilovolt |
| M | Molar |
| MBC | Minimum bactericidal concentration |
| mg | Milligram |
| MIC | Minimum inhibitory concentration |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mL | Milliliter |

| | |
|-----|---|
| mPa | Megapascal |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide |
| MW | Molecular weight |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometer |
| OD | Optical density |
| PBS | Phosphate buffer solution |
| pH | Potentia hydrogenii (lat.) |
| pKa | $-\log_{10}K_a$ |
| PMS | Phenazonium methyl sulfate |
| ppm | Parts per million |
| rpm | Round per minute |
| s | second |
| SD | Standard deviation |
| SEM | Scanning electron microscope |
| UV | Ultraviolet |

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การบาดเจ็บของเส้นประสาทที่เกิดจาก อุบัติเหตุ โรคมะเร็งและการผ่าตัด เกิดขึ้นกว่า 500,000 รายต่อปีในยุโรปและอเมริกา การสูญเสียเส้นประสาทจะต้องใช้วิธีการรักษาที่ใช้เวลานาน และส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยสูงอายุ ที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ต่างๆ ในร่างกายที่ลดลง ซึ่งในอนาคตอันใกล้ประชากรบนโลกจะก้าวไปสู่สังคมของผู้สูงอายุ หากเกิดการสูญเสียเส้นประสาทในผู้สูงอายุอาจจะต้องการ การรักษาที่มีประสิทธิภาพมากกว่าปัจจุบัน [1] ในปัจจุบันหากมีการสูญเสียเส้นประสาทในผู้ป่วยจะต้องทำการผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ โดยอาจจะใช้เส้นประสาทของผู้ป่วยเอง (autografts) ซึ่งเป็นวิธีการรักษาหลัก หรืออาจจะใช้เส้นประสาทที่มาจากแหล่งอื่นๆ เช่น จากคนอื่น (allografts) หรือจากสัตว์ (xenografts) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีข้อจำกัด เช่น ความเข้ากันได้ระหว่างอวัยวะที่เปลี่ยนถ่าย (grafts) กับตัวผู้ป่วย การปฏิเสธอวัยวะที่เปลี่ยนถ่าย ขนาดความยาวของเส้นประสาทที่จะสามารถผ่าตัดนำมาใช้ได้ การผ่าตัดหลายครั้ง เป็นต้น จากข้อจำกัดดังกล่าว เส้นประสาทเทียมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยที่สูญเสียเส้นประสาท [1-3] ด้วยเหตุดังกล่าวการศึกษาพัฒนาโครงสร้างวัสดุชีวภาพที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท จึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย โครงสร้างทางชีวภาพที่จะนำมาใช้นั้นจะต้องมีคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อได้ โครงสร้างจะต้องเข้ากันได้กับร่างกายและไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และสามารถสลายตัวเองในร่างกายมนุษย์ในเวลาที่เหมาะสม มีเทคนิคมากมายที่สามารถสร้าง โครงสร้างทางชีวภาพเพื่อการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ได้แก่ solvent casting particulate leaching, gas forming, fiber bonding or solid free form fabrication include stereolithography, fuse deposition modeling, three dimensional printing and selective laser sintering [4] อย่างไรก็ตามยังมีอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจ คือ อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) ที่สามารถสร้างเส้นใยนาโนสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ [5]

กระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงเป็นกระบวนการผลิตเส้นใยขนาดเล็ก จากการให้แรงไฟฟ้าความต่างศักย์สูงแก่สารละลายพอลิเมอร์ที่อยู่ในกระบอกรีดที่ต่อเข้ากับเข็มโลหะ เมื่อให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าจนสามารถเอาชนะแรงตึงผิวของสารละลายพอลิเมอร์ จะทำให้สารละลายพอลิเมอร์ พุ่งออกไปและเกิดการระเหยของตัวทำละลายอย่างรวดเร็วเกิดเป็นเส้นใยขนาดเล็กตกลงบนส่วนรองรับเส้นใย เส้นใยที่ได้จากกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงสามารถนำมาใช้เป็นโครงสร้างสำหรับการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากลักษณะของเส้นใยอิเล็กโตรสปิน จะมีความคล้ายคลึงกับ extracellular matrix ของร่างกายมนุษย์ กระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงสามารถเตรียมเส้นใยที่มีขนาดให้ระดับนาโนเมตร สามารถผลิตได้จากพอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ พอลิแคปโพลแลคโตน (poly-ε caprolactone), พอลิไวนิล

แอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol), พอลิเอทิลีนออกไซด์ (polyethylene oxide), คอลลาเจน (collagen), เจลาติน (gelatin) และ ไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น มีรายงานว่าโครงสร้างวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ผลิตจากกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงสามารถกำหนดทิศทางการเจริญเติบโตของเซลล์ได้จากรูปแบบการจัดเรียงตัวของเส้นใย ในกรณีของเซลล์ประสาท เส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงที่มีการจัดเรียงตัวไปในทิศทางเดียว (aligned nanofibers) สามารถกำหนดทิศทางการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทได้ โดยเซลล์ประสาทจะเจริญเติบโตขนานไปกับแนวของเส้นใย มีการใช้พอลิเมอร์หลายชนิด ได้แก่ พอลิแคปโพลแลกโตน พอลิแคปโพลแลกโตน/ไคโตซาน พอลิแคปโพลแลกโตน/เจลาติน poly(L-lactide-co-caprolactone)/silk Poly methyl meta (PMMA) อย่างไรก็ตามการใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ จะทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ช้า เพราะมีความไม่ชอบน้ำสูง (hydrophobicity) ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยหลายชิ้นที่มีการใช้พอลิเมอร์ผสมระหว่าง พอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติ ซึ่งพอลิเมอร์ธรรมชาติเพียงอย่างเดียวก็มีข้อเสียสำคัญ เช่น มีความเปราะบาง มีความแข็งแรงต่ำ เมื่อเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ อย่างไรก็ตามมีพอลิเมอร์สังเคราะห์บางกลุ่มที่มีคุณสมบัติให้ประจุบวกได้ ในกลุ่มของ ammonio methacrylate copolymer เช่น Eudragit[®] RL100/ Eudragit[®] RS100 [6-8] ซึ่งประจุบวกพอลิเมอร์จะทำให้พอลิเมอร์มีความชอบน้ำมากขึ้น (hydrophilicity) และอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยทั่วไปพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีการนำมาใช้ทางเภสัชกรรมอยู่แล้ว จึงสามารถเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์สลายได้ในร่างกายมนุษย์ และมีความปลอดภัย อย่างไรก็ตาม การนำเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงที่ผลิตจาก Eudragit[®] RS100 และ Eudragit[®] RL100 มาใช้เป็นวัสดุสำหรับวิศวกรรมยังมีน้อย ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจนำพอลิเมอร์ Eudragit[®] RS100 และ Eudragit[®] RL100 มาพัฒนาเป็นวัสดุสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาทด้วยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิง [6, 9]

ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัย จะพัฒนาเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงที่มีการจัดเรียงของเส้นใยไปในทางเดียวจากพอลิเมอร์ Eudragit[®] RL100 และ Eudragit[®] RS100 เพื่อใช้เป็นวัสดุสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท เส้นใยที่ได้จะถูกตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) และตรวจลักษณะความเป็นผลึกของเส้นใยด้วย X-ray diffractometry (XRD) ศึกษาคุณสมบัติการพองตัว คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใย และ ศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะรูปร่างของเซลล์ประสาทบนเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงที่มีการจัดเรียงของเส้นใยไปในทางเดียวจากพอลิเมอร์ Eudragit[®] RL100 และ Eudragit[®] RS100 เปรียบเทียบกับ poly (methylmethacrylate) (PMMA)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่มีการจัดเรียงของเส้นใยไปในทางเดียวจากพอลิเมอร์ Eudragit® RL100 และ Eudragit® RS100 เพื่อใช้เป็นวัสดุสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท
2. เพื่อประเมินผลของชนิดของพอลิเมอร์ Eudragit® RL100 และ Eudragit® RS100 ต่อคุณสมบัติต่างๆ ของเส้นใยเช่น สัณฐานวิทยา คุณสมบัติเชิงกล การเจริญเติบโตของเซลล์บนเส้นใย เป็นต้น

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่มีการจัดเรียงตัวในทิศทางเดียวจากสารละลายพอลิเมอร์ Eudragit® RS100 และ Eudragit® RL100 ที่มีหมู่ quaternary ammonium แสดง ประจุบวก และ ศึกษาคุณสมบัติของเส้นใยที่ได้ทั้งทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ การศึกษาสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่เตรียมได้ การศึกษาการกระจายขนาดของเส้นใย การจัดเรียงตัวของเส้นใย คุณสมบัติการพองตัวของเส้นใย ความเป็นผลึกของเส้นใยด้วยเครื่อง XRD การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีด้วย FTIR การศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของเส้นใย เป็นต้น และ ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์บนเส้นใยที่ได้จากพอลิเมอร์ Eudragit® RS100 และ Eudragit® RL100 ที่มีประจุ เปรียบเทียบกับ PMMA ที่ไม่มีประจุ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่มีการจัดเรียงของเส้นใยไปในทางเดียวจากพอลิเมอร์ Eudragit® RL100 และ Eudragit® RS100 สามารถใช้เป็นวัสดุสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท
2. พอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด Eudragit® RL100 และ Eudragit® RS100 มีคุณสมบัติต่างๆ ของเส้นใยที่ดี เช่น สัณฐานวิทยา คุณสมบัติเชิงกล การเจริญเติบโตของเซลล์บนเส้นใย เป็นต้น

การทบทวนวรรณกรรม

ในปัจจุบันการเติบโตของวิทยาศาสตร์ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพื่อสร้าง ข้อมแซม หรือแทนที่ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะ โดยการใช้ส่วนผสมระหว่าง เซลล์ วัสดุชีวภาพ (biomaterials) และ โมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biologically active molecule) วิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงสามารถช่วยร่างกายของผู้ป่วยด้วยการสร้างวัสดุที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อผู้ป่วยได้ด้วยเหตุดังกล่าวเทคนิคทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงเข้ามาทดแทนการรักษาในปัจจุบัน ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยนับล้านคนมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น หลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะประกอบด้วย การแยกเซลล์จากผู้ป่วย อาจจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดก็ได้ นำมาเลี้ยงบนโครงร่าง (scaffold) สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตบนโครงร่างได้ดีแล้ว จะนำกลับเข้าไปแทนที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะของผู้ป่วย เพื่อให้ร่างกายของผู้ป่วยสร้างเนื้อเนื้อหรืออวัยวะนั้นขึ้นมาใหม่ ส่วนโครงร่างที่คอยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ในขั้นต้นนั้น จะค่อยๆ สลายไปตามเวลาที่เหมาะสม ขึ้นกับชนิดของวัสดุที่นำมาใช้ทำเป็นโครงร่าง ปัจจุบันสามารถ

ใช้เทคนิคนี้ สร้างเนื้อเยื่อตั้งแต่ชนิดที่มีความซับซ้อนน้อย เช่น กระจก กระจกอ่อน เส้นเลือด ผิวหนัง เส้นเอ็น ไปจนถึงอวัยวะที่มีการทำงานซับซ้อนมากขึ้น เช่น กะเพาะปัสสาวะ ตับอ่อน เป็นต้น [5, 10]

การสร้างตัวของเส้นประสาทหลังจากที่สูญเสียหรือเกิดการบาดเจ็บที่เส้นประสาทมักมีข้อจำกัดหลายประการ ทำให้ผู้ป่วยที่สูญเสียเส้นประสาท ไม่ว่าจะเกิดจากอุบัติเหตุ โรคมะเร็ง หรือการผ่าตัด ต้องทนทุกข์ทรมานไปกับการสูญเสียความรู้สึก การเคลื่อนไหว และอาการปวดปลายประสาท (neuropathic pain) เพื่อที่จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทที่สูญเสียไปให้รวดเร็วมากยิ่งขึ้น มีความพยายามคิดค้นวิธีการรักษาต่างๆ มากขึ้น ในกรณีของการสูญเสียเส้นประสาทรอบนอก (peripheral nervous system (PNS)) การผ่าตัดเชื่อมเส้นประสาทโดยตรง เป็นวิธีที่ทำได้ทั่วไป ในกรณีที่มีการสูญเสียเส้นประสาทไม่มาก สำหรับกรณีที่มีการสูญเสียเส้นประสาทเป็นจำนวนมาก ขนาดที่ยาวจนไม่สามารถต่อเส้นประสาทได้โดยตรง การเปลี่ยนถ่ายเส้นประสาทจากตัวผู้ป่วยเอง (nerve autografts) จะถูกพิจารณาเป็นการรักษามาตรฐาน สำหรับการสูญเสียเส้นประสาทที่ยาว อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนถ่ายดังกล่าวจะต้องผ่าตัดเอาเส้นประสาทของผู้ป่วยเอง ซึ่งทำให้บริเวณที่ผ่าตัด (donor site) เกิดการสูญเสียเส้นประสาททำให้ขาดความรู้สึกได้ และขนาดของเส้นประสาทที่จะนำไปใช้ก็จะเป็นไปอย่างจำกัด และทำให้ผู้ป่วยต้องผ่าตัดหลายครั้ง หากจะหลีกเลี่ยงมาใช้เส้นประสาทของบุคคลอื่น หรือของสัตว์ก็เสี่ยงต่อการปฏิเสธอวัยวะ (graft rejection) และอาจทำให้เกิดการติดเชื้อต่างๆ ตามมาได้ ด้วยเหตุผลหลายประการดังกล่าวมาข้างต้น โครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการผ่าตัดทดแทนเส้นประสาทในผู้ป่วยที่มีการสูญเสียเส้นประสาท คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเส้นประสาทเทียม จากโครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถดัดแปลงให้เข้ากันกับชนิดของเส้นประสาทที่สูญเสียไป ขนาด ความยาว และอื่นๆ วัสดุที่สามารถเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatible materials) และวัสดุที่สลายได้ในร่างกาย (biodegradable materials) ถูกนำมาใช้สร้างเป็นโครงร่าง เนื่องจากสามารถลดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ ส่วนการควบคุมลักษณะโครงสร้างของโครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อ สันฐานวิทยา และส่วนประกอบของโครงร่าง ทำให้สามารถกำหนดการเจริญเติบโตของเซลล์ บนโครงร่างได้ โครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงสามารถนำมาใช้สำหรับการสร้างเส้นประสาทเทียมเพื่อทดแทนวิธีการรักษาแบบดั้งเดิมได้ [11]

เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ คือ เส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตรหรือเรียกอีกอย่างว่านาโนไฟเบอร์ โดยทั่วไปนาโนไฟเบอร์จะผลิตขึ้นจากพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ และกำหนดให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 100 นาโนเมตร [12] คุณสมบัติที่โดดเด่นคือมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง มีรูขนาดเล็ก มีความพรุนมาก มีค่าแรงต้านทานแรงดึงตามยาวสูง เป็นต้น การผลิตนาโนไฟเบอร์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น drawing, template synthesis, phase separation, self-assembly และ electrospinning ซึ่งกระบวนการอิเล็กทรอนิกส์ เป็นกระบวนการที่อาศัยแรงทางไฟฟ้าจากแหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงในการปั่นสารละลายพอลิเมอร์ด้วยไฟฟ้าสถิตจนทำให้สารละลายพอลิเมอร์กลายเป็นนาโนไฟเบอร์ที่มีขนาดเล็กมาก [13] กระบวนการดังกล่าวประกอบ ด้วยส่วนสำคัญสามส่วนคือ แหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง (high voltage DC supply) หลอดบรรจุสารละลายที่ติดเข็มโลหะ (syringe with metal

needle) และวัสดุรองรับ (collector) เป็นระบบที่มีความซับซ้อนน้อย ต้นทุนต่ำ สามารถควบคุมขนาดและปริมาณการเกิดเส้นใยให้ต่อเนื่องได้มากยิ่งขึ้น โดยการควบคุมกระบวนการและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ทำให้เกิดเป็นเส้นใยของพอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็กมากทำให้เส้นใยมีค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อน้ำหนักที่สูงมาก [12] ลักษณะเด่นดังกล่าวทำให้มีการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำเส้นใยดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ เช่น วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ วัสดุควบคุมการปลดปล่อยยา วัสดุทางการแพทย์ โดยควบคุมการปลดปล่อยยาผ่านแม่เหล็กไฟฟ้า ส่วนประกอบของเส้นใยที่ป้องกันสารเคมีหรือจุลินทรีย์ได้ เส้นใยเสริมแรงในวัสดุเชิงประกอบ ทำให้ได้วัสดุที่มีน้ำหนักเบาและความแข็งแรงสูง และใช้ผลิตเป็นวัสดุรองรับสำหรับแยกอนุภาคที่มีขนาดเล็กออก เป็นต้น [14] กระบวนการเตรียมดังกล่าว เป็นกระบวนการที่อาศัยแรงทางไฟฟ้าในการทำให้สารละลายพอลิเมอร์ หรือพอลิเมอร์หลอมเหลวเกิดการยืดตัว โดยควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสม จนได้เส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับนาโนเมตร รูปแบบการนำส่งยาแบบเส้นใยนาโน โดยการเตรียมเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงของตัวยา เป็นการพัฒนารูปแบบนำส่งยาแบบใหม่ที่มีจุดประสงค์การเตรียมเพื่อเพิ่มการละลายหรือควบคุมการปลดปล่อยตัวยา เส้นใยนาโนนี้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก ส่งผลให้ช่วยเพิ่มการละลายของตัวยาที่ละลายน้ำยากได้ เพิ่มความคงตัวของตัวยา เพิ่มความสามารถในการเก็บกักยา และสามารถควบคุมการปลดปล่อยและการออกฤทธิ์ของตัวยาได้ตามต้องการ รวมทั้งยังอาจช่วยลดผลข้างเคียงของยาได้ [15]

Electrospinning เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นมา 60 ปีแล้ว แต่เพิ่งได้รับความสนใจศึกษากันอย่างจริงจังเมื่อประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาเอง ในปี ค.ศ. 1934 Formhals ได้จดสิทธิบัตรกระบวนการและเครื่องมือที่ใช้แรงทางไฟฟ้าในการสังเคราะห์เส้นใย ในปี ค.ศ. 1969 Taylor ได้ตีพิมพ์ผลงาน ที่อธิบายถึงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในขณะที่สารละลายพอลิเมอร์พุ่งออกจากเข็มโลหะที่ให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงว่ามีการเปลี่ยนรูปร่างของสารละลายจากทรงกลมเป็นลักษณะของสามเหลี่ยมคล้ายโคน เมื่อแรงสนามไฟฟ้ามีค่าเท่ากับแรงตึงผิวของสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งต่อมามีการเรียกลักษณะนี้ว่า Taylor cone โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น Taylor cone จะขึ้นกับความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์ ปี ค.ศ. 1971 Baumgarten เริ่มทำการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสารละลายพอลิเมอร์และพารามิเตอร์ในกระบวนการ ทำให้ทราบว่าพารามิเตอร์ต่างๆ มีผลต่อสัณฐานวิทยาของนาโนไฟเบอร์ที่ได้ ปี ค.ศ. 1995 Reneker ได้ทำการศึกษาอย่างเป็นระบบมากขึ้น ทำให้ electrospinning ได้รับความสนใจจากนักวิจัยต่างๆ ทั่วโลก เห็นได้จากจำนวนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติเรื่องต่างๆ ที่เกี่ยวกับ electrospinning เพิ่มจากประมาณ ปีละไม่ถึง 10 เรื่อง ตั้งแต่ปี ค.ศ.1995 ถึงปี ค.ศ.2000 เป็น 2200 เรื่องในปี ค.ศ. 2014 กระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงมีขั้นตอนต่างๆ ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งส่งผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของนาโนไฟเบอร์ที่ได้ [16-17] พบว่ามีพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ ศักย์ไฟฟ้า อัตราการไหล ระยะทางระหว่างปลายเข็มจนถึง collector ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ จะส่งผลต่อความหนืดและแรงตึงผิวของสารละลาย ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลาย ความสามารถในการระเหยของตัวทำละลาย [18]

ในการนำนาโนไฟเบอร์มาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และสุขภาพ มักจะเลือกใช้พอลิเมอร์ที่เข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatibility) และ/หรือ สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradability) ตัวอย่าง เช่น poly L-lactic acid (PLLA), chitosan (CS), polycaprolactone (PCL), polyethylene-co-vinyl acetate (PEVA) เป็นต้น การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และสุขภาพได้แก่

1. โครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering scaffolds) การประยุกต์ใช้ทางด้านการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ จะใช้นาโนไฟเบอร์เป็นโครงร่างเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อ โดยการใช้นาโนไฟเบอร์เป็นโครงร่างจะมีข้อดีกว่าไมโครไฟเบอร์คือมีพื้นที่ให้เซลล์ยึดเกาะได้มากกว่า ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า และโครงสร้างของนาโนไฟเบอร์ยังมีลักษณะคล้ายกับ extracellular matrix อีกด้วย จึงมีผู้วิจัยทำการศึกษานาโนไฟเบอร์ที่นำไปใช้ทางด้านโครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อกันมากในปัจจุบัน [19]

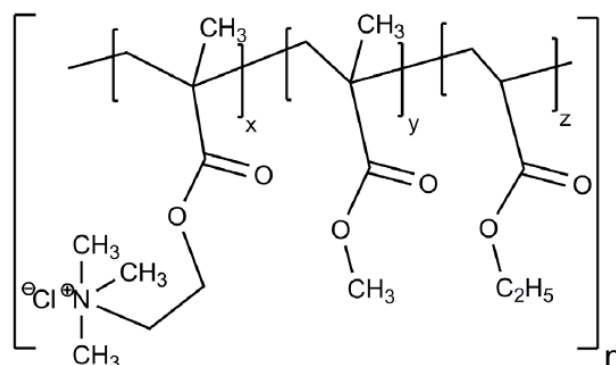
2. Medical prostheses เป็นการนำไปใช้ในการเป็นอวัยวะเทียม หลอดเลือดเทียม เนื้อเยื่อเทียมสำหรับซ่อมแซมกระดูกอ่อน และเส้นประสาท โดยตัวอย่างของการนำไปใช้ เช่น the new technology of Virginia commonwealth university ได้ศึกษาการขึ้นรูปนาโนไฟเบอร์โดยใช้คอลลาเจนเป็นหลอดเลือดเทียม นำไปใช้ในการผ่าตัดทำ bypass หัวใจโดยแทนที่การใช้หลอดเลือดจากขา Professor Gerald E. Scheider และ Rutledge Ellis-Behnke ได้ทำการศึกษานาโนไฟเบอร์ที่เกิดขึ้นได้เองจากอาร์จินิน (argenine) อะลานีน (alanine) และ กรดกลูตามิก (glutamic acid) 16 โมเลกุลเรียงเข้าไปมาและมีโครงร่างแบบ β -sheet ที่สามารถช่วยให้การเจริญเติบโตของ axon ขึ้นมาใหม่ เมื่อฉีดสารละลายของกรดอะมิโนเหล่านี้เข้าไปในสมองหนูที่ถูกทำลาย เนื่องจากนาโนไฟเบอร์เข้าไปช่วยเสริมในสมองส่วนที่ถูกทำลาย เมื่อเซลล์ประสาทเข้าไปอยู่ในโครงร่างนาโนไฟเบอร์ทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น งานวิจัยนี้ถือเป็นความหวังใหม่ในการซ่อมแซมเซลล์สมองของมนุษย์ [20-21]

3. สิ่งตกแต่งแผล (Wound dressing) นาโนไฟเบอร์มีคุณสมบัติที่โดดเด่นในด้านพื้นที่ผิว ดังนั้นในการนำเป็นสิ่งตกแต่งแผลจะมีข้อดีกว่าผ้าก๊อซ ธรรมดาคือมีพื้นที่ผิวในการดูดซับของเหลวได้มากกว่าทำให้แผลแห้งเร็ว และยังเป็นโครงร่างทำให้เซลล์ใหม่เจริญเติบโตได้ดีทำให้แผลหายเร็วและสามารถป้องกันการเกิดแผลเป็นได้ดีกว่า นอกจากนี้ด้วยรูที่มีขนาดเล็กของนาโนไฟเบอร์ยังเป็นสิ่งกีดขวางไม่ให้แบคทีเรียผ่านเข้าไปได้ แต่ยังระบายอากาศได้ดี นิยมใช้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติสลายได้เองในร่างกายโดยสามารถ spray โดยตรงไปที่แผล หรือทำเป็นแผ่นสำหรับติดแผล พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ เช่น คอลลาเจน ไคโตซาน เป็นต้น [22-23]

4. เครื่องสำอาง (Cosmetic) โดยใช้เป็นเครื่องมือในการนำส่งเครื่องสำอางเข้าสู่ผิว ในลักษณะของแผ่นมาสก์ เนื่องจากแผ่นเส้นใยมีพื้นที่ผิวมาก ทำให้การบรรจุสารต่างๆ ลงในแผ่นได้ปริมาณมาก สารที่นิยมใช้ เช่น สารทำความสะอาด สารเพิ่มความชุ่มชื้น สารแอนติออกซิเดชั่น เป็นต้น นอกจากนี้จะสามารถใส่สารในแผ่นมาสก์นาโนไฟเบอร์ได้ในปริมาณมากแล้ว การปลดปล่อยยังเกิดได้รวดเร็วในระยะแรกอีกด้วย ทำให้ได้รับปริมาณสารปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น [24]

5. ระบบนำส่งยา (Drug delivery system) ด้วยเหตุผลเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง ทำให้สามารถบรรจุยาได้มาก มีการปลดปล่อยยาที่รวดเร็ว และยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ หากใช้เทคนิค coaxial electrospinning โดยสามารถควบคุมปริมาณยาที่ปลดปล่อยได้โดยการควบคุม อัตราการไหลของตัวยาในสารละลายที่อยู่ใน capillary ด้านใน ทำให้แกนมีปริมาณมากหรือน้อยตาม ต้องการ ตัวอย่างยาที่มีการศึกษาวิจัย เช่น ยาในกลุ่มต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ หลังผ่าตัด โดยเมื่อผ่าตัดเสร็จแล้วจะฝังนาโนไฟเบอร์ที่สลายได้ในร่างกายที่มียาต้านเชื้อแบคทีเรียอยู่ลง ไป ยาต้านมะเร็งใช้การฝังเข้าไปในอวัยวะที่เป็นมะเร็ง ยาแก้ปวดและต้านการอักเสบมีการศึกษาโดยการ พัฒนาเป็นแผ่นแปะผิวหนัง เป็นต้น [14]

สำหรับการศึกษาการนำเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์มาใช้เป็นวัสดุโครงสร้างสำหรับเซลล์ประสาท มีการใช้ พอลิเมอร์หลายชนิดเช่น chitosan/polycaprolactone [2], polycaprolactone [25], poly L lactic acid [26], poly L lactide/polyaniline [27], polypyrrole/poly(lactide-co-glycolide) [28] เป็นต้น ในทางเภสัชกรรมยังมีพอลิเมอร์สังเคราะห์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ เช่น polyacrylates หรือใช้ ชื่อทางการค้าว่า Eudragit[®] Eudragit[®] เป็น copolymer ได้จาก ester ของ acrylic และ methacrylic acid ซึ่งมีคุณสมบัติทาง physicochemical แตกต่างกันไป Eudragit[®] RL100 และ Eudragit[®] RS100 เป็น copolymer ของ ethyl acrylate, methyl methacrylate และ a low content of a methacrylic acid ester ที่มี quaternary ammonium groups (trimethylammonioethyl methacrylate chloride) การมีหมู่ ammonium ทำให้พอลิเมอร์มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeability) Eudragit[®] RL จะประกอบด้วย ethyl acrylate, methyl methacrylate and trimethylammonioethyl methacrylate ในอัตราส่วน 1:2:0.2 ส่วน Eudragit[®] RS จะประกอบด้วย ethyl acrylate, methyl methacrylate and trimethylammonioethyl methacrylate ในอัตราส่วน 1:2:0.1 [29] โครงสร้างของ Eudragit[®] RL100 และ Eudragit[®] RS100 แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Eudragit[®] RL100 and Eudragit[®] RS100 [29]

ปัจจุบันมีการใช้ พอลิเมอร์ Eudragit[®] เตรียมเป็นเส้นใยนาโนด้วยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิง Shen และคณะ ปี 2005 รายงานการใช้ Eudragit[®] L100 บรรจุนยา diclofenac sodium เพื่อนำส่งยาไปยังลำไส้ใหญ่ ผลการศึกษาพบว่า ขนาดของเส้นใยอยู่ในระดับนาโนเมตรเมื่อใช้ ethanol และ dimethylacetamide เป็นตัวทำละลาย ยา diclofenac sodium ปลดปล่อยออกมาได้ที่ pH 6.8 [9] การรายงานการใช้ polyacrylate copolymer สำหรับใช้เป็นเส้นประสาทเทียม Xia และคณะ ปี 2014 รายงานการใช้เส้นใยอิเล็กโตรสปินจาก poly (methyl methacrylate) (PMMA) ที่มีการจัดเรียงตัวของเส้นใยเป็นแบบสุ่มและแบบเรียงตัวไปทางเดียวเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ rat dorsal root ganglion neurons จากการศึกษาพบว่า เส้นใยอิเล็กโตรสปิน PMMA ที่มีการจัดเรียงตัวในทางเดียวสามารถชักนำการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทได้ [7] ต่อมา Xia และคณะ ปี 2016 ทำการศึกษาโดยใช้ PMMA สำหรับส่งเสริมเซลล์สองชนิด คือ Schwann cells และ neurites of dorsal root ganglion neurons ผลการศึกษาพบว่าเส้นใย PMMA ที่มีการจัดเรียงตัวไปในทางเดียวนั้นสามารถกำหนดทิศทางการเจริญเติบโตของเส้นประสาทได้ [30]

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมี

- 2.1.1 Eudragit RS100[®] (Evonik, Germany)
- 2.1.2 Eudragit RL100[®] (Evonik, Germany)
- 2.1.3 Polymethyl metha arylate (Sigma, USA))
- 2.1.4 Ethanol (Labscan co.ltd.)
- 2.1.5 Dimethylformamide (Labscan co.ltd.)
- 2.1.6 Orthophosphoric acid (Labscan co.ltd.)
- 2.1.7 Dulbecco's modified eagle medium (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.8 Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.9 L-Glutamine-200 mM (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.10 Penicillin G sodium for injection (sterile) (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.11 Sodium Pyruvate 100 mM (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.12 Sterile water for irrigation (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.13 Streptomycin sulfate (sterile) (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.14 Trypan blue stain 0.4% w/v (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.15 Trypsin-EDTA (0.25%) solution (GIBCO[™], Grand Island, NY, USA)
- 2.1.16 Tryptone soy broth (TSB) (Lab M Limited, Bury, Lancashire, UK)
- 2.1.17 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA)
- 2.1.18 Potassium phosphate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)
- 2.1.19 Sodium bicarbonate (BDH AnalaR[®], VWR International Ltd. England)
- 2.1.20 Sodium chloride (Ajax Finechem Australia, New Zealand)
- 2.1.21 Sodium hydroxide pellet (Ajax chemicals, New South Wales, Australia)
- 2.1.22 Sodium phosphate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)

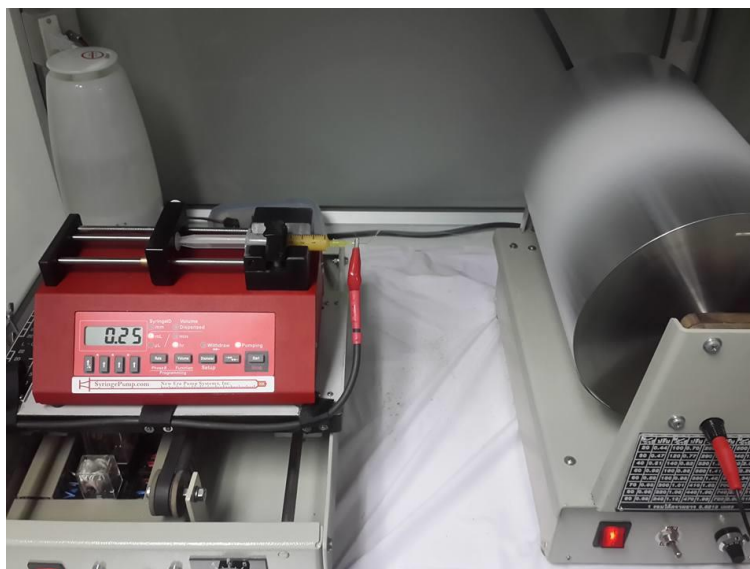
2.2 วัสดุอุปกรณ์

- 2.2.1 Beaker ขนาด 20 , 50 , 100 , 250 , 400 และ 1,000 มิลลิลิตร (SCHOTT[®], Germany)
- 2.2.2 Centrifuge (LEGEND X1R, Thermo Fisher Scientific[®], USA)
- 2.2.3 Cylinder ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร Micropipettes ขนาด 20-5000 μ L (BIOHIT[®] Proline 100-1000 μ L, RAININ[®] Pipet-Lite XLS)
- 2.2.4 Dropper

- 2.2.5 Electrical balance (New classic MF, MS204, METTLER TOLEDO[®], Switzerland)
- 2.2.6 Evaporator (Buchi[®], Thailand)
- 2.2.7 Funnel
- 2.2.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) instrument (Agilent Technologies,USA)
- 2.2.9 HPLC vial (Duran SCHOTT[®],Germany)
- 2.2.10 High voltage power supply (Gamma high voltage research,USA)
- 2.2.11 Hot plate (IKA[®]C-MAG HS 7 ,Becthai Bangkok Equipment & Chemicak Co.,Ltd.,Thailand)
- 2.2.12 Magnetic stirrer and stirrer bar (IKA[®]RO10, Becthai Bangkok Equipment & Chemicak Co.,Ltd.,Thailand)
- 2.2.13 Microplate reader (Accu Reader[®] Metertech Inc,Taiwan)
- 2.2.14 Scanning electron microscopy (SEM LEO 1450VP, EDAX[®], USA)
- 2.2.15 Sonicator (Ultrasonic cleaner set,WiseClean[®],Korea)
- 2.2.16 Stirring rod
- 2.2.18 Test tube
- 2.2.19 Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (SCHOTT[®],Germany)

2.3 การเตรียมเส้นใยอิเล็กโตรสปิน

นำพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม และความเข้มข้นที่ได้ทำการทดลองมาก่อนหน้านี้แล้ว (preliminary study) ใช้ Eudragit[®] RS100 และ Eudragit[®] RL100 ที่ความเข้มข้น 35 – 45 % w/w ใน dimethylformamide (DMF): ethanol (3.5:6.5) ปั่นใน magnetic stirrer เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สารละลายที่ได้ถูกนำไปบรรจุในหลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ต่อเข้ากับเข็มโลหะขนาด 21G นำไปวางบน syringe pump และต่อปลายเข็มโลหะ เข้ากับ high-voltage DC power supply (Gamma High Voltage Research) ให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 15 กิโลโวลต์ สารละลายถูก pump ด้วยอัตรา 0.25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ระยะห่างระหว่าง ปลายเข็มถึงส่วนรองรับเส้นใยที่ 15 เซนติเมตร ระยะเวลาในการเตรียมแต่ละครั้งอยู่ที่ 4 ชั่วโมง สำหรับเส้นใยที่มีการจัดเรียงตัวแบบสุ่ม จะใช้ความเร็วของ drum ที่รองรับความเร็วรอบ 200 rpm สำหรับเส้นใยที่มีการจัดเรียงตัวทางเดียว จะใช้ความเร็วของ drum ที่รองรับความเร็วรอบ 1200 rpm เครื่องมือสำหรับอิเล็กโตรสปินนิ่ง แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง (electrospinning)

2.4 การตรวจสอบคุณลักษณะของเส้นใยอิเล็กโตรสปิน

2.4.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope, SEM)

ตัดแผ่นเส้นใยให้มีขนาด 0.5 X 0.5 cm นำไปติดบน Stub ด้วย carbon tape จากนั้นนำไปเคลือบทอง ด้วยเครื่อง Gold Sputter จากนั้นนำไปส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ถ่ายจำนวน 3 ภาพต่อตัวอย่างด้วยกำลังขยายเท่ากัน เมื่อได้รูปภาพแล้วนำมาวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยด้วย

โปรแกรมในการวิเคราะห์ (JMicroVision V.1.2.7, Switzerland) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางตัวอย่างละ 100 เส้น นำมาหาเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สร้างกราฟการกระจายขนาดของเส้นใย

2.4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของแผ่นเส้นใย

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของแผ่นเส้นใย ดังนี้

1) การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของแผ่นเส้นใยโดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) ใช้เครื่อง FT-IR สแกนความยาวคลื่น 400 – 4,000 cm^{-1}

2) การตรวจสอบความเป็นผลึกของเส้นใยด้วยเทคนิค powder x-ray diffractometer (PXRD, Miniflex II, Rigaku, Japan) ใช้ Nickel-filtered Cu radiation generated in a sealed tube operated at 30 kv and 15 mA บันทึก diffraction pattern ที่ the θ range of 5 – 45° อัตราการสแกน เท่ากับ 4 min^{-1}

2.5 ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์

ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ ด้วยเครื่อง texture analyzer (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) ใช้โหลดเซลล์ 5 kg ต่อเข้ากับ tensile grips holder ตัดตัวอย่างเส้นใยขนาด 5 x 25 mm เส้นใยมีความหนาอยู่ในช่วง 20 – 30 μm วัดค่าแรง tensile stress, stain และ Young's modulus ของเส้นใย

2.6 ศึกษาการพองตัวของแผ่นเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์

การศึกษาการพองตัวของเส้นใย (degree of swelling) ทำในสารละลาย phosphate buffer pH 7.4 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คำนวณการพองตัวของเส้นใยตามสูตร

$$\text{Degree of swelling (\%)} = (M - M_d)/M_d \times 100 \quad (1)$$

โดยที่ M is the weight of each sample after immersion in the buffer solution for 1 h and M_d is the initial weight of the sample in its dry state

2.7 การศึกษาในเซลล์

เซลล์ประสาท Schwann cells Rat (*Rattus norvegicus*) (CRL-2941™) American type culture collection (ATCC) เลี้ยงใน DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% v/v fetal serum albumin (FBS), 1% v/v L-glutamine and 1% v/v penicillin/streptomycin เซลล์เลี้ยงใน incubator ที่ 37 °C, with 5% CO_2 สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์และสัณฐานวิทยาของเซลล์บนเส้นใย 1 ml ของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จะเลี้ยงลงในเส้นใย จะมีประมาณเซลล์อยู่ที่ 10,000 cell/ml เส้นใยจะถูกตรึงไว้บน cell crown

2.7.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์บนเส้นใย

การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ประเมินโดย Alamar blue assay ที่เวลาต่างๆ หลังจากใส่เซลล์ลงในเส้นใยเช่น 1 3 5 7 วัน เป็นต้น ที่แต่ละจุดเวลาอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและแทนที่ด้วย 1 ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี สารละลาย alamar blue (5 mM) 100 μ l บ่มตัวอย่างที่ 37 °C, with 5% CO₂ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 μ l/well จะถูกดูดลงใน black 96-well plate นำไปวัด fluorescence at 530 excitation and 590 emissions โดยใช้ microplate reader (Universal Microplate Analyzer, Model AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, Meriden, CT) ค่า fluorescence จะถูกคำนวณเป็นปริมาณเซลล์ที่อยู่ในแผ่นเส้นใย โดยเปรียบเทียบกับ standard curve ที่ได้เตรียมไว้ก่อนหน้า

2.7.2 การศึกษาสัญญาณวิทยาของเซลล์บนเส้นใย

ที่เวลาต่างๆ เซลล์ที่เลี้ยงอยู่บนเส้นใยนาโนจะถูกตรึงด้วย 1.5% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C จากนั้นล้างด้วย 0.1M phosphate buffer ตัวอย่างที่มีเซลล์จะถูกทำให้แห้งด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ บ่มร่วมกับ hexamethyldisilazane (HMDS) เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ Statistical analysis

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่าง กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม (SPSS version 10.0 for Windows (SPSS Inc., USA))

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1. การเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว

เตรียมสารละลาย Eudragit[®] RS100 45% w/w ชั่ง 2.25 g ปิเปต DMF 1.75 ml ใส่ลงไปก่อนตามด้วย EtOH 99.99% 3.25 ml ปั่นด้วย magnetic bar + stirrer (Eudragit[®] RL100 45 %w/v เหมือนกัน)

การเตรียมเส้นใยให้มีการจัดเรียงตัวแบบสุ่ม (Random) หมุนส่วนรองรับที่ความเร็ว 200 rpm

1. Eudragit RS100 = 15 kV, 0.25 ml/h, 15 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RS1
2. Eudragit RS100 = 15 kV, 0.5 ml/h, 10 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RS2
3. Eudragit RL100 = 15 kV, 0.25 ml/h, 15 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RL1
4. Eudragit RL100 = 15 kV, 0.5 ml/h, 10 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RL2

การเตรียมเส้นใยให้มีการจัดเรียงตัวแบบทางเดียว (Aligned) หมุนส่วนรองรับที่ความเร็ว 600 rpm

1. Eudragit RS100 = 15 kV, 0.25 ml/h, 15 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RS3
2. Eudragit RS100 = 15 kV, 0.5 ml/h, 10 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RS4
3. Eudragit RL100 = 15 kV, 0.25 ml/h, 15 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RL3
4. Eudragit RL100 = 15 kV, 0.5 ml/h, 10 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RL4

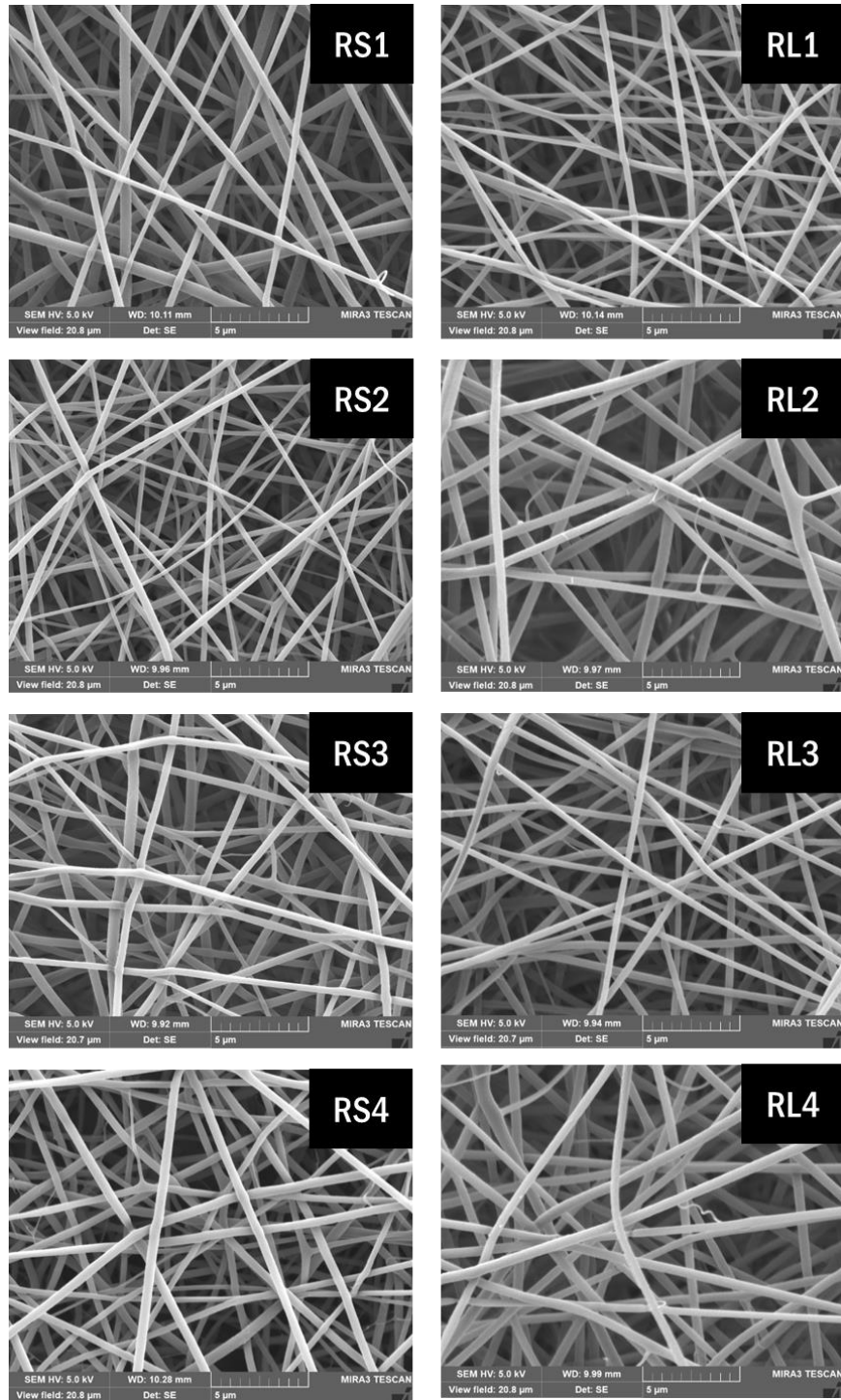
เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้ผลดังรูปที่ 2 พบว่าที่ความเร็วรอบของส่วนรองรับ 600 rpm ยังไม่สามารถทำให้เส้นใยเรียงตัวไปในทางเดียวกันได้ จึงได้เพิ่มความเร็วรอบจาก 600 rpm เป็น 1200 rpm

การเตรียมเส้นใยให้มีการจัดเรียงตัวแบบทางเดียว (Aligned) หมุนส่วนรองรับที่ความเร็ว 1200 rpm

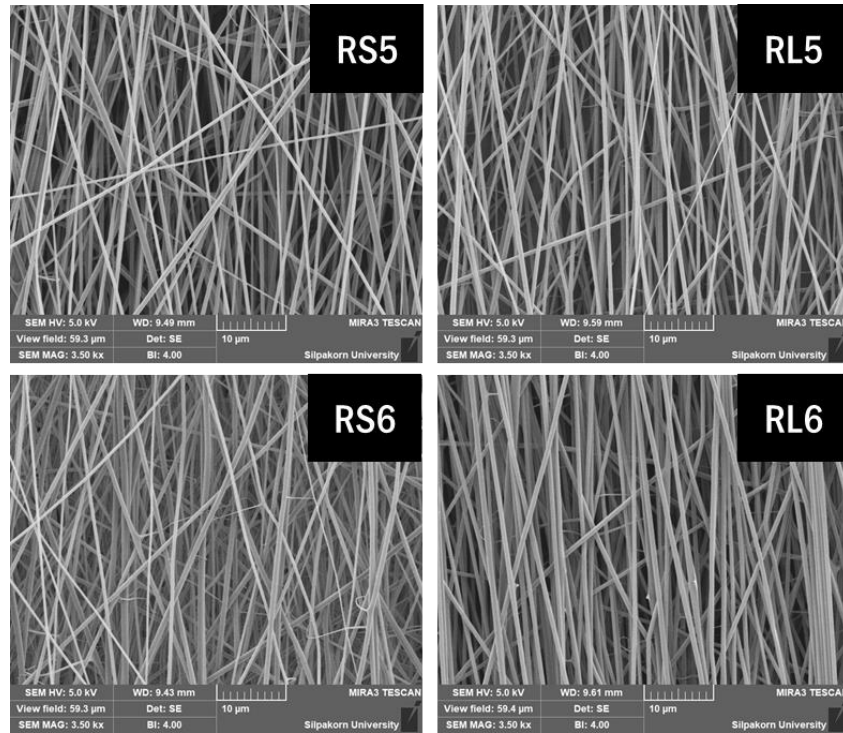
1. Eudragit RS100 = 15 kV, 0.25 ml/h, 15 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RS5
2. Eudragit RS100 = 15 kV, 0.5 ml/h, 10 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RS6
3. Eudragit RL100 = 15 kV, 0.25 ml/h, 15 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RL5
4. Eudragit RL100 = 15 kV, 0.5 ml/h, 10 cm ระยะเวลา 2 h เก็บ condition RL6

เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้ผลดังรูปที่ 4 พบว่าเส้นใยมีการจัดเรียงตัวไปในทางเดียวกันมากขึ้น จากผลการทดลอง พบว่า การให้ feed rate ที่ 0.25 และ 0.5 ไม่ทำให้สัณฐานวิทยาของเส้นใยเปลี่ยนแปลง

เตรียมสารละลาย Polymethyl metha acrylate (PMMA) ที่ความเข้มข้น 22 %W/W ละลายใน Dimethylformamide (DMF) นำไปปั่นเป็นเส้นใย



รูปที่ 3 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ condition RS1-4 และ RL1-4



รูปที่ 4 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ condition RS5-6 และ RL5-6

จากผลการศึกษาความเป็นไปได้เบื้องต้นพบว่าสามารถผลิตเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่มีการจัดเรียงตัวทางเดียว จาก Eudragit[®] RS100 และ Eudragit[®] RL100 ได้ โดยใช้สภาวะการผลิตดังนี้

- 1) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลท์
- 2) อัตราการไหลของสารละลาย 0.25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง
- 3) ระยะห่างระหว่างส่วนรองรับ 15 เซนติเมตร
- 4) หมุนส่วนรองรับที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที สำหรับการจัดเรียงแบบสุ่ม และ 1200 รอบต่อนาที สำหรับการจัดเรียงตัวทางเดียว

เมื่อนำเส้นใยที่ได้ส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 5000x ได้ผลการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย ดังตารางที่ 1

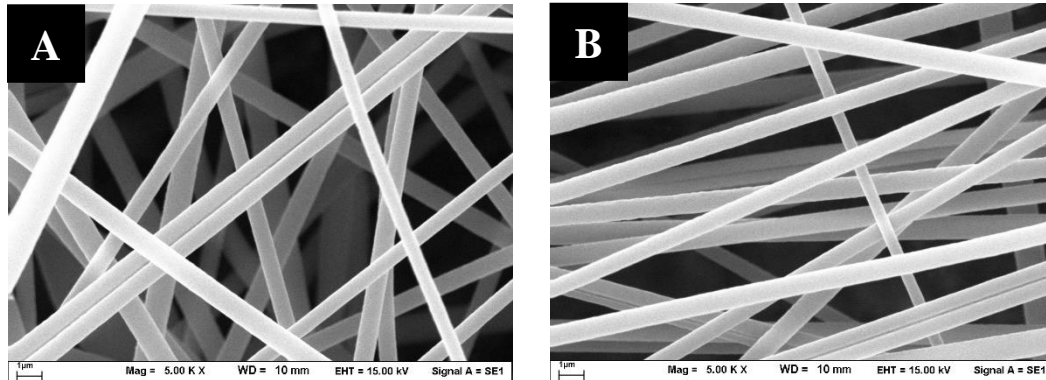
ตารางที่ 1 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่เตรียมด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์ป็นนิง

| ตัวอย่าง | เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ป็นนิงแบบสุ่ม (nm) | เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ป็นนิงเรียงตัวทางเดียว (nm) |
|-----------------------------|---|--|
| PMMA | 767.01 ± 209.35 | 759.33 ± 88.13 |
| Eudragit [®] RS100 | 504.83 ± 141.77 | 552.19 ± 104.71 |
| Eudragit [®] RL100 | 492.06 ± 95.28 | 500.10 ± 93.62 |

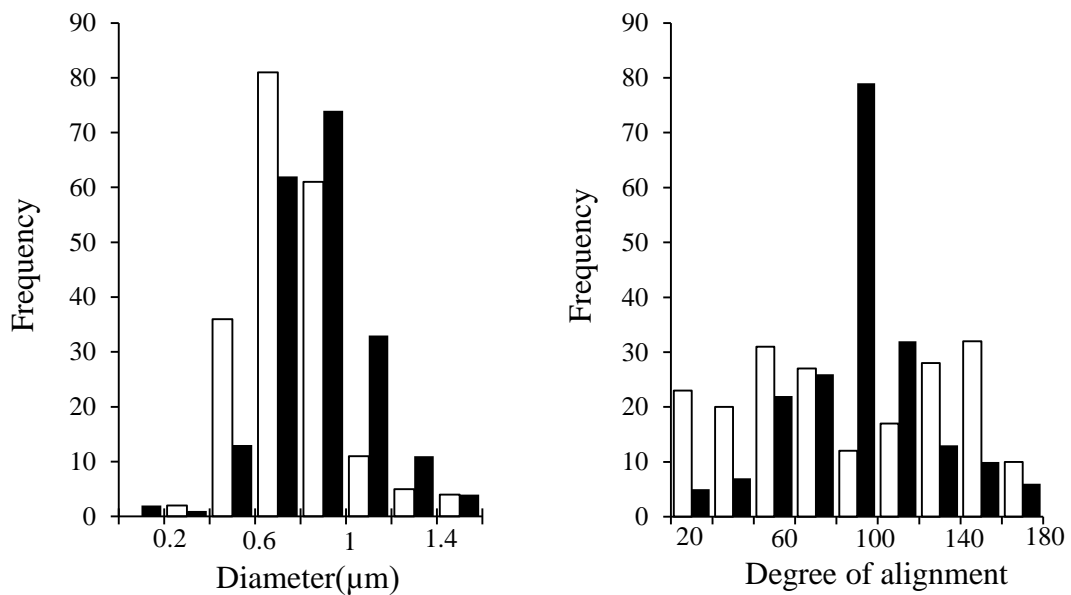
3.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น

3.2.1 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope, SEM)

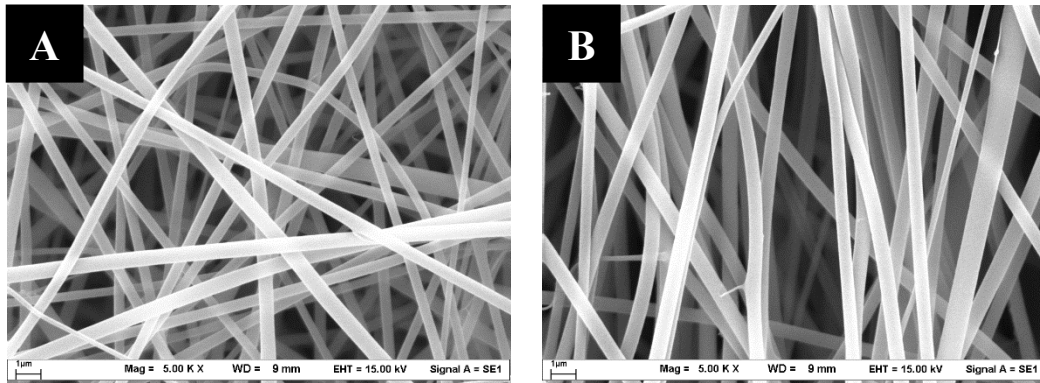
ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาแสดงดังรูปที่ 5-10



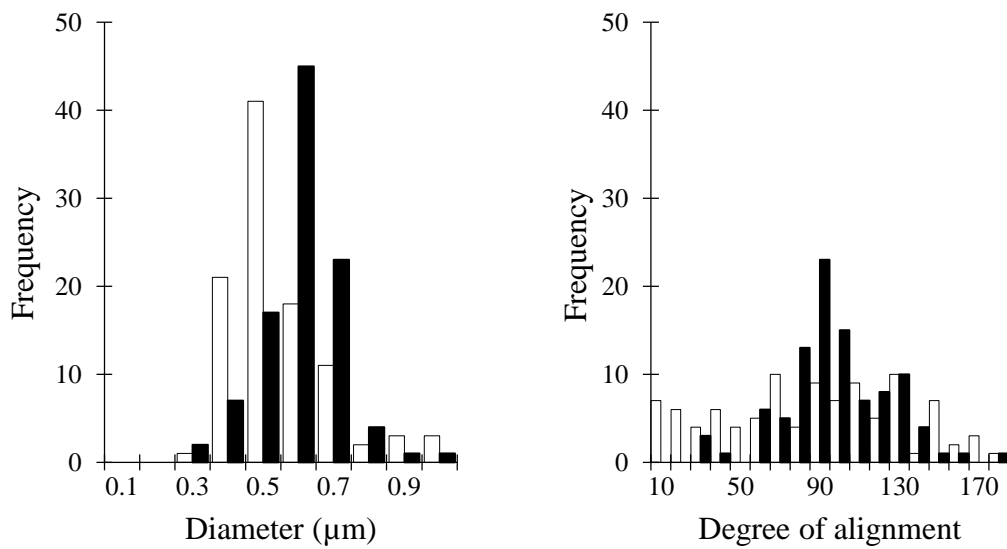
รูปที่ 5 ภาพถ่าย จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 5000 เท่า ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น PMMA (A) random และ (B) alignment



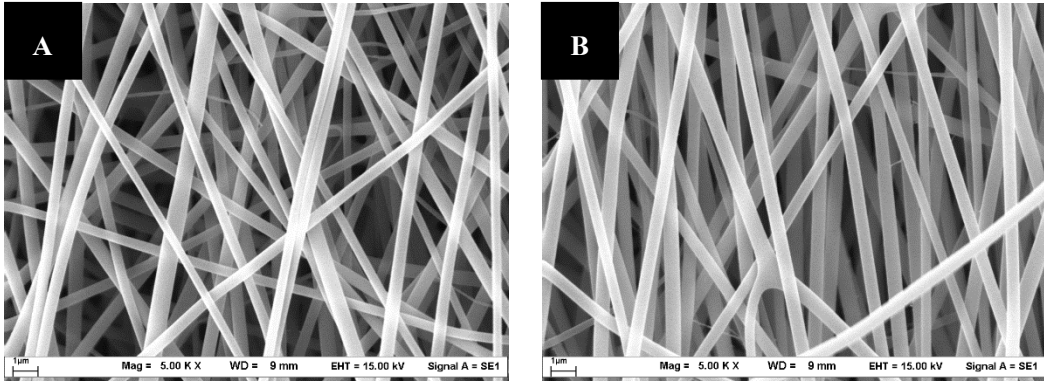
รูปที่ 6 กราฟเปรียบเทียบการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองศาการจัดเรียงของเส้นใย PMMA
□ random และ ■ alignment



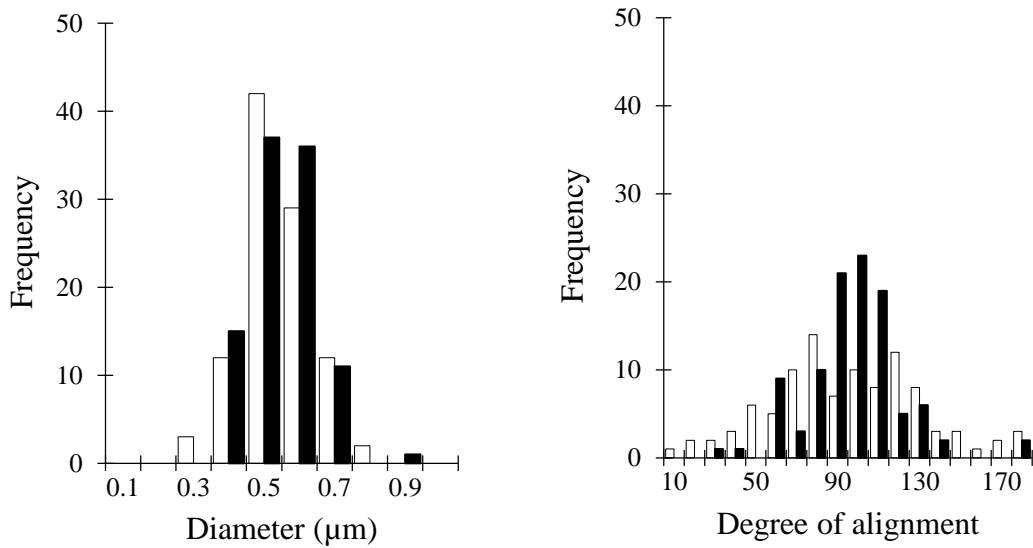
รูปที่ 7 ภาพถ่าย จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 5000 เท่า ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit[®] RS100 (A) random และ (B) alignment



รูปที่ 8 กราฟเปรียบเทียบการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองศาการจัดเรียงของเส้นใย Eudragit[®] RS100 □ random และ ■ alignment



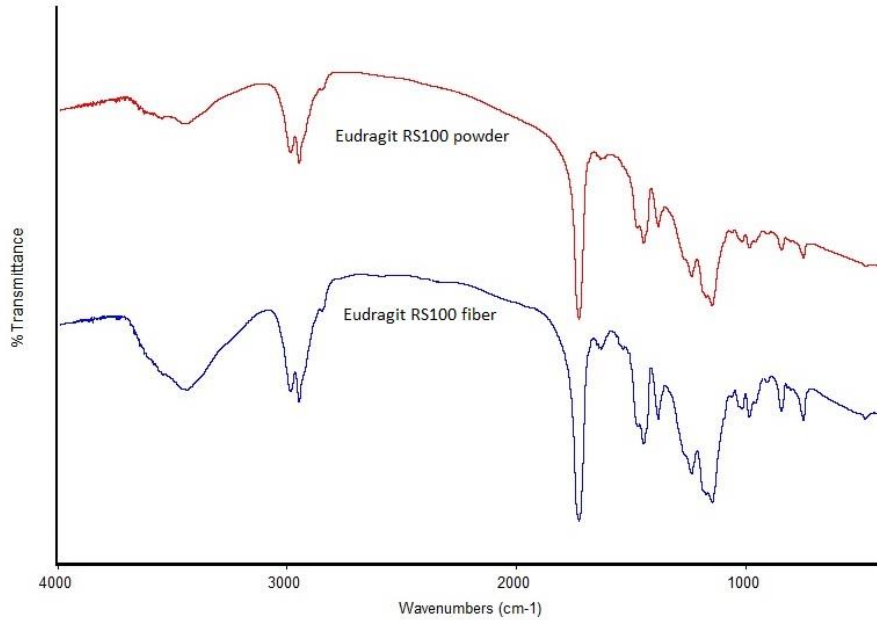
รูปที่ 9 ภาพถ่าย จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 5000 เท่า ของแผ่นเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ Eudragit[®] RL100 (A) random และ (B) alignment



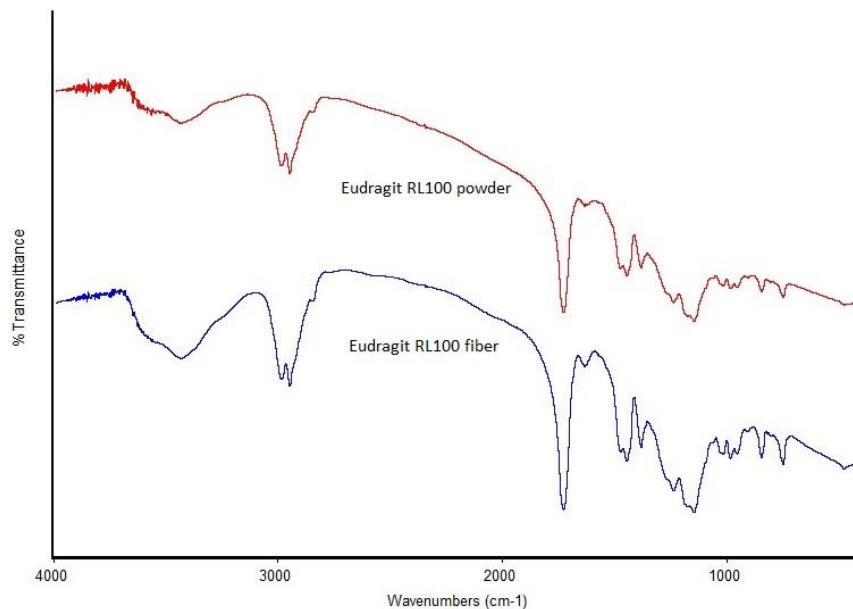
รูปที่ 10 กราฟเปรียบเทียบการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและองศาการจัดเรียงของเส้นใย Eudragit[®] RL100 □ random และ ■ alignment

3.2.2 การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของแผ่นเส้นใย

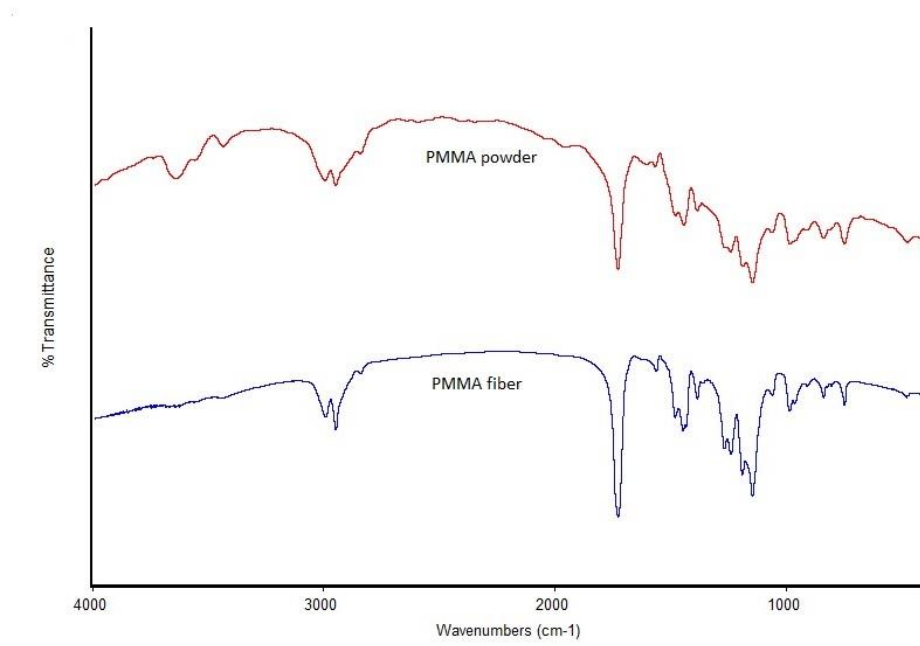
FT-IR pattern ของแผ่นเส้นใยนาโน PMMA-120 แสดงดัง รูปที่ 11 - 14 และ PXRD pattern ของแผ่นเส้นใยนาโน แสดงดังรูปที่ 15



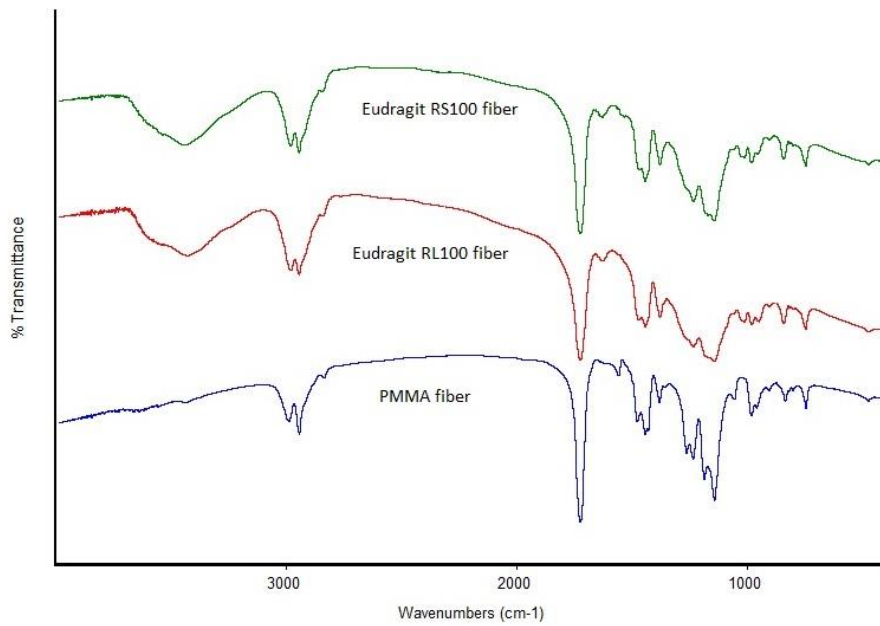
รูปที่ 11 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว Eudragit[®] RS100 และ Eudragit[®] RS100 powder



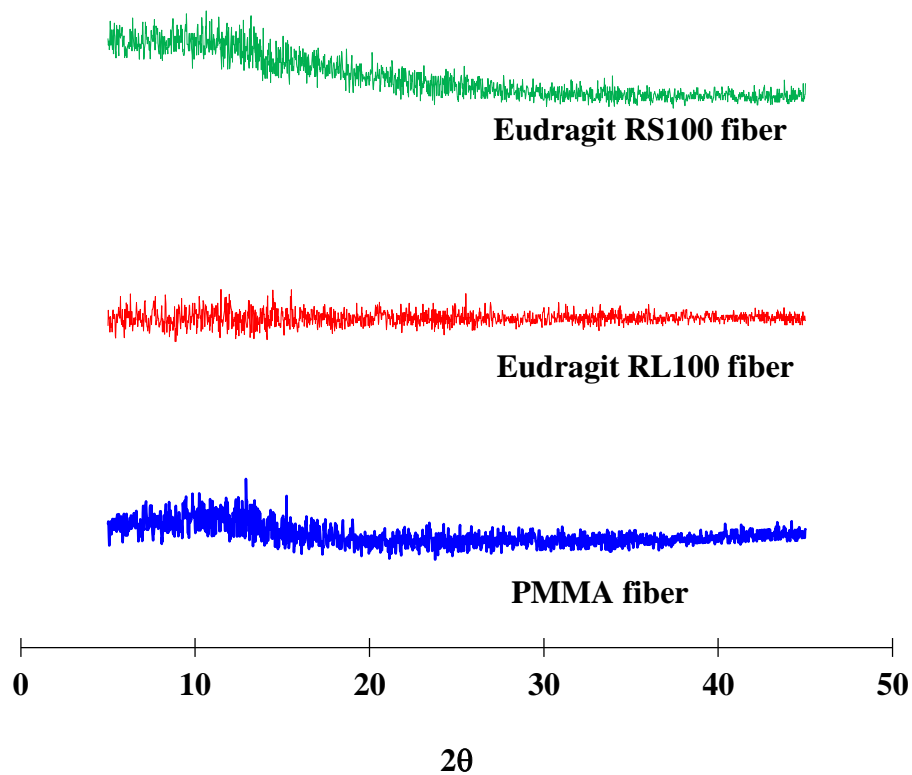
รูปที่ 12 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียว Eudragit[®] RL100 และ Eudragit[®] RL100 powder



รูปที่ 13 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว PMMA และ PMMA powder



รูปที่ 14 FT-IR pattern ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว PMMA, Eudragit[®] RS100 และ Eudragit[®] RL100



รูปที่ 15 XRD pattern ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว PMMA, Eudragit[®] RS100 และ Eudragit[®] RL100

3.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว

ผลการศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติเชิงกลของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว

| เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว | Tensile Stress (MPa) | % Maximum Strain | Young's modulus (MPa) |
|--|----------------------|------------------|-----------------------|
| PMMA | 1.52 ± 0.14 | 18.53 ± 3.29 | 17.69 ± 0.14 |
| Eudragit [®] RS100 | 3.33 ± 0.55 | 18.23 ± 0.12 | 17.21 ± 16.23 |
| Eudragit [®] RL100 | 2.09 ± 0.05 | 25.05 ± 0.12 | 16.17 ± 0.67 |

3.4 ผลการศึกษาการพองตัวของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว

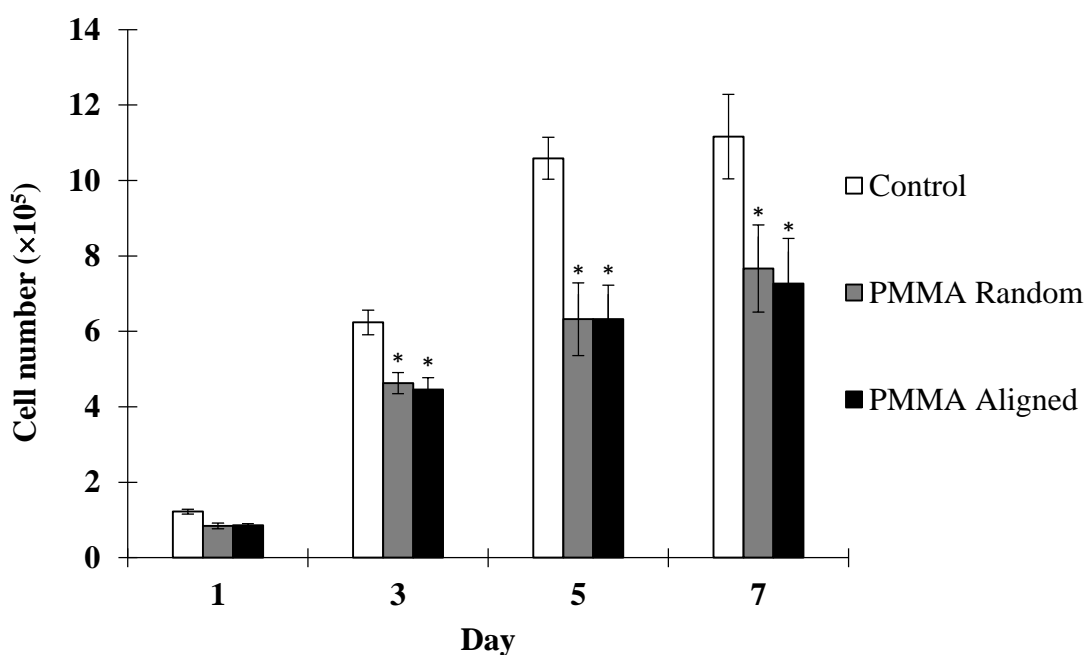
ผลการศึกษาการพองตัวของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดง Degree of swelling (%) ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว

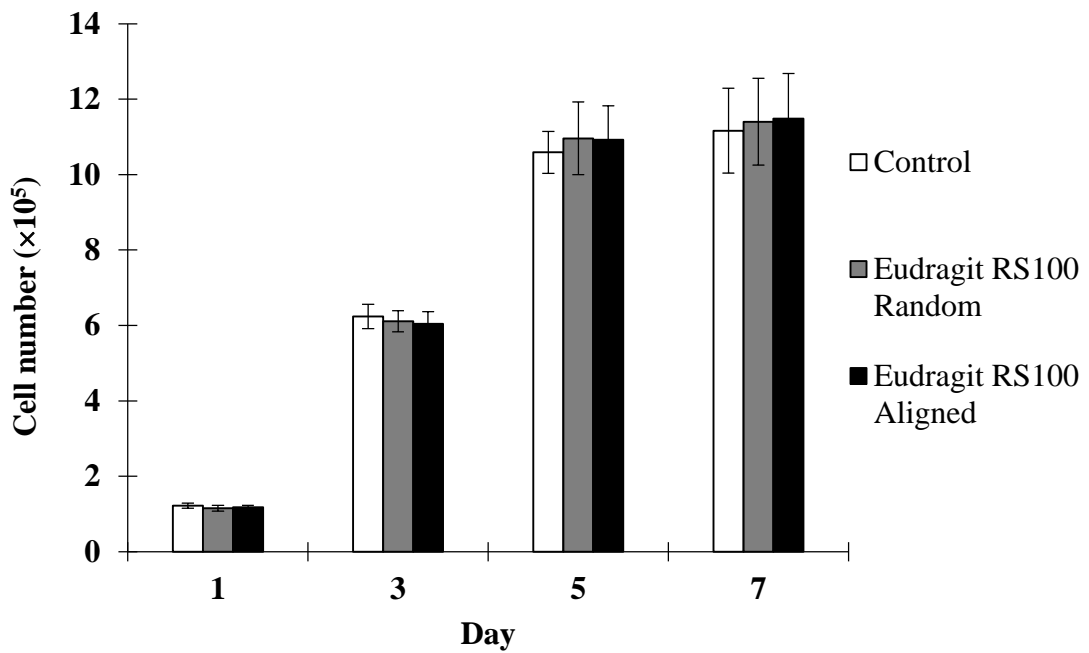
| เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว | Degree of swelling (%) |
|--|------------------------|
| PMMA-120 | 1.12 ± 0.04 |
| Eudragit [®] RS100 | 1.33 ± 0.05 |
| Eudragit [®] RL100 | 1.09 ± 0.05 |

3.5 การศึกษาในเซลล์

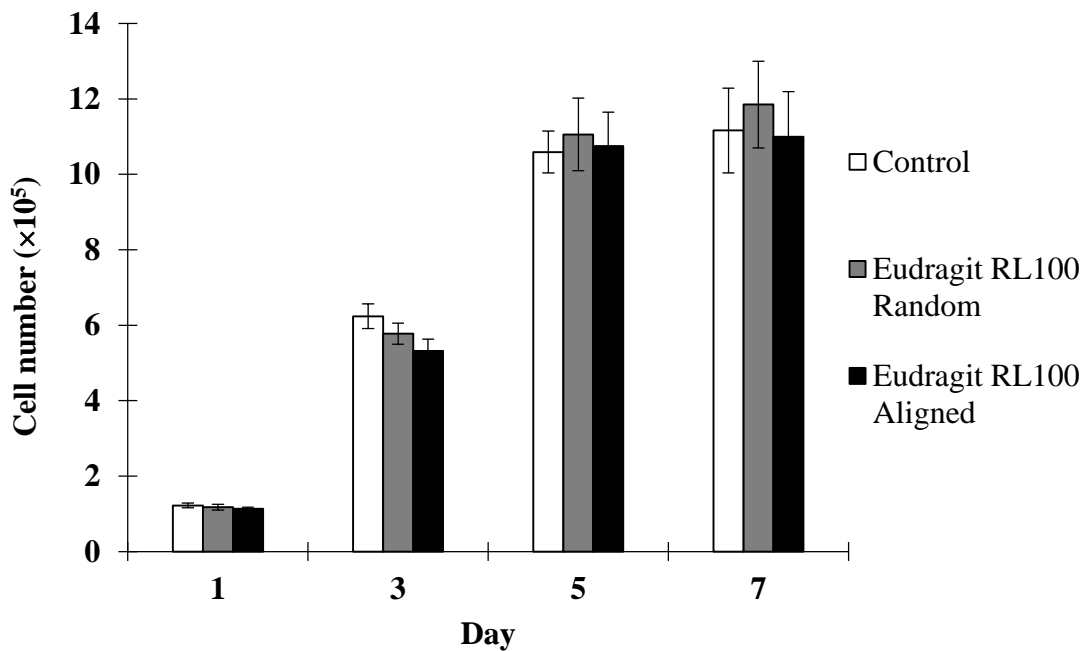
3.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์บนเส้นใย



รูปที่ 16 จำนวนเซลล์ประสาทหนู Schwann cells เซลล์ บนแผ่นแก้ว (control) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม PMMA เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว PMMA (*มีนัยสำคัญทางสถิติ p-value < 0.05)



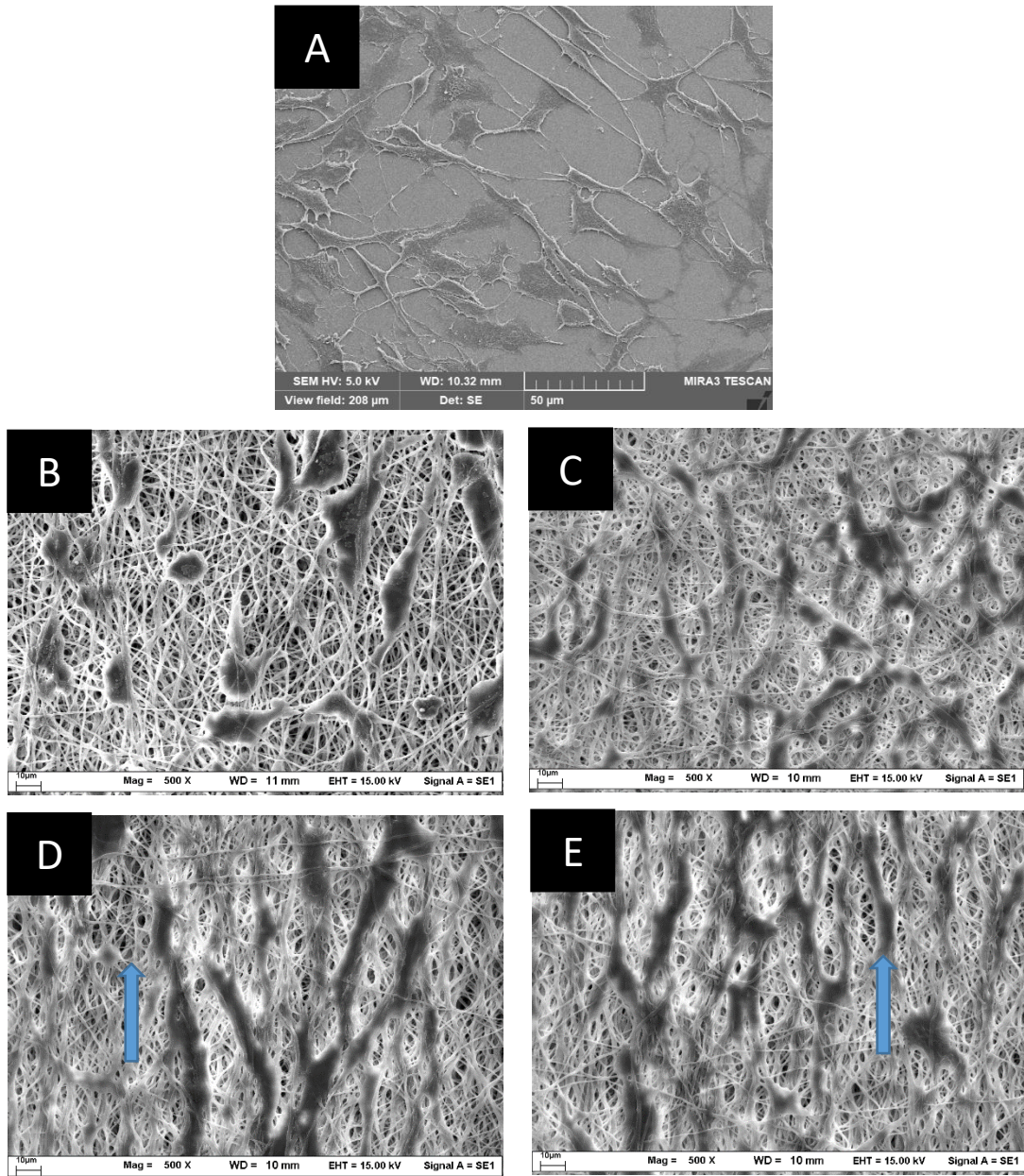
รูปที่ 17 จำนวนเซลล์ประสาทหนู Schwann cells เซลล์ บนแผ่นแก้ว (control) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit[®] RS100 เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit[®] RS100



รูปที่ 18 จำนวนเซลล์ประสาทหนู Schwann cells บนแผ่นแก้ว (control) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit[®] RL100 เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit[®] RL100

3.5.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์บนเส้นใย

ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของ เซลล์ประสาทหนู Schwann cells บนเส้นใย แสดงดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 แสดงรูปร่างของเซลล์ประสาทหนู Schwann cells ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 500x บนแผ่นแก้ว (A) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ป็นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit[®] RS100 (B) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ป็นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit[®] RL100 (C) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ป็นเรียงตัวทางเดียว Eudragit[®] RS100 (D) เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ป็นเรียงตัวทางเดียว Eudragit[®] RL100 (E)

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า สามารถเตรียมเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตร โดยเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวแบบสุ่มและทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 504.82 – 552.19 นาโนเมตร และเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวแบบสุ่มและทางเดียวจาก Eudragit RL100[®] มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 492.06 – 500.10 นาโนเมตร โดยเมื่อปรับความเร็วรอบของส่วนรองรับเพิ่มขึ้นจาก 200 รอบต่อนาทีเป็น 1200 รอบต่อนาที จะทำให้การกระจายขนาดของเส้นใยแคบลง จากการศึกษาของสเปกตรัมการวัดเรียงตัวของเส้นใยพบว่า เมื่อปรับความเร็วรอบของส่วนรองรับเส้นใยเป็น 1200 รอบต่อนาที การกระจายของสเปกตรัมการวัดเรียงตัวอยู่ในช่วงแคบประมาณ 70 ถึง 110 องศา ทั้ง Eudragit RS100[®] และ RL100[®] [21]

ผลการศึกษามุมฟังก์ชันของเส้นใยอิเล็กโตรสปิน พบว่า สเปกตรัมของผง Eudragit RS100[®] Eudragit RL100[®] และ PMMA มี C=O stretching ที่เลขคลื่น 1731 cm⁻¹ และ C-H stretching ที่เลขคลื่น 2998 cm⁻¹ สเปกตรัมของ เส้นใย Eudragit RS100[®] Eudragit RL100[®] และ PMMA มี C=O stretching ที่เลขคลื่น 1731 cm⁻¹ และ C-H stretching ที่เลขคลื่น 2996 cm⁻¹ ซึ่งมีเลขคลื่นที่เหมือนกัน ฉะนั้นจึงสรุปได้ว่า โครงสร้างทางเคมีของ Eudragit RS100[®] และ RL100[®] ไม่ได้ถูกทำลายเมื่อผ่านกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง [29] ผลการทดสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของเส้นใยด้วยเครื่อง Powder X-Ray Diffraction (PXRD) พบว่า เส้นกราฟของ มีลักษณะเป็นแถบกว้าง และไม่พบ diffraction peak เนื่องจากเส้นใยมีรูปเป็นอสัณฐาน (amorphous form)

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทหนูบนเส้นใย Eudragit RS100[®] Eudragit RL100[®] และ PMMA พบเส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ประสาทหนู (Schwann cells) และเจริญเติบโตได้ดีกว่า PMMA เนื่องจากโครงสร้างของ Eudragit RS100[®] และ RL100[®] มีประจุบวกและมีความชอบน้ำ (hydrophilicity) มากกว่า PMMA [29] และเซลล์สามารถเจริญเติบโตทางเดียวตามแนวของเส้นใยอิเล็กโตรสปิน [30] เส้นใยอิเล็กโตรสปินเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®] มีศักยภาพนำไปประยุกต์ใช้เป็นโครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อของเซลล์ประสาทได้

ผลผลิตที่ได้รับจากโครงการวิจัย (Output)

1. ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานสืบเนื่อง งานประชุมวิชาการนานาชาติ (proceeding)

Natthan Charernsriwilaiwat, Anshisa Booranapong, Napat Kebwai, Ry Pagnrith, Thapakorn Charoenying, Praneet Opanasopit. Electrospinning of polymethyl methacrylate for nerve tissue engineering. The 35th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences & CU-MPU International Collaborative Research Conference Proceeding book 71- 74.

2. ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารงานวิจัยระดับนานาชาติ

Natthan Charernsriwilaiwat, Thapakorn Charoenying, Praneet Opanasopit. Electrospinning of Eudragit RS100 for nerve tissue engineering scaffold. Key engineering material (Submitted)



**The 35th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences
& CU-MPU International Collaborative Research Conference**

Electrospinning of polymethyl methacrylate for nerve tissue engineering

Natthan Charernsriwilaiwat^{1,2,*}, Anshisa Booranapong¹, Napat Kebwai¹, Ry Pagnrith¹,
Thapakorn Charoenying¹, Praneet Opanasopit²

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20130, Thailand

² Pharmaceutical Development of Green Innovation Group (PDGIG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

* Corresponding Author: Tel. +66(0)38102610; E-mail address: natthan@go.buu.ac.th

Keywords: Electrospinning, polymethyl methacrylate, nerve tissue engineering

Introduction

Recently, peripheral nerve injuries caused by accidents, resections of tumors or iatrogenic side effects of the surgeries are occurring with up to 500,000 cases each year in Europe and USA¹. Various conventional strategies such as autografts (gold standard), allografts and xenografts are restricted due to the limited donor, immune-rejection or limit such as too wide gap length. Due to these reasons, the synthetic nerve guidance scaffolds are a promising alternative to autograft². The approaches towards the development of biomaterial scaffolds for support of peripheral nerve have increased interest. The biomaterial scaffolds must have desired properties for support cell growth, proliferation and differentiate into tissues³. Electrospinning is a well-known technique to make nanofibrous scaffold for tissue engineering application⁴. The process of electrospinning results from the application of a high voltage electrostatic field operated between a metallic capillary of a syringe and a grounded collector. As a result of this electrostatic field, a solution drop deposited at the tip of the capillary tube elongates into long and thin fibers and projects over the grounded collector. Scaffolds produced by this technique are shown to closely mimic the structure and morphology of native extracellular matrix that consists of fibrillar structures with nanosized diameters. This technique also provides the possibility of producing nanofibrous scaffolds from both synthetics and natural polymers such as poly- ϵ -caprolactone, polyvinyl alcohol, polyethylene oxide, collagen, gelatin and chitosan. The scaffolds produced by electrospinning have been widely reported, once it has been able to direct cell alignment and support cell growth by control the orientation of fibers. In case of nerve cells, the aligned electrospun scaffolds can guide the cell growth parallel on scaffolds. However, there are few reported that used polymethyl methacrylate for nerve tissue engineering. Moreover, little is known about the effect of molecular weight on physical, chemical properties and the cytotoxicity.

In this study, Polymethyl methacrylates MW 120,000 and MW 350,000 fibers were fabricated by electrospinning technique for nerve tissue engineering. The morphology and size distribution of obtained fibers were characterized. The fibers physical and chemical properties are investigated. Finally, the cytotoxicity of PMMA-120 and PMMA-350 were evaluated using MTT assay against rat Schwann cells.

Materials and Methods

Materials: Polymethyl methacrylates MW 120,000 (PMMA-120) and MW 350,000 (PMMA-350) were purchased from Sigma Aldrich. Dimethylformamide (DMF) was purchased from Labscan. Rat Schwann cells (*Rattus norvegicus*) (CRL-2941™) were purchased from American type culture collection (ATCC). All of reagent were analytical grade.

Preparation of PMMA-120 and PMMA-350 fibers:

Briefly, 20 to 25%w/w of PMMA-120 and 13 to 15%w/w of PMMA-350 were dissolved in dimethylformamide (DMF) and then allowing the solution to stir with magnetic bar and magnetic stirrer for 4 h. The solution was taken up in a 5 mL plastic syringe equipped with a 20-gauge, stainless steel needle (diameter = 0.9 mm) at the nozzle. The needle was connected to the emitting electrode of positive polarity of a Gamma High Voltage Research device. The electric potential was fixed at 15 kV. The nanofibers were collected as-spun on an aluminum thin foil that was wrapped on a aluminium plate collector. The solution was electrospun at room temperature, and the collection distance was fixed at 20 cm. The solution feed was driven by a syringe pump, and the feed rate was fixed at 0.25 mL/h. The process duration was fixed at 4 h in each different weight ratios that provide a thickness approximately 20 -30 μm .

Characterization of PMMA-120 and PMMA-350 fibers:

The morphology and size distribution of fibers were observed by scanning electron microscope (SEM LEO 1450VP, EDAX[®], USA) For this process, a small section of the electrospun fibers was sputtered with a thin layer of gold prior to SEM observation. The accelerating voltage was fixed at 15 kV. The diameter of nanofibers was measured using software JmicroVision, collected 100 measurements for each sample.

The chemical structure of these nanofiber mats was characterized by spectra of Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR, Nicolet 4700, Becthai, USA) in the wave number range of 400-4000 cm^{-1} .

The mechanical properties of the nanofiber mats were evaluated using a texture analyzer (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) with a 5 kg load cell equipped with a tensile grips holder. The samples were cut into a rectangular shape (5 mm–25 mm). The thicknesses of these samples ranged from 20–30 μm .

Water contact angles of nanofiber mats were measure using drop shape analyzer (FTA 100, First Ten Angstroms Inc, Portsmouth, VA). A distilled water pendent droplet was injected from a syringe onto the surface of nanofibers. The image of the droplet on the surface was captured through the image analyzer and the angle between the water droplet and the surface was measured.

Indirect cytotoxicity evaluation of PMMA-120 and PMMA-350 fibers:

The fibers of PMMA-120 and PMMA-350 were sterilized by UV radiation for 1 h and were immersed in serum-free medium (SFM; containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 1% L-glutamine, and 1% antibiotic and antimycotic formulation) for 24 h in incubator to produce extraction media of varying concentrations (10, 7.5, 5, 2.5 and 1 mg/ml). Rat Schwann cells were plated in 100 μl of DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum at a density of 8,000 cells/well in 96-well plates. When the cultures reached confluency (typically, 48 h after plating), all tested extraction media at varying concentrations were replaced and cells were re-incubated for 24 h. After treatment, tested extraction solutions were removed. Finally, the cells were incubated with 100 μl MTT containing medium (1 mg/ml) for 4 h. Then the medium was removed, the cells were rinsed with PBS, pH 7.4, and formazan crystals formed in living cells were dissolved in 100 μl DMSO per well. Relative viability (%) was calculated based on the absorbance at 550 nm using a microplate reader (AccuReader[®], Taiwan). Viability of non-treated control cells was arbitrarily defined as 100%.⁵

Results and Discussion

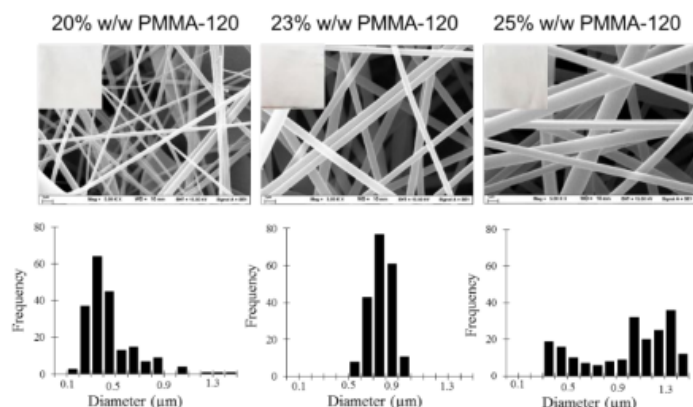


Figure 1
SEM image (5,000x) and diameter distribution of PMMA-120 fibers

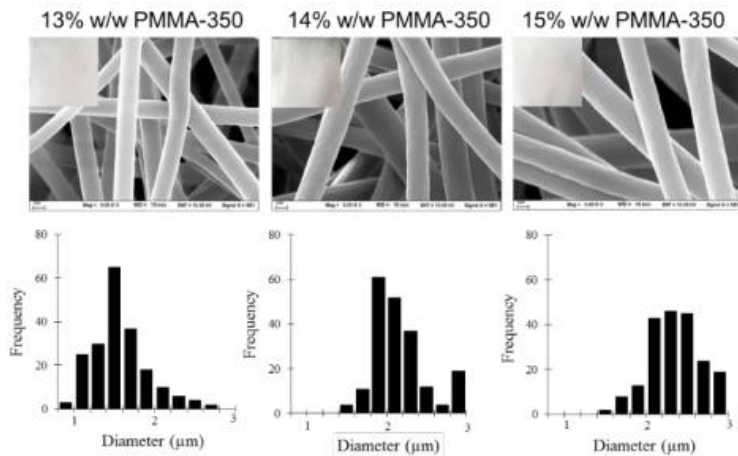


Figure 2
SEM image (5,000x) and diameter distribution of PMMA-350 fibers

Figure 1 and 2 shows the SEM images and diameter distribution of PMMA-120 and PMMA-350 fibers. The average diameter of 20, 23 and 25% w/w PMMA-120 fibers were 0.46 ± 0.24 , 0.76 ± 0.09 and 1.12 ± 0.41 μm , respectively. The average diameter of 13, 14 and 15% w/w PMMA-350 fibers were 1.57 ± 0.33 , 2.17 ± 0.38 and 2.36 ± 0.33 μm , respectively. The bead formation could not observe in nanofibers. This result indicated that the diameter of fibers increases when the concentration of solution increase. The diameter of PMMA-350 fibers was larger than PMMA-120 fibers. Therefore, we selected the 23% w/w PMMA-120 and 14% w/w PMMA-350 for further characterization.

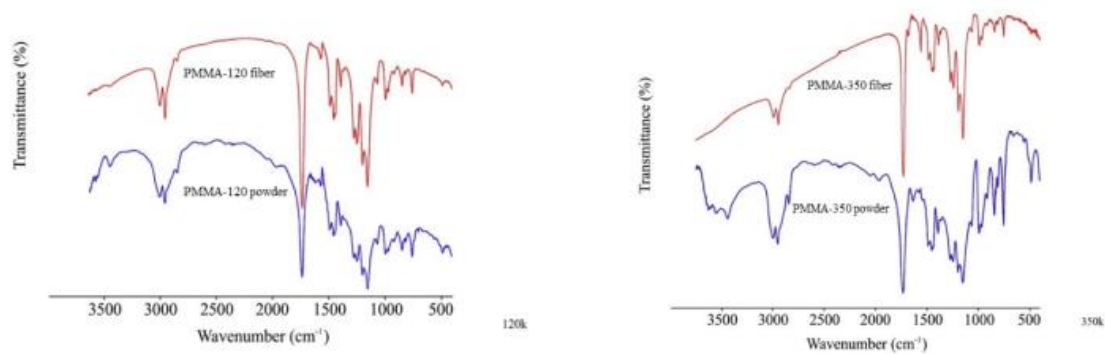


Figure 3 FTIR spectrum of PMMA-120 and PMMA-350 fibers

The FTIR spectrum of PMMA-120 and PMMA-350 fibers shown in figure 3. We found that the spectrum of PMMA -120 and PMMA-350 powders exhibited C=O stretching at 1731 cm^{-1} and C-H stretching at 2998 cm^{-1} . Likewise, the spectrum of PMMA-120 and PMMA-350 fibers exhibited C=O stretching at 1731 cm^{-1} and C-H stretching at 2996 cm^{-1} . This result suggested that the chemical structure of PMMA did not change during the electrospinning process.

The mechanical properties and water contact angle of PMMA-120 and PMMA-350 fibers shown in table 1. The tensile stress, maximum strain and Young's modulus of PMMA-350 fiber were higher than PMMA-120 fiber. It may be because of the diameter of PMMA-350 were two times higher than PMMA-120. The water contact angle of PMMA-350 fibers also higher than PMMA-120 fiber. This result indicated that the PMMA-120 fiber had more hydrophilicity than PMMA-350 fiber.

Table 1 Tensile Stress, % maximum strain, Young's modulus and water contact angle

| Sample | Tensile Stress (MPa) | % Maximum Strain | Young's modulus (MPa) | Water contact angle (θ) |
|----------|----------------------|------------------|-----------------------|----------------------------------|
| PMMA-120 | 1.52 ± 0.14 | 8.53 ± 3.29 | 17.69 ± 0.14 | 99.39 |
| PMMA-350 | 9.33 ± 0.55 | 18.23 ± 0.12 | 217.21 ± 16.23 | 117.61 |

The cytotoxicity of PMMA-120 and PMMA-350 fiber was performed using MTT assay with rat Schwann cells. Figure 4 exhibited the cell viability (%) of various concentration of fiber extract. The cell viability of PMMA-120 and PMMA-350 of 1 to 10 mg/ml did not less than 80%. This results implied that the fiber was not toxic to rat Schwann cells in the range of 1 – 10 mg/ml.

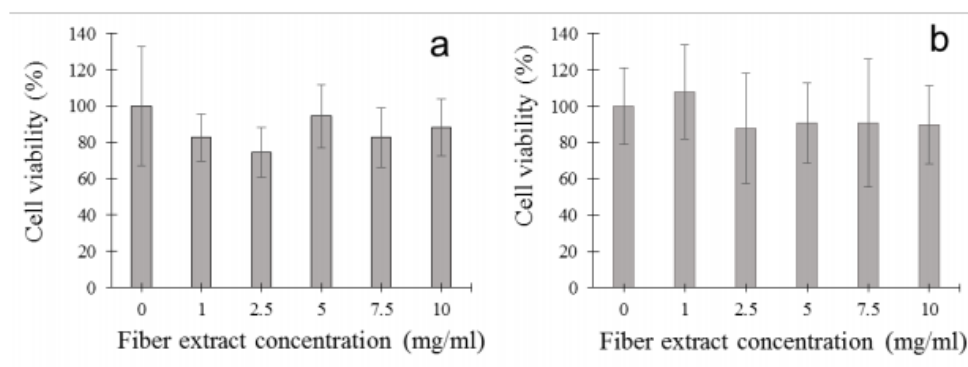


Figure 4 Cell viability (%) of PMMA-120 fiber (a) and PMMA-350 fiber (b)

Conclusion

The PMMA120 and PMMA-350 fiber were successfully fabricated by electrospinning. The results indicated that the diameter of PMMA-120 and PMMA-350 fibers mostly distributed around 0.46 – 1.12 μm and 1.57 – 2.36 μm respectively. The fibers of PMMA had poor wettability, amorphous form and its chemical structure were not destructive after electrospinning process. PMMA fibers established good biocompatibility with Schwann cells. Finally, PMMA fibers have the potential to be used in tissue engineering and may be studied more in the future.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no.206/2561) and through the Research Team Promotion Grant (RTA6180003)

References

1. Kijeńska E, Prabhakaran MP, Swieszkowski W, Kurzydłowski KJ, Ramakrishna S. Interaction of Schwann cells with laminin encapsulated PLCL core-shell nanofibers for nerve tissue engineering. *Eur Polym J.* 2014;50:30-8.
2. Cooper A, Bhattarai N, Zhang M. Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan-PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydr Polym.* 2011;85(1):149-56.
3. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 2014;35(24):6143-56.
4. Sachlos E, Czersuska JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2003;5:29-40.
5. Charemsriwilaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Supaphol P. Preparation and characterization of chitosan-hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. *Carbohydr Polym.* 2010;81:675-80.

รายงานสรุปการเงิน
เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 256109A1080036 สัญญาเลขที่ 206/2561
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้งานเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียวจาก Eudragit RS100[®] และ RL100[®]
สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อเส้นประสาท

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภก.ผศ.ดร. ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2563
ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 200,250 บาท เมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2560

งวดที่ 2 (40%) 160,200 บาท เมื่อวันที่ 6 สิงหาคม พ.ศ. 2561

งวดที่ 3 (10%) 40,050 บาท ยังไม่ได้รับ

รวม 400,500 บาท

รายจ่าย

| รายการ | งบประมาณที่ตั้งไว้ | งบประมาณที่ใช้จริง | จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน |
|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 1. ค่าจ้าง | 40,000 บาท | 40,000 บาท | 0 บาท |
| 2. ค่าตอบแทน | 88,000 บาท | 88,000 บาท | 0 บาท |
| 3. ค่าใช้สอย | 80,000 บาท | 81,180 บาท | เกิน 1180 บาท |
| 4. ค่าวัสดุ | 152,450 บาท | 151,312.74 บาท | ขาด 1137.26บาท |
| 5. ค่าสาธารณูปโภค | 40,050 บาท | 40,050 บาท | 0 บาท |
| รวม | 400,500 บาท | 400,542.74 บาท | เกิน 42.74 บาท |

(ภก.ผศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

1. Kijeńska, E., et al., Interaction of Schwann cells with laminin encapsulated PLCL core-shell nanofibers for nerve tissue engineering. *European Polymer Journal*, 2014. 50: p. 30-38.
2. Cooper, A., N. Bhattarai, and M. Zhang, Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan-PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 2011. 85(1): p. 149-156.
3. Gu, X., F. Ding, and D.F. Williams, Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 2014. 35(24): p. 6143-56.
4. Sachlos, E. and J.T. Czernuszka, Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*, 2003. 5: p. 29-40.
5. Zhang, L. and T.J. Webster, Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, 2009. 4(1): p. 66-80.
6. Marais, E., et al., Eudragit(R) L100/N-trimethylchitosan chloride microspheres for oral insulin delivery. *Molecules*, 2013. 18(6): p. 6734-47.
7. Xia, H., et al., Directed neurite growth of rat dorsal root ganglion neurons and increased colocalization with Schwann cells on aligned poly(methyl methacrylate) electrospun nanofibers. *Brain Res*, 2014. 1565: p. 18-27.
8. Alvarez, Z., et al., An efficient and reproducible method to culture Bergmann and cortical radial glia using textured PMMA. *J Neurosci Methods*, 2014. 232: p. 93-101.
9. Shen, X., et al., Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit(R) L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. *Int J Pharm*, 2011. 408(1-2): p. 200-7.
10. Jagur-Grodzinski, J., Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. *Polymers for Advanced Technologies*, 2006. 17(6): p. 395-418.
11. Cao, H., T. Liu, and S.Y. Chew, The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. 61(12): p. 1055-64.
12. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, et al. *An Introduction to Electrospinning and Nanofiber* : Toh Tuck Link : Singapore: World Scientific Publishing, 2005: 1-42.
13. Zhang L., Menkhaus T.J., Fong H. Fabrication and bioseparation studies of adsorptive membranes/felts. *Journal of Membrane Science*. 2008(319) 176-184.

14. Huang ZM, Zhang YZ and Kotaki M, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2003; 63: 2223–53.
15. Geert Verreck, Iksoo Chun, Joel Rosenblatt, Jef Peeters, Alex Van Dijck, Jurgen Mensch, et al. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *Journal of Controlled Release* 2003 (92) 349-360.
16. Schulte J. *Nanotechnology global strategies, industry trend and applications Great Britain* :TJ International, 2005.
17. Sill TJ and von Recum HA. Electrospinning: Application in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 1989-2006.
18. Rutledge GC and Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 1384–91.
19. Zhang YZ, Su B, Venugopal J, Ramakrishna S, Lim CT. Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers. *International Journal of Nanomedicine* 2007;2: 623–638.
20. บทความนาโน. นาโนไฟเบอร์ (Nanofiber) ความหวังใหม่ในการซ่อมแซมเซลล์สมอง (on line). Available at <http://www.thai-nano.com>. (August 2008).
21. Vasita R and Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* 2006; 1(1): 15–30.
22. Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, Roh S, Cho JJ, Park WH, Min BM. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8):1452-61.
23. Merrell JG, McLaughlin SW, Tie L, Laurencin CT, Chen AF, Nair LS. Curcumin Loaded Poly(epsilon-Caprolactone) Nanofibers: Diabetic Wound Dressing with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 May 19.
24. Opanasopit P, Ruktanonchai U, Suwanton O, Panomsuk S, Ngawhirunpat T, Sittisombut C, Suksamran T, Supaphol P. Electrospun poly(vinyl alcohol) fiber mats as carriers for extracts from the fruit hull of mangosteen. *J Cosmet Sci*. 2008; 59: 233-242.
25. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 2010. 30(8): p. 1129-1136.
26. Yang, F., et al., Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 2005. 26(15): p. 2603-10.

27. Prabhakaran, M.P., et al., Electrospun conducting polymer nanofibers and electrical stimulation of nerve stem cells. *J Biosci Bioeng*, 2011. 112(5): p. 501-7.
28. Lee, J.Y., et al., Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*, 2009. 30(26): p. 4325-35.
29. Pornsopone, V., et al., Electrospinning of methacrylate-based copolymers: Effects of solution concentration and applied electrical potential on morphological appearance of as-spun fibers. *Polymer Engineering and Science*, 2005. 45(8): p. 1073-1080.
30. 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.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit® RS100

| Diameter (nm) | | | | | Range (nm) | Frequency |
|---------------|--------|--------|--------|---------|------------|-----------|
| 282.84 | 399.92 | 449.44 | 486.62 | 597.32 | 0-100 | 0 |
| 310.09 | 399.92 | 450.59 | 492.55 | 602.02 | 101-200 | 0 |
| 316.17 | 404.30 | 451.41 | 500.00 | 612.21 | 201-300 | 1 |
| 337.35 | 404.47 | 454.80 | 501.06 | 615.69 | 301-400 | 21 |
| 342.44 | 415.95 | 457.11 | 504.12 | 622.90 | 401-500 | 41 |
| 346.69 | 420.00 | 460.43 | 516.02 | 653.00 | 501-600 | 18 |
| 356.09 | 420.00 | 461.51 | 517.66 | 654.13 | 601-700 | 11 |
| 368.40 | 422.20 | 461.74 | 519.59 | 655.32 | 701-800 | 2 |
| 372.03 | 424.18 | 465.19 | 524.90 | 661.72 | 801-900 | 3 |
| 373.06 | 426.99 | 466.48 | 528.02 | 676.76 | 901-1000 | 3 |
| 373.39 | 430.03 | 466.90 | 533.39 | 690.44 | Mean | 504.83 |
| 373.63 | 430.03 | 474.25 | 534.32 | 699.71 | SD | 141.77 |
| 374.61 | 431.74 | 474.25 | 545.89 | 752.22 | | |
| 376.65 | 434.04 | 474.96 | 550.69 | 792.90 | | |
| 377.16 | 440.45 | 475.39 | 560.36 | 820.00 | | |
| 380.72 | 443.98 | 475.39 | 560.67 | 856.79 | | |
| 382.10 | 446.05 | 477.08 | 569.21 | 869.65 | | |
| 384.19 | 447.13 | 482.31 | 570.80 | 913.61 | | |
| 384.71 | 447.21 | 484.28 | 583.10 | 946.27 | | |
| 395.98 | 447.21 | 484.28 | 593.44 | 1006.27 | | |

ตารางที่ 2 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit® RS100

| Diameter (nm) | | | | | Range (nm) | Frequency |
|---------------|--------|--------|--------|--------|------------|-----------|
| 257.90 | 487.03 | 540.37 | 576.68 | 628.01 | 0-100 | 0 |
| 280.74 | 490.59 | 541.48 | 577.02 | 632.33 | 101-200 | 0 |
| 305.94 | 491.76 | 546.91 | 579.34 | 635.06 | 201-300 | 2 |
| 342.34 | 491.76 | 549.02 | 584.12 | 638.12 | 301-400 | 7 |
| 347.45 | 496.43 | 550.42 | 585.49 | 640.19 | 401-500 | 17 |
| 353.49 | 499.13 | 551.72 | 588.56 | 645.60 | 501-600 | 45 |
| 373.06 | 504.12 | 552.16 | 588.56 | 647.36 | 601-700 | 23 |
| 380.00 | 508.67 | 553.17 | 589.87 | 649.00 | 701-800 | 4 |
| 397.03 | 509.05 | 553.55 | 593.63 | 649.14 | 801-900 | 1 |
| 412.23 | 509.90 | 554.94 | 597.64 | 649.73 | 901-1000 | 1 |
| 421.90 | 510.18 | 557.70 | 600.33 | 659.13 | Mean | 552.20 |
| 440.63 | 511.08 | 560.36 | 604.04 | 660.30 | SD | 104.70 |
| 474.25 | 511.31 | 560.80 | 605.31 | 662.12 | | |
| 475.39 | 513.19 | 561.48 | 607.84 | 672.01 | | |
| 480.00 | 515.80 | 563.21 | 609.11 | 707.11 | | |
| 480.83 | 517.66 | 568.63 | 610.57 | 723.37 | | |
| 481.66 | 519.15 | 568.97 | 612.57 | 747.42 | | |
| 482.29 | 527.96 | 569.98 | 625.61 | 753.13 | | |
| 485.07 | 528.02 | 574.01 | 627.45 | 822.92 | | |
| 485.47 | 530.86 | 576.68 | 627.76 | 919.06 | | |

ตารางที่ 3 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit® RL100

| Diameter (nm) | | | | | Range (nm) | Frequency |
|---------------|--------|--------|--------|--------|------------|-----------|
| 282.79 | 416.17 | 470.74 | 508.67 | 569.98 | 0-100 | 0 |
| 288.44 | 419.17 | 471.40 | 509.05 | 569.98 | 101-200 | 0 |
| 291.49 | 421.90 | 472.22 | 509.90 | 569.98 | 201-300 | 3 |
| 306.91 | 423.79 | 473.84 | 513.19 | 580.34 | 301-400 | 12 |
| 320.62 | 424.18 | 475.39 | 514.20 | 587.58 | 401-500 | 42 |
| 349.86 | 428.24 | 477.48 | 514.68 | 590.59 | 501-600 | 29 |
| 360.49 | 434.04 | 480.69 | 526.12 | 608.16 | 601-700 | 12 |
| 360.49 | 435.36 | 482.29 | 526.13 | 608.28 | 701-800 | 2 |
| 360.56 | 436.81 | 484.15 | 526.86 | 624.07 | 801-900 | 0 |
| 374.61 | 439.09 | 487.05 | 526.86 | 626.42 | 901-1000 | 0 |
| 379.47 | 440.63 | 490.20 | 527.96 | 632.94 | Mean | 492.06 |
| 396.54 | 442.37 | 490.31 | 528.39 | 632.94 | SD | 95.28 |
| 397.03 | 447.21 | 496.04 | 538.41 | 645.60 | | |
| 399.92 | 447.56 | 496.04 | 540.91 | 651.79 | | |
| 400.00 | 449.44 | 499.90 | 549.18 | 667.82 | | |
| 404.23 | 456.95 | 499.90 | 552.16 | 667.82 | | |
| 404.97 | 457.75 | 499.90 | 554.94 | 670.82 | | |
| 412.23 | 457.75 | 501.06 | 563.21 | 695.46 | | |
| 412.23 | 464.83 | 504.78 | 564.56 | 720.97 | | |
| 415.95 | 468.61 | 506.36 | 568.97 | 729.72 | | |

ตารางที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit® RL100

| Diameter (nm) | | | | | Range (nm) | Frequency |
|---------------|--------|--------|--------|--------|------------|-----------|
| 324.32 | 418.85 | 480.32 | 529.37 | 577.95 | 0-100 | 0 |
| 325.58 | 420.48 | 480.42 | 530.61 | 580.34 | 101-200 | 0 |
| 333.65 | 420.73 | 484.70 | 531.00 | 580.47 | 201-300 | 0 |
| 338.22 | 420.73 | 490.21 | 531.00 | 583.69 | 301-400 | 15 |
| 340.00 | 424.26 | 490.22 | 534.13 | 584.40 | 401-500 | 37 |
| 352.67 | 432.92 | 491.38 | 541.48 | 584.51 | 501-600 | 36 |
| 362.22 | 433.70 | 491.38 | 548.95 | 590.72 | 601-700 | 11 |
| 367.35 | 436.28 | 493.61 | 551.74 | 592.19 | 701-800 | 0 |
| 379.47 | 439.61 | 493.61 | 551.74 | 601.02 | 801-900 | 1 |
| 384.71 | 440.00 | 494.77 | 553.17 | 601.66 | 901-1000 | 0 |
| 384.71 | 450.83 | 494.77 | 554.51 | 605.75 | Mean | 500.10 |
| 388.29 | 450.83 | 500.31 | 557.03 | 612.24 | SD | 93.62 |
| 392.35 | 456.51 | 501.20 | 561.05 | 619.58 | | |
| 398.50 | 456.98 | 504.78 | 568.19 | 621.29 | | |
| 400.00 | 459.07 | 508.28 | 568.19 | 630.34 | | |
| 407.92 | 461.16 | 516.14 | 571.22 | 639.06 | | |
| 408.67 | 465.19 | 520.59 | 571.22 | 656.05 | | |
| 410.71 | 465.38 | 521.54 | 572.01 | 659.41 | | |
| 412.31 | 470.74 | 521.54 | 576.89 | 680.13 | | |
| 415.16 | 473.89 | 523.45 | 577.59 | 900.04 | | |

ตารางที่ 5 องศาการจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit[®] RS100

| Degree | | | | | Range (degree) | Frequency |
|--------|-------|-------|--------|--------|-------------------|-----------|
| 0.00 | 33.69 | 68.63 | 99.46 | 125.54 | 0-10 | 7 |
| 4.97 | 34.38 | 69.15 | 99.87 | 126.87 | 11-20 | 6 |
| 5.53 | 35.84 | 71.57 | 101.31 | 128.16 | 21-30 | 4 |
| 7.13 | 43.15 | 72.90 | 101.89 | 128.37 | 31-40 | 6 |
| 7.59 | 45.00 | 77.91 | 102.88 | 128.66 | 41-50 | 4 |
| 8.13 | 45.91 | 78.69 | 103.39 | 128.93 | 51-60 | 5 |
| 8.97 | 47.12 | 80.54 | 103.50 | 135.00 | 61-70 | 10 |
| 10.30 | 51.34 | 81.47 | 104.62 | 140.19 | 71-80 | 4 |
| 11.89 | 51.34 | 81.87 | 105.26 | 145.18 | 81-90 | 9 |
| 12.26 | 54.90 | 84.09 | 105.52 | 145.84 | 91-100 | 7 |
| 14.47 | 56.31 | 85.43 | 108.43 | 147.38 | 101-110 | 9 |
| 17.65 | 59.04 | 86.99 | 111.37 | 148.24 | 111-120 | 5 |
| 18.43 | 61.56 | 87.27 | 112.25 | 149.66 | 121-130 | 10 |
| 23.20 | 62.10 | 87.40 | 112.83 | 150.26 | 131-140 | 1 |
| 24.62 | 63.43 | 90.00 | 116.57 | 153.43 | 141-150 | 7 |
| 24.62 | 64.80 | 92.12 | 119.74 | 154.54 | 151-160 | 2 |
| 29.74 | 65.70 | 96.01 | 120.26 | 166.37 | 161-170 | 3 |
| 30.07 | 65.77 | 97.43 | 120.96 | 166.76 | 171-180 | 1 |
| 30.58 | 67.75 | 97.43 | 124.38 | 167.32 | | |
| 32.47 | 67.83 | 98.43 | 125.54 | 174.05 | | |

ตารางที่ 6 องศาการจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit[®] RS100

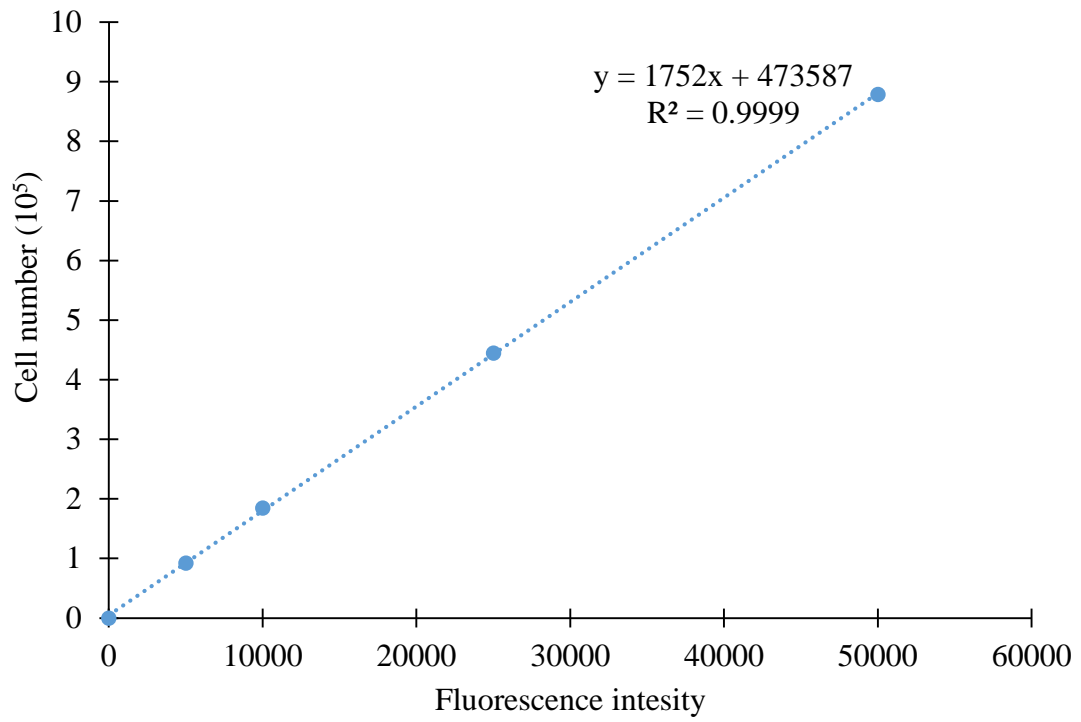
| Degree | | | | | Range (degree) | Frequency |
|--------|-------|-------|--------|--------|-------------------|-----------|
| 0.00 | 74.58 | 86.82 | 94.51 | 117.35 | 0-10 | 0 |
| 24.62 | 75.47 | 86.99 | 96.71 | 119.74 | 11-20 | 0 |
| 25.02 | 76.50 | 87.27 | 97.59 | 120.58 | 21-30 | 3 |
| 28.74 | 77.47 | 88.03 | 97.85 | 122.20 | 31-40 | 1 |
| 32.20 | 77.91 | 88.09 | 98.75 | 122.28 | 41-50 | 0 |
| 53.47 | 77.91 | 88.09 | 99.09 | 123.18 | 51-60 | 6 |
| 54.69 | 78.93 | 88.21 | 99.16 | 125.75 | 61-70 | 5 |
| 56.31 | 79.29 | 90.00 | 100.89 | 126.47 | 71-80 | 13 |
| 57.17 | 79.88 | 90.00 | 101.31 | 127.30 | 81-90 | 23 |
| 57.38 | 80.22 | 90.00 | 104.04 | 128.05 | 91-100 | 15 |
| 57.99 | 81.12 | 90.00 | 105.07 | 128.99 | 101-110 | 7 |
| 63.43 | 81.25 | 90.00 | 106.19 | 129.81 | 111-120 | 8 |
| 64.06 | 82.15 | 91.74 | 106.50 | 133.36 | 121-130 | 10 |
| 67.07 | 82.87 | 91.74 | 109.18 | 135.00 | 131-140 | 4 |
| 67.25 | 83.42 | 91.91 | 112.25 | 136.47 | 141-150 | 1 |
| 69.78 | 84.56 | 92.05 | 113.50 | 138.99 | 151-160 | 1 |
| 72.18 | 84.81 | 92.20 | 113.50 | 148.39 | 161-170 | 0 |
| 73.07 | 85.24 | 92.29 | 113.96 | 152.45 | 171-180 | 1 |
| 73.61 | 85.76 | 94.09 | 115.02 | 163.50 | | |
| 74.36 | 85.76 | 94.40 | 116.57 | 168.69 | | |

ตารางที่ 7 องค์การจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวแบบสุ่ม Eudragit[®] RL100

| Degree | | | | | Range (degree) | Frequency |
|--------|-------|-------|--------|--------|-------------------|-----------|
| 7.77 | 62.35 | 79.70 | 100.78 | 120.58 | 0-10 | 1 |
| 16.70 | 63.43 | 80.13 | 101.77 | 121.33 | 11-20 | 2 |
| 18.43 | 63.43 | 80.13 | 102.80 | 122.01 | 21-30 | 2 |
| 20.85 | 64.65 | 81.87 | 105.64 | 122.91 | 31-40 | 3 |
| 26.57 | 65.56 | 83.83 | 106.19 | 123.11 | 41-50 | 6 |
| 30.96 | 66.80 | 84.56 | 106.19 | 123.69 | 51-60 | 5 |
| 38.29 | 67.62 | 86.05 | 106.19 | 123.69 | 61-70 | 10 |
| 40.10 | 69.15 | 86.42 | 108.43 | 125.22 | 71-80 | 14 |
| 43.53 | 69.68 | 88.03 | 111.50 | 131.63 | 81-90 | 7 |
| 45.00 | 70.71 | 90.00 | 112.38 | 133.73 | 91-100 | 10 |
| 45.00 | 70.82 | 91.97 | 115.56 | 135.00 | 101-110 | 8 |
| 45.00 | 71.57 | 93.37 | 115.56 | 146.31 | 111-120 | 12 |
| 46.55 | 71.57 | 93.37 | 115.56 | 146.31 | 121-130 | 8 |
| 48.18 | 72.26 | 93.95 | 115.71 | 147.09 | 131-140 | 3 |
| 50.19 | 75.38 | 96.01 | 116.57 | 160.35 | 141-150 | 3 |
| 50.91 | 76.50 | 96.12 | 117.41 | 164.05 | 151-160 | 1 |
| 53.13 | 77.74 | 96.91 | 117.55 | 164.05 | 161-170 | 2 |
| 56.31 | 78.23 | 98.53 | 118.30 | 173.88 | 171-180 | 3 |
| 56.89 | 78.69 | 98.75 | 119.48 | 177.27 | | |
| 61.19 | 79.70 | 99.09 | 120.07 | 178.15 | | |

ตารางที่ 8 องศาการจัดเรียงของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นเรียงตัวทางเดียว Eudragit® RL100

| Degree | | | | | Range (degree) | Frequency |
|--------|-------|-------|--------|--------|-------------------|-----------|
| 25.02 | 77.91 | 90.00 | 96.58 | 108.43 | 0-10 | 0 |
| 36.47 | 78.69 | 90.00 | 97.13 | 108.43 | 11-20 | 0 |
| 50.91 | 79.22 | 90.00 | 97.13 | 108.43 | 21-30 | 1 |
| 52.43 | 79.38 | 90.00 | 98.13 | 109.03 | 31-40 | 1 |
| 53.13 | 81.03 | 90.00 | 98.43 | 109.29 | 41-50 | 0 |
| 53.13 | 81.87 | 91.97 | 98.97 | 109.80 | 51-60 | 9 |
| 54.46 | 82.87 | 92.05 | 100.01 | 110.14 | 61-70 | 3 |
| 57.38 | 83.88 | 92.12 | 100.12 | 111.80 | 71-80 | 10 |
| 57.99 | 84.09 | 92.39 | 100.78 | 111.80 | 81-90 | 21 |
| 57.99 | 84.81 | 92.39 | 101.63 | 115.46 | 91-100 | 23 |
| 59.04 | 85.76 | 92.73 | 101.77 | 116.57 | 101-110 | 19 |
| 60.95 | 86.31 | 92.86 | 101.77 | 118.61 | 111-120 | 5 |
| 61.19 | 86.99 | 93.37 | 102.26 | 122.47 | 121-130 | 6 |
| 62.45 | 87.14 | 93.90 | 102.53 | 122.47 | 131-140 | 2 |
| 73.50 | 87.71 | 94.57 | 104.04 | 123.69 | 141-150 | 0 |
| 74.74 | 87.80 | 94.57 | 104.04 | 123.69 | 151-160 | 0 |
| 75.96 | 87.80 | 95.19 | 104.04 | 126.47 | 161-170 | 0 |
| 76.43 | 88.03 | 95.71 | 104.04 | 129.81 | 171-180 | 2 |
| 77.74 | 90.00 | 95.91 | 105.42 | 132.14 | | |
| 77.91 | 90.00 | 96.34 | 107.53 | 133.45 | | |



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ประสาทเทียบกับค่าความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนต์