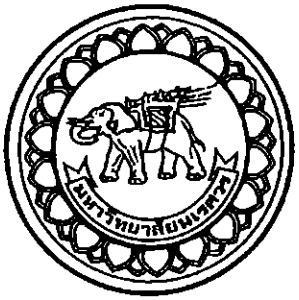


การพัฒนาหลอดลมสุกรปราศจากเซลล์ด้วยเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้สารเคมี

DEVELOPMENT OF ACELLULAR PORCINE TRACHEA USING PERIODIC PRESSURIZED INCORPORATED WITH CHEMICAL TREATMENT

นางสาวบุษกร เสนานุช รหัส 53364789

นายพันธกานต์ จันพินิจ รหัส 53364796

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2556

ห้องสมุดคณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่รับ 20 ก.ค. 2559
เลขทะเบียน 1689691
เลขเรียกหนังสือ ปร.
มหาวิทยาลัยนเรศวร ป 672.9 2556

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน การพัฒนาหลอดลมสุกรปราศจากเซลล์ด้วยเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้สารเคมี

ผู้ดำเนินโครงงาน นางสาวบุษกร เสนานุช รหัส 53364789

นายพันธกานต์ จันพินิจ รหัส 53364796

ที่ปรึกษาโครงงาน ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ภาควิชา วิศวกรรมอุตสาหการ

ปีการศึกษา 2556

.....

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

.....ที่ปรึกษาโครงงาน

(ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์)

.....กรรมการ

(ดร.นพวรรณ โม้ทอง)

.....กรรมการ

(ดร.ภมรรัตน์ จันธรรม)

.....กรรมการ

(ดร.นิคม กลมเกลี้ยง)

.....กรรมการ

(อาจารย์อาภาภรณ์ จันทร์ปิรักษ์)

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การพัฒนาหลอดลมสุกรปราศจากเซลล์ด้วยเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้สารเคมี			
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวบุษกร	เสนานุช	รหัส	53364789
	นายพันธกานต์	จันพินิจ	รหัส	53364796
ที่ปรึกษาโครงงาน	ดร.อิศราวุธ	ประเสริฐสังข์		
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี			
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ			
ปีการศึกษา	2556			

ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

หลอดลมเทียมเป็นวัสดุทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่มีความต้องการมากทางการแพทย์ หลอดลมปราศจากเซลล์เป็นอีกหนึ่งวัสดุที่สามารถใช้งานเป็นหลอดลมเทียมได้ โดยส่วนใหญ่แล้วหลอดลมปราศจากเซลล์ถูกผลิตขึ้นโดยกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารเคมีหรือเอนไซม์เพียงอย่างเดียว ซึ่งพบว่ากระบวนการดังกล่าวสามารถกำจัดเซลล์ได้น้อยและใช้เวลาในการกำจัดเซลล์เป็นเวลานาน ส่งผลให้โครงสร้างของหลอดลมถูกทำลายด้วยการกัดกร่อนของสารเคมีหรือเอนไซม์ ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้ทำการพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกรโดยใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้สารเคมีขึ้น โดยในการทดลองได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างในการทดลองเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน กลุ่มที่ 1 ทำการทดลองโดยปั่นกวนในสารละลายไตรตันเอกซ์ 100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (1% Triton X-100/0.1% Ammonium Hydroxide) เพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ 2 ทำการทดลองโดยใช้การปั่นกวนในสารละลายไตรตันเอกซ์ 100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงด้วยจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน 6 รอบต่อชั่วโมง และกลุ่มที่ 3 ทำการทดลองโดยใช้การปั่นกวนในสารละลายไตรตันเอกซ์ 100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงด้วยจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน 12 รอบต่อชั่วโมง จากการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าโครงสร้างของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการ

ปั่นกวนร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงยังมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่น เนื่องจากพบเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินอยู่จำนวนมาก อีกทั้งแสดงให้เห็นว่าสามารถกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมได้มาก จากผลการวิเคราะห์ความแข็งแรงของโครงสร้างโดยใช้เทคนิคการกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสงช่วงแสงอินฟราเรด (FT-IR) ในการตรวจสอบสมบัติทางเคมีของคอลลาเจน พบว่าการปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน จึงไม่ส่งผลต่อสมบัติเชิงกลหรือความแข็งแรงของหลอดลม จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์หลอดลมสุกร

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา แนะนำวิธีแก้ปัญหา รวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความดูแลเอาใจใส่ ติดตามการดำเนินโครงงานมาโดยตลอด และขอขอบคุณคณะอาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่ได้ให้วิชาความรู้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

นอกจากนี้ ยังต้องขอขอบคุณสถานที่ห้องปฏิบัติการเคมี ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรและคุณนภดล ยิ้มน้อย และบริษัท dosem24hr ที่ให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ผล เพื่อใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้ดำเนินโครงงานใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้การดูแล อบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ตลอดการดำเนินโครงงานจนสำเร็จการศึกษา

ผู้ดำเนินโครงงาน
นางสาวบุษกร เสนานุช
นายพันธกานต์ จันพินิจ

ธันวาคม 2556

สารบัญ

หน้า

ใบรับรองปริญญานิพนธ์ ..... ก
บทคัดย่อ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานโครงงาน 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน 3
1.3 ขอบเขตการดำเนินโครงงาน 3
1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน 3
1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน 3
1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน 4

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีเบื้องต้น 5
2.1 หลอดลม 5
2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ 11
2.3 หลอดลมเทียม 11
2.4 หลอดลมสุกร 13
2.5 กระบวนการในการกำจัดเซลล์ 14
2.6 เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง 21
2.7 เทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง 22
2.8 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด 25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีเบื้องต้น 5

2.9 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) 27

2.10 เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปคโตรสโคปี 31

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 31

บทที่ 3 วิธีการดำเนินโครงงาน 37

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 37

3.2 วิธีการทดลอง 37

3.3 การวิเคราะห์ 41

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ 44

4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานของหลอดลมสุกร 44

4.2 การวิเคราะห์ลักษณะเซลล์ที่พบภายในหลอดลมสุกร 47

4.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของหลอดลมสุกร 49

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ของหลอดลมสุกร 50

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 57

5.1 สรุปผลการทดลอง 57

5.2 ข้อเสนอแนะ 57

เอกสารอ้างอิง 58

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ขั้นตอนและแผนดำเนินโครงงาน....4

2.1 แสดงอุณหภูมิจุดสมดุลสถานะ (Triple Point)....24

2.2 ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่าง....28

4.1 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน....50

4.2 แสดงสภาวะในการทดลอง....53

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กายวิภาคของหลอดลม 7

2.2 แสดงลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดลม 8

2.3 หลอดลมเทียมที่หุ้มด้วยเซลล์ต้นกำเนิดของตัวผู้ป่วยเอง 13

2.4 แสดงลักษณะของหลอดลมสุกร 14

2.5 ภาพตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการการกำจัดเซลล์ 19

2.6 ปริมาณของดีเอ็นเอที่เหลือ 20

2.7 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันที่ 4 บาร์ ที่จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง 22

2.8 แผนภาพ Phase Diagram 23

2.9 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง SEM 26

3.1 แผนภาพขั้นตอนการทดลอง 38

3.2 หลอดลมสุกรอายุ 3–4 เดือน 39

3.3 ก) ขั้นตอนการกำจัดพังผืดออกจากหลอดลมสุกร ข) หลอดลมสุกรที่ผ่านการกำจัดพังผืด 39

3.4 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง 40

3.5 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ 4 บาร์ จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง 41

3.6 ก) หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ข) หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง 41

3.7 ก) หลอดลมสุกรที่ผ่านการทำแห้งแล้วตัดให้มีขนาดพอดีกับสตับ
ข) นำไปฉาบเคลือบทองร้อยละ 99.99 42

3.8 แสดงบริเวณที่ทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด 42

4.1 แสดงภาพถ่ายบริเวณด้านข้างของเนื้อเยื่อหลอดลมสุกรจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 200 เท่า 44

4.2 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 50 เท่า 45

4.3 แสดงการเปรียบเทียบภาพ C3-A C3-B และ C3-C 47

4.4 แสดงการเปรียบเทียบภาพ C2-A กับ C2-C 47

4.5 แสดง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน (Type I Collagen) 50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.6 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่พบอยู่ในหลอดลมสุกร.....51

4.7 แสดงแผนภูมิเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่พบในหลอดลมสุกรเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ 1.....54

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงาน

หลอดลม (Trachea) เป็นอวัยวะที่มีหน้าที่สำคัญที่สุดในระบบทางเดินหายใจ คือ หน้าที่นำส่งอากาศจากภายนอกร่างกายเข้าสู่ปอดเพื่อทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนเข้าสู่เลือดและนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากร่างกาย ลักษณะรูปร่างของหลอดลมเป็นหลอดกลมประกอบไปด้วยกระดูกอ่อนรูปวงแหวน ซึ่งมีอยู่ทั้งหมด 20 ชิ้น หลอดลมของมนุษย์จะเริ่มตั้งแต่ส่วนที่เชื่อมต่อจากกล่องเสียง (Larynx) ลงไปสิ้นสุดที่ถุงลม หลอดลมมีชื่อเรียกแตกต่างขึ้นอยู่กับขนาดและตำแหน่งของหลอดลม ได้แก่ หลอดลมใหญ่ (Trachea) เป็นส่วนที่อยู่ต่อจากกล่องเสียงยาวลงไปจนถึงจุดที่แยกเข้าสู่ปอดด้านซ้ายและด้านขวา หลอดลมของปอด (Bronchus) เป็นแขนงของหลอดลมใหญ่ ซึ่งอยู่ในแต่ละข้างของปอด เริ่มต้นเชื่อมต่อจากบริเวณหลอดลมใหญ่ลึกเข้าไปในเนื้อปอด หลอดลมเหล่านี้เมื่ออยู่ลึกเข้าไปจะมีการแตกแขนงแยกย่อยลงไปอีกตามตำแหน่งของเนื้อปอด เช่น หลอดลมของปอดกลีบบน (Upper Lobe Bronchus) หลอดลมของปอดกลีบล่าง (Lower Lobe Bronchus) หลอดลมแขนง (Segmental Bronchus) เป็นต้น หลอดลมฝอย (Bronchiole) เป็นแขนงย่อยของหลอดลมของปอด เนื่องจากหลอดลมมีหน้าที่สำคัญในระบบทางเดินหายใจ ดังนั้นหากเกิดความผิดปกติของหลอดลมก็จะทำให้ระบบการระบายก๊าซของร่างกายเสียไปด้วย [1]

จากจำนวนการตายของประชากรในช่วงปี พ.ศ. 2550 ถึง พ.ศ. 2555 พบว่าสาเหตุการตายจากโรคของระบบทางเดินหายใจอยู่ในลำดับที่ 5 ซึ่งเกิดขึ้นจากสาเหตุต่างๆ อาทิ ติดเชื้อไวรัส เกิดจากการถูกสิ่งระคายเคือง หรือการได้รับสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ ควันบุหรี่ สารเคมี เป็นต้น [2] การรักษาในปัจจุบันมีหลากหลายวิธี เช่น การขยายหลอดลมโดยการใส่อุปกรณ์ถ่ายหลอดลมหรือการใช้ยา แต่ว่าการใช้ยานั้นจะมีข้อเสีย คือ เกิดผลข้างเคียง เช่น ใจสั่น ปวดศีรษะ น้ำตาลในเลือดสูงขึ้น เป็นต้น [3]

ทางเลือกใหม่ในการรักษา คือ การตัดหลอดลมส่วนที่ตีบออกโดยการใช้หลอดลมจากผู้บริจาคมาต่อเชื่อมแทนหลอดลมส่วนที่ตัดออกและการทำหลอดลมเทียมขึ้นมาใช้แทนหลอดลมเดิม ซึ่งการตัดหลอดลมส่วนที่ตีบออกมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เนื่องจากไม่สามารถตัดออกได้ยาวนักเพราะจะทำให้มีผลกระทบต่อระบบการหายใจ วิธีการสร้างหลอดลมเทียมนั้นทำได้หลายวิธี เช่น สร้างหลอดลมเทียมโดยสารเคลือบกับเซลล์ต้นกำเนิดที่ไขกระดูก สร้างหลอดลมเทียมจากเครื่องพิมพ์ 3 มิติ หรือการสร้างหลอดลมเทียมจากการกำจัดเซลล์โดยใช้สารเคมี เป็นต้น

การสร้างหลอดลมเทียมโดยการกำจัดเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่นำหลอดลมมนุษย์ที่ได้จากการรับบริจาคมาทำการกำจัดเซลล์ ซึ่งเมื่อได้หลอดลมที่ปราศจากเซลล์แล้ว หลอดลมที่ปราศจากเซลล์นั้นจะถูกนำไปปลูกถ่ายในผู้ป่วย แต่เนื่องจากปัจจุบันยอดบริจาคหลอดลมไม่เพียงพอต่อความต้องการของจำนวนผู้ป่วยที่มีอยู่ การเลือกใช้หลอดลมของสัตว์ เช่น สุกร แทนหลอดลมมนุษย์ที่ได้จากการรับบริจาค จึงได้รับความสนใจในการสร้างหลอดลมเทียมขึ้นมา เนื่องจากสุกรมีลักษณะเฉพาะทางกายวิภาคและการทำงานของระบบในร่างกายคล้ายกับของมนุษย์ [4]

โดยทั่วไปหลอดลมเทียมปราศจากเซลล์สามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ในการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลม ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกระบวนการดังกล่าวใช้เวลานาน อีกทั้งยังมีรายงานการศึกษาที่ตรวจสอบพบว่าการแช่หลอดลมในสารเคมีหรือเอนไซม์เป็นเวลานานจะส่งผลให้โครงสร้างภายในหลอดลมถูกทำลาย อย่างไรก็ตามการลดเวลาที่ใช้ในการแช่หลอดลมในสารเคมีหรือเอนไซม์ลงจะส่งผลให้ปริมาณของเซลล์ในหลอดลมที่ถูกกำจัดนั้นน้อยลงไปด้วย นอกจากนี้ยังมีข้อมูลอีกว่าสารเคมีชนิดสารซักฟอกจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ในเนื้อเยื่อที่มีความหนาได้ดี เช่น เนื้อเยื่อของระบบท่อต่างๆ ในร่างกาย ซึ่งการใช้เอนไซม์หรือการใช้แรงดันออสโมซิสนั้นจะไม่สามารถทำได้ รวมไปถึงสามารถกำจัดโปรตีนในเนื้อเยื่อได้ดี อีกทั้งยังสามารถลดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ไม่พึงประสงค์ของร่างกาย [5]

กระบวนการการกำจัดเซลล์โดยใช้เทคนิคทางกล อาทิเช่น การอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้สารเคมีและเอมไซม์เป็นเทคนิคที่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ได้ จากรายงานของ Presertsung I. และคณะ [6] ซึ่งได้ศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์กับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์ พบว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวจะช่วยเพิ่มร้อยละการกำจัดเซลล์ออกจากหนังสุกรได้สูงขึ้นและสามารถลดเวลาที่ใช้ในกระบวนการการ-กำจัดเซลล์ ซึ่งเป็นการรักษาโครงสร้างทางธรรมชาติของผิวหนังด้วย

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกรขึ้น โดยใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้สารเคมีเพื่อลดระยะเวลาในการกำจัดเซลล์หลอดลม เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ และรักษาสภาพโครงสร้างภายในของหลอดลมไว้ให้ได้มากที่สุด ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปเป็นต้นแบบในการพัฒนาการผลิตหลอดลมเทียมปราศจากเซลล์ต่อไป ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการนำเข้าหลอดลมเทียมจากต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกรโดยการใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้สารเคมี

1.3 ขอบเขตในการดำเนินโครงงาน

1.3.1 ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา

1.3.1.1 เทคนิคในการกำจัดเซลล์หลอดลมสุกร (ปั่นกวนด้วยสารเคมีและการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้สารเคมี)

1.3.1.2 จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน (6 และ 12 รอบต่อชั่วโมง)

1.3.2 ตัวแปรควบคุม

1.3.2.1 ขนาดหลอดลมสุกรเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร และความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร จากสุกรในช่วงอายุ 3-4 เดือน

1.3.2.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารละลาย

1.3.2.3 ความดันภายในถังอัดคลายแรงดัน 4 บาร์

1.3.2.4 จำนวนครั้งในการเปลี่ยนสาร (1 ครั้งต่อชั่วโมง)

1.3.2.5 ระยะเวลาในการกำจัดเซลล์ 24 ชั่วโมง

1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน

อาคารปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน

ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2556 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2556

1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

ตารางที่ 1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

	การดำเนินโครงงาน	ช่วงเวลา							
		พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
1.6.1	ออกแบบการทดลองและค้นคว้าทฤษฎี	←	—	—	—	→			
1.6.2	การดำเนินการทดลอง				←	—	—	→	
1.6.3	วิเคราะห์ผลการทดลอง						←	—	→
1.6.4	สรุปผลการดำเนินโครงงาน						←	—	→
1.6.5	จัดทำรูปเล่ม							←	— →

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีเบื้องต้น

2.1 หลอดลม [7]

หลอดลม (Trachea) เป็นระบบทางเดินหายใจในส่วนล่างที่อยู่ระหว่างช่วงกล่องเสียงและแขนงของหลอดลม หลอดลมเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญต่อการหายใจในมนุษย์ ช่วยให้อากาศที่หายใจที่ผ่านเข้าไปในปอดได้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซขึ้น ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการทำงานของเซลล์ได้ตามปรกติ นอกจากนี้ยังเป็นทางผ่านของอากาศจากปอดออกสู่ภายนอกในขณะที่หายใจออก

2.1.1 ลักษณะทางกายวิภาคของหลอดลม

หลอดลมเป็นท่อทางผ่านเข้าออกของอากาศระหว่างกล่องเสียงและส่วนปอด จุดเริ่มต้นของหลอดลมเริ่มจากส่วนที่อยู่ขอบล่างของกระดูกอ่อน Cricoid Cartilage ไปจนถึงบริเวณ Apex ของ Tracheal Bifurcation ลักษณะเป็นรูปร่างทรงกระบอกที่ยืดหยุ่นได้ประกอบด้วยกระดูกอ่อนรูปตัวซี (Hyaline Cartilage) มาเรียงต่อกันเป็นท่อที่ไม่สมบูรณ์ ทางด้านหลังส่วนของท่อจะถูกปิดด้วย Fibromuscular Membrane ถ้าตัดตามขวางของหลอดลมจะมีลักษณะรูปคล้ายอักษร D

จุดเริ่มของหลอดลมตรงกับกระดูกสันหลังส่วนคอที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุ เด็กแรกเกิดพบว่าตรงกับกระดูกสันหลังระดับคอชิ้นที่ 2 อายุ 5 ปี ตรงกับกระดูกสันหลังระดับคอชิ้นที่ 5 และเมื่ออายุ 15 ปี ตรงกับกระดูกสันหลังระดับคอชิ้นที่ 6 จุดสิ้นสุดของหลอดลม คือ บริเวณ Apex ของ Tracheal Bifurcation ในเด็กแรกเกิดตรงกับกระดูกสันหลังส่วนคอชิ้นที่ 3-4 ในผู้ใหญ่ตรงกับกระดูกสันหลังส่วนทรวงอกชิ้นที่ 5 หรืออาจจะสูงกว่านี้ในผู้ที่มี Thoracic Cage แคบ

จำนวนของ Tracheal Cartilage ในหลอดลมไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุ โดยตามปกติแล้วจะมี Tracheal Cartilage ประมาณ 15-20 ชิ้น ในบางคนอาจจะมีได้มากถึง 26 ชิ้น ความกว้างของ Cartilage อยู่ในช่วงระหว่าง 3-5 มิลลิเมตร ความหนาอยู่ที่ 2 มิลลิเมตร ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Grillo ในปี 2004 ที่ได้มีการศึกษาถึงลักษณะทั่วไปของหลอดลม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเด็กและผู้ใหญ่ ยกเว้นขนาดของหลอดลม โดยที่ผู้ใหญ่จะมีขนาดที่เพิ่มขึ้น ลักษณะของ Tracheal Cartilage ชิ้นแรกและชิ้นสุดท้ายจะแตกต่างจากส่วนของ Tracheal Cartilage ส่วนอื่นๆ โดยพบว่า Tracheal Cartilage ชิ้นแรกมีขนาดกว้างที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นอื่นๆ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดลมประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร ส่วน Tracheal Cartilage ชิ้นสุดท้ายจะมีลักษณะค่อนข้าง

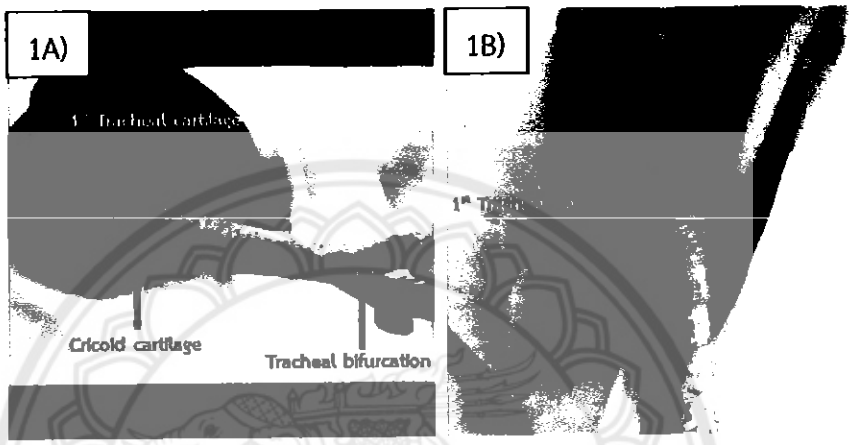
หนาและกว้าง นอกจากนี้ยังพบ Triangular Process ใน Tracheal Cartilage เป็นชิ้นสุดท้ายที่มีลักษณะยื่นลงล่างเยื้องไปด้านหลัง

นอกจากนี้การศึกษาของ Grillo ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Naidich และคณะ ในปี ค.ศ. 1999 ซึ่งระบุขนาดของ Tracheal Lumen ขึ้นกับเพศ อายุ ความสูงของแต่ละบุคคล ผู้ชายจะกว้างกว่าผู้หญิงทั้งการวัดในแนว Coronal Plane และ Sagittal Plane (ผู้ชาย Tracheal Diameter แนว Coronal Plane ยาว 13-25 มิลลิเมตร และ Sagittal Plane ยาว 13-27 มิลลิเมตร ส่วนผู้หญิง Coronal Plane ยาว 10-21 มิลลิเมตร และ Sagittal Plane ยาว 10-23 มิลลิเมตร) และได้กล่าวว่ารูปร่างของ Tracheal Lumen จะเปลี่ยนแปลงตามการเพิ่มขึ้นของอายุ จากรูปร่างกลมไปเป็นรูปไข่ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Tracheal Lumen ยังขึ้นอยู่กับ Respiratory Cycle อีกด้วย กล่าวคือ ขณะหายใจเข้าหลอดลมส่วนคอจะแคบ แต่หลอดลมส่วนทรวงอกนั้นจะกว้าง ในทางตรงกันข้าม ขณะหายใจออกหลอดลมส่วนคอจะกว้างแต่หลอดลมส่วนทรวงอกจะแคบ

ความยาวของหลอดลมวัดจากบริเวณขอบล่างของ Cricoid Cartilage จนถึง Apex ของ Tracheal Bifurcation จากรูปที่ 2.1 1A) มักจะมีความแตกต่างกันตามช่วงอายุ ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Langova ในปี ค.ศ. 1946 ได้ทำการศึกษาความยาวของหลอดลมในร่างอาจารย์ใหญ่ 390 ร่าง ในช่วงอายุตั้งแต่ 6 เดือน จนถึง 20 ปี พบว่าความยาวของหลอดลมในเด็กทารกแรกเกิดจะมีความยาว 3.1 เซนติเมตร อายุ 5 ปี ยาว 6 เซนติเมตร อายุ 10 ปี ยาว 7 เซนติเมตร อายุ 15 ปี ยาว 8.5 เซนติเมตร ผู้ใหญ่มีความยาวของหลอดลม อยู่ระหว่าง 8.5–15 เซนติเมตร สำหรับการศึกษาของ Tehmina และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 มีการศึกษาความยาวของหลอดลมในผู้ใหญ่เพศชายช่วงอายุระหว่าง 20-58 ปี พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมมีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุโดยพบว่าอายุระหว่าง 20-29 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมเท่ากับ 8.73±0.21 เซนติเมตร อายุระหว่าง 30-39 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมเท่ากับ 9.53±0.46 เซนติเมตร อายุระหว่าง 40-49 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมเท่ากับ 9.63±0.23 เซนติเมตร อายุในช่วงระหว่าง 50-59 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลม เท่ากับ 9.76±0.39 เซนติเมตร สรุปแล้วค่าเฉลี่ยโดยรวมของความยาวของหลอดลมในผู้ชายยาว 11 เซนติเมตร ในหญิงยาว 10 เซนติเมตร

หลอดลมแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ หลอดลมส่วนคอและหลอดลมส่วนทรวงอก โดยมีการใช้ Superior Thoracic Aperture เป็นตัวแบ่ง หลอดลมส่วนทรวงอกในเด็กจะสั้นกว่าหลอดลมส่วนคอ ตรงกันข้ามในผู้ใหญ่หลอดลมส่วนทรวงอกจะยาว 2 ใน 3 ของความยาวหลอดลมทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 2.1

การวางตัวของหลอดลมบริเวณใต้ผิวหนังมีระยะห่างเพิ่มขึ้นในส่วนท้ายของหลอดลม โดยหลอดลมส่วนบนจะอยู่ชิดผิวหนังมากสุด มีระยะห่างจากผิวหนังเพียง 1-2 เซนติเมตร หลอดลมตรงระดับ Thoracic Inlet จะอยู่ห่างจากผิวหนังประมาณ 3-4 เซนติเมตร และหลอดลมช่วงบริเวณ Bifurcation อยู่ห่างจากผิวหนังประมาณ 6-12 เซนติเมตร ทั้งนี้ระยะห่างระหว่างส่วนหลอดลมกับผิวหนังยังจะขึ้นอยู่กับต่อมไทรอยด์และความหนาของเนื้อเยื่อไขมันอีกด้วย

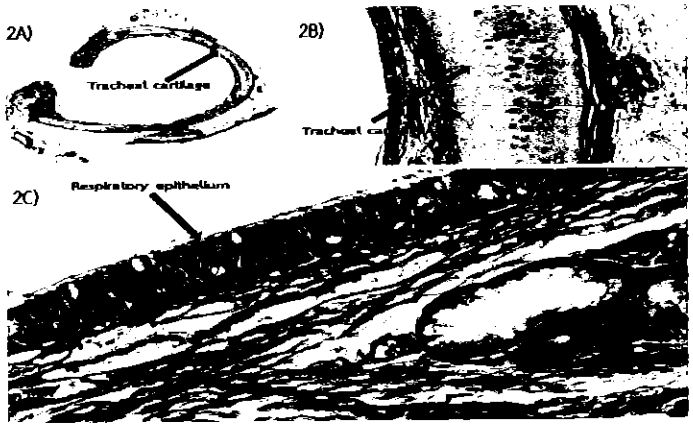


รูปที่ 2.1 กายวิภาคของหลอดลม

ที่มา: นพ.ธัชชัย ศรีเสน (เมษายน 2556)

2.1.2 ลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดลม

ผนังหลอดลมด้านในถูกบุด้วย Pseudostratified Columnar Epithelium มี Goblet Mucous Cell และ Small Subepithelial Gland แทรกระหว่าง Ciliated Columnar Cell โดยมี Tight Junction ยึดตัวกันระหว่างเซลล์ มีกระดูกอ่อนที่ประกอบกันเป็นหลอดลมเป็นชนิด Hyaline Cartilage และลักษณะเป็นรูปตัวอักษรซี มีเยื่อหุ้มกระดูกอ่อนคลุมด้านนอกของแท่งกระดูกอ่อน ในเยื่อหุ้มกระดูกอ่อนประกอบด้วย Collagen Fiber เป็นส่วนใหญ่และมี Elastic Fiber เป็นส่วนน้อย มีกล้ามเนื้อเรียบอยู่ด้านหลังของ Tracheal Cartilage โดยยึดที่ส่วนปลายของ Tracheal Cartilage ทำหน้าที่ป้องกันการขยายที่มากเกินไปของหลอดลม ดังที่แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดลม

ที่มา: นพ.ธัชชัย ศรีเสน (เมษายน 2556)

2.1.3 หลอดเลือดและเส้นประสาทที่มีหน้าที่มาหล่อเลี้ยงหลอดลม

หลอดลมจะถูกเลี้ยงด้วยเส้นประสาทอัตโนมัติทั้งในส่วนของ Sympathetic Fiber และส่วน Parasympathetic Fiber โดยในส่วนของ Sympathetic Fiber เป็น Postganglionic Fiber ส่วน Parasympathetic Fiber เป็น Preganglionic Fiber ซึ่งจะเชื่อมต่อกับเซลล์ประสาทที่ปมประสาทในผนังของหลอดลมต่างๆ ที่เป็น Postganglionic Fiber กับ Sympathetic Fiber และ Parasympathetic Fiber ไปเลี้ยงที่ในส่วน Seromucous Gland กล้ามเนื้อเรียบและหลอดเลือดต่างๆ อีกทั้งนอกจากนี้ยังมี Recurrent Laryngeal Nerve เป็น Sensory Afferent วางตัวอยู่ที่ Tracheoesophageal Groove จะแทงทะลุเข้าไปในหลอดลมทำหน้าที่รับความรู้สึกบริเวณด้านในของหลอดลม

หลอดเลือดแดงที่เข้าไปเลี้ยงหลอดลมมาจากแขนงของ Inferior Thyroid Artery และ Bronchial Artery โดย Inferior Thyroid Artery เลี้ยงในส่วนแขนงเลี้ยงส่วนบนของหลอดลมและ Bronchial Artery ให้แขนงเลี้ยงส่วนล่างของหลอดลม

เลือดที่เข้ามาเลี้ยง Tracheal Cartilage จะถูกส่งผ่านมาทางเยื่อบุผิวที่ไม่มี Capillary Network ที่บริเวณผิวนอกของหลอดลม ดังนั้นหากเกิดการกดทับของ Tracheal Mucosa จะเกิด Necrosis ที่ Tracheal Cartilage นั้นได้ Bronchial Artery เลี้ยงตำแหน่งปลายของหลอดลมและ Carina ส่วนหลอดเลือดแดงในส่วนอื่นๆ ที่เข้ามาเลี้ยงส่วนบนของหลอดลมในส่วนทรวงอกมาจาก Innominate-subclavian System อาทิเช่น Supreme Intercostal Artery Subclavian Artery Mammary Artery และในส่วนของ Innominate Artery หลอดเลือดดำ Inferior Thyroid Venous Plexus ทำหน้าที่รับเลือดเสียจากหลอดลมไปเข้าที่ระบบไหลเวียนเลือดต่อไป

2.1.4 การไหลเวียนของระบบน้ำเหลือง

ต่อมน้ำเหลือง (Lymph Node) ส่วนใหญ่วางอยู่บริเวณ Carinal Region ได้แก่ Inferior Tracheobronchial Node และ Superior Bronchial Node ซ้ายและขวา โดยต่อมน้ำเหลืองกลุ่มที่อยู่ส่วนบน 2 ใน 3 ของหลอดลมจะเข้าที่ Pretracheal Lymph Node และ Paratracheal Lymph Node จากนั้นจะลำเลียงไปที่ Lower Jugular Node ก่อนเทเข้าที่ระบบไหลเวียนเลือดต่อไป

2.1.5 เซลล์และองค์ประกอบจุลภาคที่พบภายในหลอดลม [8]

2.1.5.1 Goblet Cell มีลักษณะคล้ายแก้วไวน์ ที่ฐานแก้วเป็นที่อยู่ของนิวเคลียส ส่วนโครงสร้างทรงกลมสองอันที่ทับอยู่บน Apical Cytoplasm ของเซลล์ คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เคลื่อนผ่านเนื้อผิวออกมา ซึ่งมีขนาดความยาวของเซลล์ประมาณ 50 ไมครอน และความกว้างของเซลล์ 5-10 ไมครอน อยู่กระจายทั่วไปในชั้นของเนื้อเยื่อเพื่อทำหน้าที่หลั่งเมือก ด้านบนของเซลล์อาจพบส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายเส้นขนขนาดเล็กเรียกว่า ไมโครวิลไล (Microvilli) ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มพื้นที่การดูดซึม

2.1.5.2 Lymphocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ มีขนาดประมาณ 6-12 ไมครอน สามารถสร้างแอนติบอดีขึ้นมาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคได้ ลิมโฟไซต์มีประมาณร้อยละ 20-25 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด ลิมโฟไซต์ แบ่งออกเป็นหลายชนิด คือ ลิมโฟไซต์ชนิดบีหรือเซลล์บี ซึ่งเจริญพัฒนาที่ไขกระดูกหรือไปเจริญพัฒนาที่เนื้อเยื่อของน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ ส่วนอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า ลิมโฟไซต์ชนิดทีหรือเซลล์ทีซึ่งจะเจริญและพัฒนาที่ต่อมไทมัส

2.1.5.3 Epithelial Cell คือ กลุ่มของเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกัน จะเรียงตัวและยึดติดกัน มีขนาดประมาณ 7 ไมครอน มีนิวเคลียสกลมโตขอบชัดเกือบเต็มเซลล์ บุอยู่ตามพื้นผิวภายนอกหรือภายในร่างกายอวัยวะที่เป็นท่อและช่องว่างของร่างกาย โดยทั่วไปแล้วเยื่อบุจะอยู่บนสุดของเนื้อเยื่อชนิดอื่น บริเวณด้านบนของเยื่อบุจึงเป็นด้านที่อิสระ ส่วนด้านล่างเป็นด้านที่ติดกับเนื้อเยื่อประสานโดยมีเยื่อเบสเมนท์เป็นตัวกั้นแยก

2.1.5.4 Chondrocyte คือ เซลล์กระดูกอ่อน มีขนาดของเซลล์ประมาณ 20 ไมครอน หากปรากฏอยู่บริเวณขอบของกระดูกอ่อนจะมีลักษณะเป็นทรงรีและจะมีลักษณะเป็นทรงกลมหากอยู่บริเวณกลางกระดูกอ่อน ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ยประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณเนื้อกระดูกอ่อนทั้งหมด อาศัยอยู่ในช่องว่างที่เรียกว่า Lacuna ซึ่งเป็นร่างแหคอลลาเจนขนาดเล็กที่รวมตัวกันอย่างแน่นหนา ภายในโครงสร้างนอกเซลล์ในส่วนของกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งจัดเป็นกระดูกอ่อนไฮอะลีน เซลล์กระดูกอ่อนทำหน้าที่สร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของกระดูกอ่อน มีรูปร่างเป็น

รูปไข่หรือทรงกลม บริเวณผิวของเซลล์จะมีลักษณะไม่เรียบมากหรือน้อยไปตามกระบวนการพัฒนาเจริญเติบโตของเซลล์และตำแหน่งที่เซลล์อาศัยอยู่มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารต่างๆ ที่อยู่ในเมทริกซ์ ในส่วนของกระบวนการสร้างเซลล์มีหน้าที่สร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อาทิเช่น คอลลาเจน โปรตีนไกลเคน ไฮยาลูโรแนนและโปรตีนเชื่อมต่อออกจากเซลล์มาสู่เมทริกซ์และในส่วนของกระบวนการสลาย เซลล์กระดูกอ่อนสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์โปรตีเอสทำหน้าที่สลายโปรตีน เอนไซม์คอลลาจีเนสทำหน้าที่สลายเส้นใยคอลลาเจน และเอนไซม์กลุ่มเมทริกซ์เมททาโลโปรตีเนสทำหน้าที่ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เป็นต้น

2.1.5.5 Lysosome เป็นออร์แกเนลล์ที่มียูนิตเมมเบรนเป็นเยื่อหุ้มชั้นเดียว พบเฉพาะในเซลล์สัตว์เท่านั้นและโพทิสต์บางชนิด มีรูปร่างเป็นทรงกลมซึ่งมีขนาดประมาณ 0.1-1.2 ไมครอน ภายในประกอบไปด้วยน้ำย่อยหลายชนิดซึ่งสามารถย่อยสลายโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและกรดนิวคลีอิกได้ ดังนั้นเยื่อหุ้มของไลโซโซมจะต้องมีความทนต่อปฏิกิริยาการย่อยและไม่ยอมให้เอ็นไซม์ภายในถุงแพร่ผ่านออกไปข้างนอกได้ โดยไลโซโซมนั้นมีหน้าที่ คือ ย่อยสลายอนุภาคและโมเลกุลของสารอาหารภายในเซลล์ อีกทั้งยังสามารถย่อยหรือทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่ได้เข้าสู่ร่างกายหรือเซลล์ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวกินและย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย ทำลายเซลล์ที่ตายแล้วหรือเซลล์ที่มีอายุมาก โดยเยื่อของไลโซโซมจะฉีกขาดได้ง่าย แล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเซลล์ดังกล่าว นอกจากนี้หน้าที่ของไลโซโซมยังสามารถย่อยสลายโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ในระยะที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและมีเมตามอร์โฟซีส

2.1.5.6 Collagen Fiber คือ โปรตีนชนิดหนึ่งที่เป็นสายยาวมีขนาด 0.1-8 ไมครอน พบได้ในเนื้อเยื่อได้หลายชนิด ผลิตโดยเซลล์หลายชนิด เช่น ไฟโบบลาสท์ ออสทีโอบลาสท์ คอนโดรบลาสท์ ซึ่งระหว่างมัดของเส้นใยคอลลาเจนจะมีเซลล์ไฟโบรบลาสท์สอดแทรกอยู่ ซึ่งคอลลาเจนจะมีลักษณะเป็นสายเกลียวที่มีหน่วยโมเลกุลเกี่ยวพันกันจำนวนมาก นอกจากนี้คอลลาเจนยังทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่น นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่

2.1.5.7 Elastin Fiber เส้นใยอีลาสตินจะแทรกตัวอยู่ระหว่างมัด Collagen Bundles โดยมีหน้าที่สำคัญ คือ ให้ความยืดหยุ่นของผิวมากกว่าคอลลาเจน เมื่อเกิดการยืดแล้วสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ โดยเส้นใยอีลาสตินนี้จะมีส่วนประกอบสำคัญเป็น Fibrillin การเจริญเติบโตของเส้นใยอีลาสตินมีอยู่หลายระยะและพบในผิวหนังชั้นในทุกระยะ โดยในระยะแรกสุดนั้น คือ Oxytalan พบอยู่บริเวณ DEJ Papillary Dermis และด้านบนสุดของ Reticulardermis เส้นใยอีลาสตินที่เจริญถัดมา

เรียกว่า Elaunin พบใน Reticular Dermis ส่วนกลางและส่วนล่าง เส้นใยอีลาสตินที่เจริญเต็มที่ที่สุด ไม่มีชื่อเรียกแต่พบอยู่ชั้นล่างสุดของ Reticular Dermis

2.2 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) [9]

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) เป็นกระบวนการในสร้างเนื้อเยื่อ (Regeneration of Functional Tissues) เพื่อทดแทน ซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อ อวัยวะที่สูญเสีย หรือบาดเจ็บ ซึ่งโดยปกติแล้วจะไม่มีการงอกใหม่เองในมนุษย์ ได้แก่ ผิวหนังแท้ เส้นประสาท กระดูก กระดูกอ่อน กล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อต้องใช้การพัฒนาความรู้ต่างๆ 3 ด้านหลัก ได้แก่ วิศวกรรมของวัสดุ ชีววิทยาของเซลล์ และวิศวกรรมชีวเคมี โดยจะเริ่มจากการพัฒนาชีววัสดุ (วัสดุที่เข้ากับร่างกายได้ดี Biomaterials) เพื่อทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้ชีววัสดุที่ได้มาจากธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน เจลาติน ไหม หรือวัสดุสังเคราะห์ขึ้น เช่น Polylactic Acid และ Polycaprolactong โครงเลี้ยงเซลล์จะถูกนำไปใช้เลี้ยงเซลล์ที่ถูกคัดแยกและขยายพันธุ์ให้มีปริมาณมากพอ แล้วเกิดการชักนำให้เปลี่ยนแปลง (Differentiate) ไปเป็นเนื้อเยื่อตามที่ต้องการอย่างสมบูรณ์และสามารถทำงานได้ตามวัตถุประสงค์ ด้วยการควบคุมสภาวะแวดล้อมภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) หรือในระบบร่างกายสิ่งมีชีวิต (In Vivo Regeneration) ปัจจุบันงานวิจัยในสาขานี้มีดังนี้ วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง วิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนากระดูกเทียมจากวัสดุชีวภาพในประเทศ วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนจากเซลล์ต้นกำเนิด ระบบนำส่ง Growth Factor ในกระบวนการซ่อมแซมสร้างเส้นประสาทส่วนปลาย การพัฒนาระบบนำส่งเมโทรเทรกเสสทางผิวหนังเพื่อรักษาโรคผิวหนังเรื้อรัง การสกัด ดัดแปลง และพัฒนาวัสดุทางการแพทย์จากชีววัสดุธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน ไคโตซาน แบคทีเรีย เซลลูโลส สารสกัดจากสาหร่าย ไซโครเด็กตริน การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด

2.3 หลอดลมเทียม

ในปัจจุบันหลอดลมเทียมได้นำไปใช้อย่างแพร่หลายเพื่อทดแทนหลอดลมเดิมที่เกิดข้อบกพร่องต่างๆ เนื่องจากการรักษาแบบเดิมที่รักษาโดยการใช้ยาหรือการตัดหลอมลมส่วนที่ตีบนั้นออก แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น เกิดผลข้างเคียงจากการรักษาโดยการใช้ยาและข้อจำกัดที่ว่าไม่สามารถตัดหลอดลมส่วนที่ออกได้มากนัก จึงมีการคิดค้นวิธีการสร้างหลอดลมเทียมขึ้นมาเพื่อเป็นอีกแนวทางการรักษาอีกหนึ่งทางเลือก ซึ่งหลอดลมเทียมนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.3.1 หลอดลมเทียมที่สร้างขึ้นจากวัสดุสังเคราะห์ที่หุ้มด้วยเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้ป่วย

ดังแสดงในรูปที่ 2.3 [10] ผลงานนี้เป็นผลงานการปลูกถ่ายของทีมปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ โดยศาสตราจารย์เปาโล แม็คคิอารินี่ แห่งมหาวิทยาลัยคาโรลินสก้าและศาสตราจารย์อเล็กซานเดอร์ ไซฟาเลียน แห่งมหาวิทยาลัยลอนดอน ได้ทำการรักษาชายชาวแอฟริกัน ซึ่งก่อนหน้านี้เขาป่วยเป็นมะเร็งหลอดลมระยะสุดท้ายเชื้อมะเร็งได้กัดกินจนทำให้เขาไม่สามารถหายใจได้ กระบวนการผ่าตัดปลูกถ่ายหลอดลมเทียมใช้เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งหลังการผ่าตัดร่างกายของคนไข้ก็ฟื้นตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งถือว่าเป็นคนไข้รายแรกของโลกที่รับการผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะเทียมแบบนำสเต็มเซลล์มาเคลือบไว้เพื่อป้องกันร่างกายต่อต้าน

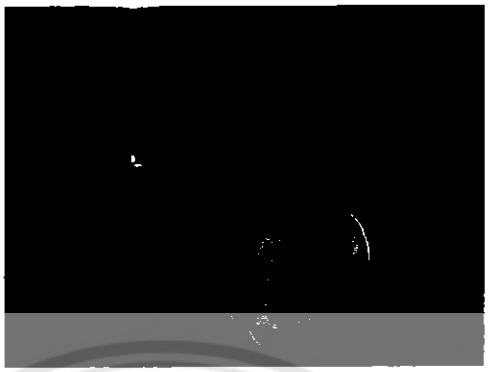
2.3.2 การสร้างหลอดลมเทียมจากเครื่องพิมพ์ 3 มิติ

โดยใช้วัสดุซึ่งมีชื่อเรียกว่า โพลีคาโปรแลคโตน (Polycaprolactone: PCL) เป็นวัสดุใช้ในการสร้างหลอดลมเทียม [11] โดยที่ประเทศสหรัฐอเมริกาได้นำไปใช้ช่วยเด็กชายที่มีอาการผิดปกติในส่วนหลอดลม (Tracheomalacia) หรือ TBM นับตั้งแต่แรกเกิด ทำให้เขาหายใจผิดปกติจนบางครั้งหยุดหายใจไปช่วยขณะหนึ่ง ทำให้แพทย์ต้องทำการผ่าตัดช่วยเหลือเขาโดยด่วน โดยใช้วัสดุที่เรียกว่า Polycaprolactone มาผลิต โดยทำเป็นหลอดลมเทียมเพื่อช่วยยึดและประคองปอดของเด็กเล็กเพื่อช่วยในการหายใจ

2.3.3 หลอดลมมนุษย์ที่ได้มาจากการรับบริจาค

การแพทย์สเปน (โดยความร่วมมือกับอังกฤษและอิตาลี) [12] ประสบความสำเร็จในการศัลยกรรมปลูกถ่ายหลอดลมที่ผ่านเทคโนโลยีชีววิศวกรรมเนื้อเยื่อให้ผู้ป่วยหลอดลมตีบหลังจากป่วยเป็นวัณโรค ขั้นตอนแรกจะนำหลอดลมออกจากตัวผู้บริจาค จากนั้นนำมาผ่านเทคโนโลยีชีววิศกรรมเนื้อเยื่อที่มีการใช้เอนไซม์และสารเคมีเพื่อกำจัดเซลล์ของผู้บริจาค เพื่อกำจัดแอนติเจนจำเพาะของผู้บริจาคออกไป แล้วจึงนำเซลล์กระดูก (Chondocyte) ของผู้ป่วยหรือผู้รับมาเลี้ยงบนหลอดลม แล้วปิดทับด้านในด้วยเซลล์บุผิวของทางเดินหายใจจากผู้ป่วย (เซลล์ต้นกำเนิดที่พัฒนาเป็น Chondocyte แยกได้จากไขกระดูกของผู้ป่วย) หลังจากเพาะเลี้ยง (ประมาณ 4 วัน) แล้วจึงนำไปปลูกถ่ายให้ผู้รับ แต่เนื่องจากปัจจุบันมียอดบริจาคหลอดลมน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการของจำนวนผู้ป่วยที่มีอยู่ การเลือกใช้หลอดลมของสัตว์ เช่น สุกร แทนหลอดลมมนุษย์ที่ได้จากการรับบริจาค จึงได้รับความ

สนใจในการสร้างหลอดลมเทียม เนื่องจากสุกรมีลักษณะเฉพาะทางกายวิภาคและการทำงานของระบบในร่างกายคล้ายกับของมนุษย์มากที่สุด

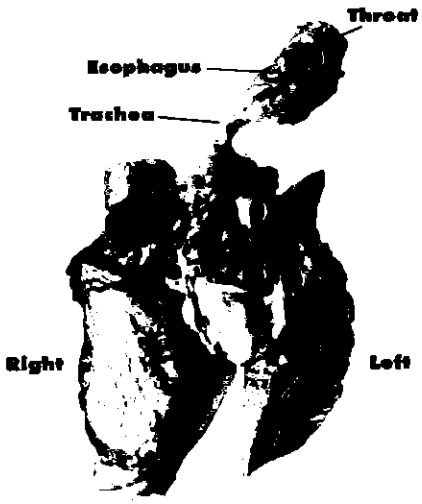


รูปที่ 2.3 หลอดลมเทียมที่หุ้มเซลล์ต้นกำเนิดของตัวผู้ป่วยเอง

ที่มา: http://www.thairath.co.th/content/oversea/185327

2.4 หลอดลมสุกร [4]

สุกรมีหลอดลมขนาดสั้นและเล็กกว่ากล่องเสียง ดังแสดงในรูปที่ 2.4 จะประกอบด้วยวงแหวนกระดูกอ่อน 32–35 ชิ้น หุ้มอยู่ด้านบนของหลอดลม หลอดลมจะแยกเป็น Bronchus ไปยัง Apical Lobe ของปอดขวาก่อนที่จะถึงปลายสุด ปลายหลอดลมก็เป็น Bronchus ซึ่งจะแยกแขนงออกซ้ายขวาไปยัง Cardiac Lobe และต่อเลยไปเข้า Diaphragmatic Lobe ทางด้านขวานั้นยังมีแขนงไปยัง Intermediate Lobe ด้วยและทางด้านซ้ายก็มีแขนงไปยัง Apical Lobe ซ้ายแขนงของ Bronchus ที่แตกเล็กลงมาตามลำดับของขนาด มีดังนี้ Bronchioles Intralobular Bronchioles Terminal Bronchioles Respiratory Bronchioles และ Alveolar Ducts ซึ่งจะไปสิ้นสุดที่ Alveolar Sac ประกอบไปด้วย Alveoli จำนวนมาก ลักษณะการจัดเรียงของ Alveoli คล้ายพวงองุ่นโดย Alveoli เปรียบเหมือนผลองุ่นและท่อทางเดินอาหารก็เปรียบเหมือนกิ่งก้านขององุ่น เส้นเลือดฝอยซึ่งเชื่อมต่อระหว่างแขนงที่เล็กที่สุดของ Pulmonary Arteries และ Veins จะสัมพันธ์กับส่วนของ Alveolar Walls ดังนั้นเลือดจึงถูกนำไปใกล้พอที่จะแยกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ในเลือดกับก๊าซ-ออกซิเจนในอากาศที่หายใจเข้าไป



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของหลอดลมสุกร

ที่มา: วิโรจน์ จันทรัตน์ (2534)

2.5 กระบวนการการกำจัดเซลล์ [5]

การเลือกกระบวนการในการกำจัดเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเนื้อเยื่อ ความหนาแน่น องค์ประกอบของไขมัน ความหนาของชั้นเนื้อเยื่อ เนื่องจากกระบวนการในแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป โดยสามารถแบ่งกลุ่มของกระบวนการออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่ กระบวนการทางเคมี กระบวนการทางชีวภาพ และกระบวนการทางกายภาพและอื่นๆ

2.5.1 การกำจัดเซลล์โดยกระบวนทางเคมี

2.5.1.1 กรดและเบส ก่อให้เกิดการกระตุ้นการสลายตัวทางชีวโมเลกุล สาร Peracetic Acid เป็นสารฆ่าเชื้อทั่วๆ ไป ซึ่งถูกใช้เป็นตัวดึงเอานิวคลีอิกที่หลงเหลืออยู่ภายหลังกระบวนการกำจัดเซลล์ออก มีผลกระทบต่อองค์ประกอบและโครงสร้างของเนื้อเยื่อน้อยที่สุด กรดอะซิติกจะไปทำลายโครงสร้างและกำจัดคอลลาเจลออกจากเนื้อเยื่อจึงทำให้เนื้อเยื่อไม่มีความแข็งแรง ซึ่งต่างจากใช้สาร Sulfated Glycosaminoglycans (sGAG) ที่ไม่ส่งผลดังกล่าวต่อเนื้อเยื่อ เบสนิยมใช้ในการกำจัดขนบนตัวอย่างในส่วนชั้นหนังแท้ เพื่อเตรียมพร้อมเข้าสู่กระบวนการกำจัดเซลล์ อย่างไรก็ตามเบสจะลดคุณสมบัติทางกลของเนื้อเยื่อลง

2.5.1.2 สารละลายไฮโพโทนิกและไฮเพอโทนิก สารไฮเพอโทนิกแยกดีเอ็นเอออกจากโปรตีน สารละลายไฮโพโทนิกนั้นมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์โดยอาศัยผลของแรงออสโมติกร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลเล็กน้อย โดยปกติแล้วจะมีการแช่เนื้อเยื่อลงในสารละลายไฮโพโทนิกและไฮเพอโทนิกสลับกันไปหลายๆ รอบ เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเซลล์ นอกจากนี้สารสารละลายไฮโพโทนิกและไฮเพอโทนิกยังช่วยชะล้างสารตกค้างที่อยู่ภายในเซลล์ซึ่งเกิดจากการสลายเนื้อเยื่อได้

2.5.1.3 สารซักฟอก สารซักฟอกสามารถละลายเยื่อหุ้มเซลล์และแยกดีเอ็นเอออกจากโปรตีน สารซักฟอกมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ภายในเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามสารชนิดนี้ยังทำลายโปรตีนในเนื้อเยื่อ ประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนและดีเอ็นเอด้วยสารซักฟอกนั้นขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ ชนิดของเนื้อเยื่อ อายุของผู้บริจาค หรือชนิดสัตว์ทดลอง Triton X-100 สามารถกำจัดเซลล์ของเนื้อเยื่อที่หนา เช่น หลอดลมและระบบท่อต่างๆ ในร่างกาย ซึ่งการใช้เอนไซม์และการใช้แรงออสโมติกไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกำจัดเซลล์ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) จะมีประสิทธิภาพมากกว่า Triton X-100 ในการกำจัดเซลล์ในเนื้อเยื่อที่มีความหนาแน่น เช่น ไตและยังสามารถรักษาสมบัติเชิงกลของเนื้อเยื่อไว้ได้

2.5.1.4 แอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์กำจัดเซลล์โดยทำให้เซลล์แห้งและทำลายเซลล์ ในความเป็นจริงแล้วแอลกอฮอล์ จำพวก อะซิโตน เอทานอล และเมทานอลจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันจากเนื้อเยื่อมากกว่าเอนไซม์ไลเปสและสามารถกำจัดได้ในระยะเวลาค่อนข้างสั้น

2.5.2 การกำจัดเซลล์โดยกระบวนการทางชีวภาพ

2.5.2.1 เอนไซม์ ถูกใช้ในงานวิจัยกระบวนการกำจัดเซลล์ในเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง เอนไซม์ที่มักถูกนำมาใช้ประกอบไปด้วย นิวคลีเอส ทริปซิน ไลเปซ คอลลาจีเนซ ดิสเปซ เทอร์มอไลซิน และเบต้ากาแลกโทสิเดส เนื่องจากเอนไซม์สามารถกำจัดสิ่งตกค้างหรือองค์ประกอบที่ไม่ต้องการในเซลล์ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ในการกำจัดเซลล์เพียงอย่างเดียวนั้นมักไม่สามารถกำจัดเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากเอนไซม์จะเกิดการเสื่อมสภาพเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งนั้นเป็นผลจากสิ่งตกค้างในเซลล์ที่เอนไซม์เข้าไปกำจัด

นิวคลีเอสเข้าไปจับกับลำดับของกรดนิวคลีอิก จึงสามารถช่วยกำจัดนิวคลีโอไทด์ภายหลังการสลายเซลล์ภายในเนื้อเยื่อเอนโดนิวคลีเอส อย่างเช่น เบนโซเนสอาจมีประสิทธิภาพมากกว่าเอกโซนิวคลีเอส เนื่องจากจะมีการเข้าไปจับอยู่ที่บริเวณกลางลำดับของนิวคลีโอไทด์และมี

ประสิทธิภาพในการกำจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มากกว่า ในทำนองเดียวกันนั้นการใช้ปริมาณเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสในปริมาณที่มากขึ้นจะทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดดีเอ็นเอได้มากยิ่งขึ้น

ทริปซินเป็นน้ำย่อยโปรตีนที่ใช้กันโดยทั่วไปในกระบวนการกำจัดเซลล์ อย่างไรก็ตาม โปรตีนในองค์ประกอบภายนอกเซลล์ เช่น คอลลาเจน นั้นมีความต้านทานต่อแรงดึงของทริปซินที่จำกัดและทริปซินมีอันตรายต่อเนื้อเยื่อจึงควรใช้อย่างระมัดระวัง เมื่อเปรียบเทียบกับสารซักฟอก ทริปซินจะทำลายอีลาสตินและคอลลาเจนในปริมาณมากกว่า กำจัดเซลล์ได้ช้ากว่า แต่สามารถรักษาองค์ประกอบ GAG ไว้ได้ดีกว่า ความสามารถในการกำจัดเซลล์และองค์ประกอบภายนอกเซลล์โดยใช้ทริปซินขึ้นอยู่กับเวลาและความสมบูรณ์ของกระบวนการกำจัดเซลล์ การใช้ทริปซินอย่างเดียวในการกำจัดเซลล์เนื้อเยื่อบางๆ อาจต้องใช้เวลานาน ทริปซินสามารถทำลายโครงสร้างขนาดเล็กภายในเนื้อเยื่อได้และช่วยส่งเสริมการทำงานของตัวกระทำชนิดอื่นๆ ได้ดี ดังนั้นการใช้ทริปซินในขั้นตอนแรกของกระบวนการกำจัดเซลล์อาจทำให้ได้ผลลัพธ์ที่น่าพอใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนเนื้อเยื่อที่มีความหนาแน่นมากที่ต้องการการกำจัดเซลล์นิวคลีไออย่างสมบูรณ์

คอลลาจีเนส อาจถูกใช้ในระหว่างกระบวนการกำจัดเซลล์ แต่สามารถกำจัดได้เพียงโครงสร้างเล็กๆ และมีความสามารถในการเก็บรักษาคอลลาเจนได้สูงสุด แต่ไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ กระบวนการการกำจัดไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส โดยทั่วไปแล้วจะไม่เพียงพอที่จะกำจัดไขมันทั้งหมดออกได้เมื่อใช้เพียงอย่างเดียว

หลังจากกำจัดไขมันบนผิวหนังชั้นหนังแท้ออก เมื่อมีการเปรียบเทียบระหว่าง Trypsin กับ Dispase พบว่า Dispase มีการกำจัดเซลล์ที่ดีกว่า มีการหยุดชะงักขององค์ประกอบภายนอกเซลล์ที่เพิ่มขึ้น การศึกษาเดียวกันยังแสดงให้เห็นการแทรกซึมของเซลล์มากขึ้นในเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วย Dispase หลังปลูกถ่ายลงบริเวณใต้ผิวหนัง 4 สัปดาห์ Dispase และ Trypsin หากใช้ร่วมกับผงซักฟอกและมีการทำซ้ำสามารถนำมาใช้ได้ในการปรับปรุงการกำจัดเซลล์จากเนื้อเยื่อหนา อาทิเช่น หนังแท้ การใช้เอนไซม์ Dispase หรือ Thermolysin ในกระบวนการเพียงอย่างเดียวสามารถกำจัดเซลล์บนพื้นผิวของเนื้อเยื่อได้ แต่อาจยังต้องการแรงทางกลเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่และสัมผัสกับองค์ประกอบของวัสดุมากขึ้นเพื่อการกำจัดเซลล์อย่างสมบูรณ์ Dispase กำจัดเซลล์ภายใต้เยื่อหุ้มเบสเมนต์ขององค์ประกอบภายนอกเซลล์ได้มากกว่า Thermolysin

เนื้อเยื่อผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ชนิด Xenogeneic จะสามารถรักษาด้วย α-galactose เพื่อลดเซลล์ภูมิคุ้มกันแอนติเจนพื้นผิว Galactose-α-(1,3) Galactose (Gal Epitope)

แม้ว่าภูมิคุ้มกันผลของ Gal Epitope จะไม่มีการส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายของ Xenogeneic ECM

2.5.2.2 กระบวนการทางชีวภาพที่ไม่ใช่เอนไซม์

ตัวกระทำคีเลต เช่น Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) และ Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA) ที่ส่งผลต่อการแยกตัวของเซลล์จากโปรตีนของเซลล์ ECM โดยที่จะไปจับกับไอออนของโลหะ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่คีเลตนั้นมีส่วนในการทำลายโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธีการที่เหมือนกัน ซึ่งคีเลตเพียงแค่ตัวเดียวนั้นไม่เพียงพอสำหรับการกำจัดเซลล์ผิว ถึงแม้จะมีการปั่นกวน ดังนั้นจึงมีการใช้งานร่วมกับเอนไซม์ เช่น ทริปซินหรือสารซักฟอก

สารพิษ เช่น Latrunculin จะช่วยให้ในการตรวจสอบเป็นประโยชน์สำหรับวัสดุกัมมันตรังสีตามธรรมชาติที่เป็นสารพิษส่งผลต่อเซลล์ ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์ในการต้องการกำจัดเซลล์ ต้องการกำจัดของดีเอ็นเอและโปรตีนภายในเซลล์จากเนื้อเยื่อที่หนาแน่น ในส่วนของกล้ามเนื้อ Tibialis Anterior นั้นสามารถใช้ได้เพียงแค่ Latrunculin B สารละลายไฮโพโทนิก สารละลายไฮ-เพอโทนิก และ Dnase Treatments เท่านั้น ซึ่งวิธีเหล่านี้จะได้ผลลัพธ์ในการกำจัดดีเอ็นเอและการเก็บรักษาของ GAG ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการใช้เอนไซม์ในการกำจัดเซลล์กับสารซักฟอกและการทดสอบความทนต่อแรงทางกลของโครงสร้าง ECM และเนื้อเยื่อต้นแบบที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน

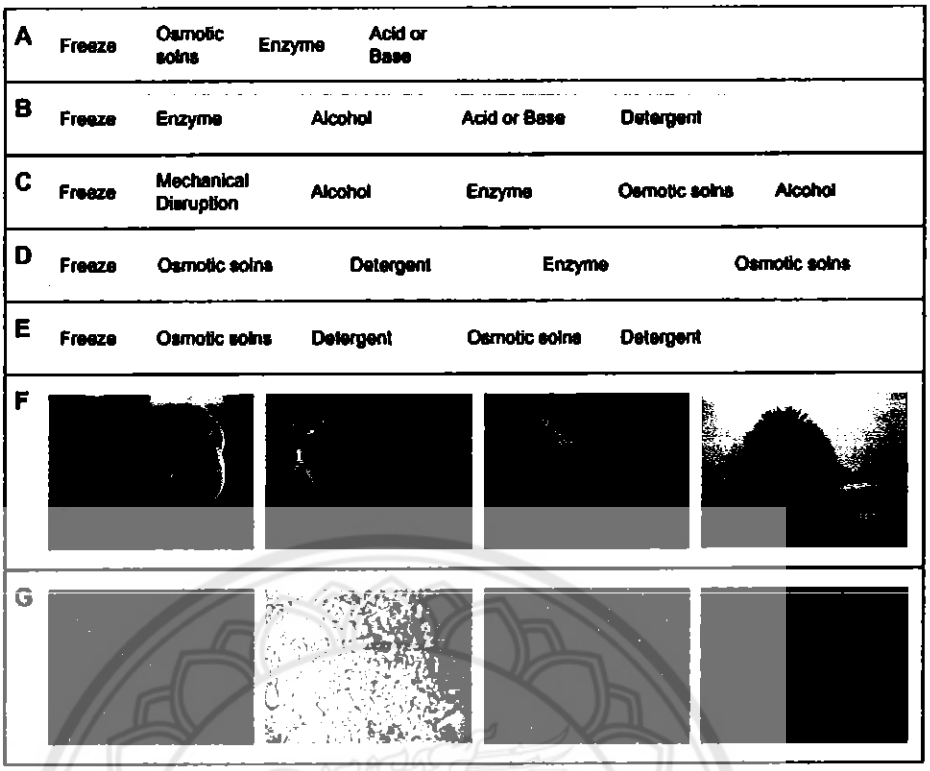
ในการใช้เซรั่มร่วมกับกรดนิวคลีอิก เพื่อช่วยในกระบวนการกำจัดเซลล์นั้นสามารถกำจัดเซลล์เนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี แต่เซลล์เนื้อเยื่อของระบบภูมิคุ้มกันนั้นจะถูกกำจัดได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งข้อเสียที่ได้จากการผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้เซรั่มร่วมกับกรดนิวคลีอิก คือ ต้องคำนึงถึงจำนวนเซรั่มที่มีผลต่อโครงสร้างของสุกรหรือจะใช้เซรั่มรวมกับน้ำย่อยโปรตีน เช่น ฟลูออไรด์ Phenyl Methyl Sulfonyl (PMSF) Aprotonin และ Leupeptin เพื่อป้องกันความเสียหายที่ไม่พึงประสงค์ต่อ ECM โดยอาจจะเป็นผลจากการออกโปรตีเอสภายในเซลล์ในระหว่างการสลาย Sodium Azide และ Antimycotics เช่น Penicillin Streptomycin Amphotericin B และ Sodium Azide อาจนำมาใช้เพื่อลดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการกำจัดเซลล์ แต่ยังมีอุปสรรคทางด้านกฎหมายทางชีววิทยาคลินิก

2.5.3 การกำจัดเซลล์โดยกระบวนการทางกายภาพและอื่นๆ

2.5.3.1 อุณหภูมิ กระบวนการ Freeze-Thaw จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ภายในเนื้อเยื่อและอวัยวะ แต่สามารถกำจัดเยื้อหุ้มและองค์ประกอบของเซลล์ได้น้อย การ Freeze-Thaw 1 รอบ สามารถลดการทำลายภูมิคุ้มกัน เช่น การแทรกซึมของ Leukocyte ในหลอดเลือด และสำหรับการ Freeze-Thaw หลายๆ รอบ อาจจะใช้ร่วมกับกระบวนการกำจัดเซลล์เพราะไม่ทำให้เพิ่มการสูญเสียโปรตีนในเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามกระบวนการ Freeze-Thaw อาจทำลายโครงสร้างบางๆ ของเนื้อเยื่อได้เล็กน้อย

2.5.3.2 แรงและความดัน เซลล์บนผิวหน้าของเนื้อเยื่อและอวัยวะสามารถกำจัดได้โดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับการให้แรงทางกล การใช้สารละลายต่างๆ ในการกำจัดเซลล์สามารถกำจัดเซลล์ที่อยู่ภายใต้เยื่อหุ้มได้ แต่เซลล์บริเวณผิวหน้าของเยื่อหุ้มหรือเนื้อเยื่ออาจถูกกำจัดได้ไม่หมด จึงต้องใช้แรงทางกลร่วมด้วย นอกจากนี้การใช้แรงดันร่วมกับใช้สารละลายหรือเอนไซม์ยังช่วยลดระยะเวลาในการกำจัดเซลล์ลง แต่อย่างไรก็ตามแรงทางกลอาจทำลายโครงสร้างของเนื้อเยื่อได้

2.5.3.3 ไฟฟ้า กระแสไฟฟ้าประเภท Non-Thermal Irreversible Electroporation จะทำให้เกิดการก่อตัวของ Micropores ในเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากความเสถียรทางไฟฟ้าอาจเกิดขึ้นผ่านเยื่อหุ้ม Micropores นี้ทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของเซลล์และอาจนำไปสู่การตายของเซลล์ กระบวนการกำจัดเซลล์โดยเลือกใช้ตัวกระทำชนิดต่างๆ สรุปได้ ดังในรูปที่ 2.5 กระบวนการในการกำจัดเซลล์จะขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เช่น ความหนา ความหนาแน่น การใช้งานในระดับคลินิก ในเนื้อเยื่อบางๆ เช่น เนื้อเยื่อหัวใจส่วนใหญ่แล้วขั้นตอนในกระบวนการกำจัดเซลล์จะประกอบไปด้วย การแช่แข็ง การทำละลายการกำจัดเซลล์โดยการใช้แรงทางกล และการใช้สารซักฟอกหรือเอนไซม์ในการกำจัดเซลล์ (รูป A) ในเนื้อเยื่อที่มีความหนา อย่างเช่น หนังแท้ ซึ่งอาจจะต้องการการกำจัดทางชีวเคมีที่เข้มข้นกว่าและใช้เวลานานกว่า (รูป B) ชั้นไขมันเนื้อเยื่อไขมันสมองและตับอ่อนโดยปกติแล้วต้องการใช้ตัวทำละลายไขมัน อย่างเช่น แอลกอฮอล์ (รูป C) สำหรับในโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของขั้นตอนในกระบวนการกำจัดเซลล์จะต้องพิจารณาตามลักษณะของโครงสร้างและสมบัติทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อคอมโพสิตและอวัยวะต่างๆ (รูป D-G)



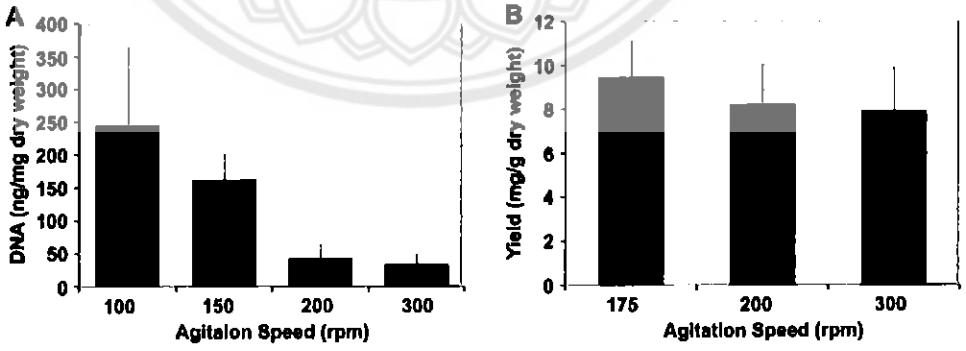
รูปที่ 2.5 ภาพตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการการกำจัดเซลล์

ที่มา: P.M. Crapo และคณะ (2554)

2.5.4 การแช่และการปั่นกวน

ความแตกต่างของระยะเวลาในการกำจัดเซลล์ด้วยการแช่และการปั่นป่วน จะแสดงให้เห็นถึงความสามารถของกระบวนการโครงร่างในหลอดเลือดของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามไม่ใช่เนื้อเยื่อทั้งหมดจะมีเส้นเลือดไหลผ่านและเนื้อเยื่อนั้นจะต้องใช้วิธีการอื่นๆ ที่จะใช้เพื่อกำจัดเซลล์เนื้อเยื่อ คือ การแช่พร้อมกับการปั่นกวนเพื่อกำจัดเซลล์ ในขณะเดียวกันกระบวนการการแช่พร้อมกับการปั่นกวนของเนื้อเยื่อจะถูกพูดถึงในเนื้อเยื่อที่หลากหลายชนิด เช่น เส้นเลือด โครงกระดูกกล้ามเนื้อ เอ็น เส้นประสาท เส้นประสาทไขสันหลัง กระดูกอ่อน หลอดลม หลอดอาหาร หนังแท้ และกระเพาะปัสสาวะ ระยะเวลาของกระบวนการในการแช่พร้อมกับการปั่นกวนนั้นจะขึ้นอยู่กับความหนา ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Detergent) ที่ถูกใช้และความรุนแรงที่ใช้ในการปั่นกวน โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อบางๆ ตัวอย่างเช่น ชั้นใต้เยื่อเมือก (Submucosa) ของลำไส้เล็กและในกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งสามารถกำจัดเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพหลังจากทำปฏิกิริยากับ Peracetic Acid ด้วยการปั่นกวนอย่างรวดเร็ว สำหรับวัสดุเหล่านี้และเนื้อเยื่ออื่นๆ ในการกำจัดดีเอ็นเอและการรักษาส่วนประกอบขององค์ประกอบภายนอกเซลล์เป็นหัวใจสำคัญของความเร็วในการกำจัดเซลล์ ในการใช้การปั่นกวน

ด้วย (รูปที่ 2.6) ของเนื้อเยื่อที่หนา อย่างเช่น ผิวหนัง เส้นเอ็น และหลอดลมนั้นต้องการใช้ระยะเวลานานก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาร่วมกับสารลดแรงตึงผิว (Detergent) เอนไซม์และแอลกอฮอล์ เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการตีพิมพ์กระบวนการสำหรับการกำจัดเซลล์ในหลอดลมของมนุษย์ที่ดีขึ้นจนสามารถนำไปใช้ในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเกิดของเซลล์เยื่อบุผิวภายในทางเดินหายใจ Autologous และเซลล์ไขกระดูก การฟื้นฟูทางเดินหายใจ กระบวนการนี้ได้อธิบายไว้ว่าเกี่ยวข้องกับจำนวนรอบของการสัมผัสกันกับ Deoxycholate ตามด้วยการรักษาด้วย DNase ในแต่ละรอบใช้ระยะเวลานานประมาณ 8 ชั่วโมง แต่ในทางตรงกันข้าม Remlingereal ได้อธิบายถึงกระบวนการกำจัดเซลล์ในหลอดลมสุกรที่เกี่ยวข้องกับการใช้ Triton X-100 จำนวน 3 โมล โซเดียมคลอไรด์และอะซิโตนใช้ในกระบวนการการกำจัดเซลล์ที่ใช้จะใช้ระยะเวลาไปประมาณ 4 วัน โดยที่ 2 กระบวนการข้างต้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ในส่วน Cellular Material ซึ่งเชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อรอบๆ มวลกระดูก (Cartilage structures) และยังแสดงให้เห็นถึงความหนาแน่นของ Chondrocyte Material ที่เหลือในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ในจำนวนที่คล้ายคลึงกันมีหลายกระบวนการในการกำจัดเซลล์ที่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ แต่ระบบการศึกษาปัจจุบันนั้นไม่ค่อยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละสารลดแรงตึงผิว (Detergent) ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยากับสารลดแรงตึงผิว (Detergent) หรือความเร็วในการปั่นกวนของการกำจัดดีเอ็นเอ แต่จะศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบภายนอกเซลล์และในระดับจุลภาคหรือที่สำคัญในฟังก์ชั่นของร่างกายในโครงสร้างเซลล์มากกว่า



รูปที่ 2.6 ปริมาณของดีเอ็นเอที่เหลือภายหลังกระบวนการกำจัดเซลล์

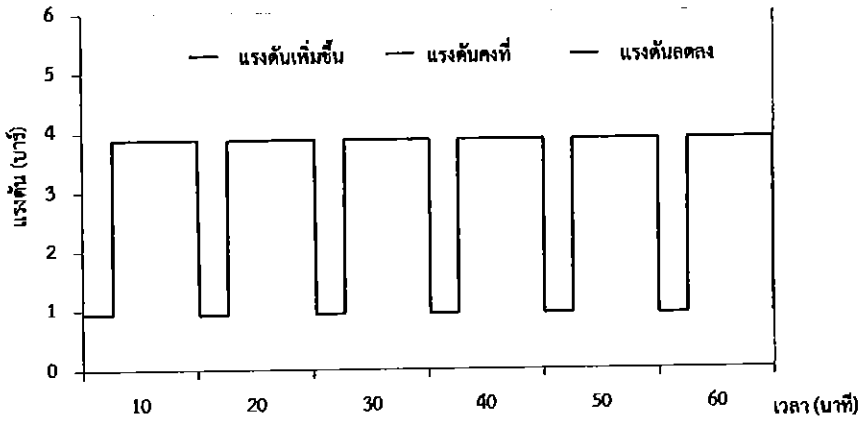
ที่มา: P.M. Crapo และคณะ (2554)

2.5.5 ระดับการเปลี่ยนแปลงของความดันบรรยากาศ

การกระตุ้นให้เกิดระดับการเปลี่ยนแปลงของความดันบรรยากาศผ่านเนื้อเยื่อขณะที่ทำการกำจัดเซลล์สามารถนำมาใช้เสริมร่วมกับการใช้เอนไซม์และให้ผลลัพธ์ในการรักษาที่ดีกว่าในระดับจุลภาค การปะพรมบริเวณผิวด้านในเนื้อเยื่อด้วยการเปลี่ยนแปลงความดันบริเวณผนังผิวสามารถบังคับให้สารที่ใช้กำจัดเซลล์ผ่านเนื้อเยื่อที่มีความหนาแน่นสูงและกำจัดเซลล์ที่ตกค้างออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากงานวิจัยของ Montoya และคณะ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการกำจัดดีเอ็นเอ และกำจัดฟอสโฟลิพิดโดยการหมุนเวียนสารด้วยการให้ความดันทำได้ดีกว่าการปั่นกวนเพียงอย่างเดียวถึง 1.5 เท่า การหมุนเวียนสารทำให้คอลลาเจนนั้นเสื่อมสภาพน้อยกว่าการปั่นกวน ดังแสดงในข้อมูลจากการประเมินปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

2.6 เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique)

เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกรได้ เนื่องจากหลอดลมมีโครงสร้างของกระดูกอ่อนและเนื้อเยื่อต่างๆ สารเคมีจึงแทรกซึมผ่านได้ยาก การนำเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงมาประยุกต์ใช้จะเพิ่มประสิทธิภาพในการแทรกซึมของสารเคมีเข้าไปในเนื้อเยื่อได้มากยิ่งขึ้น การอัดคลายแรงดันแบบช่วงจึงสามารถช่วยในกระบวนการการกำจัดเซลล์ได้มากขึ้น การอัดคลายแรงดันแบบช่วงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการช่วยทำให้เมื่อเพิ่มแรงดันสารเคมีสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในหลอดลมสุกรได้มากยิ่งขึ้นและเมื่อลดแรงดันจะทำให้สารเคมีกำจัดเซลล์ออกมาจากหลอดลมสุกรและเมื่อมีการเพิ่มความดันอีกครั้งก็จะสามารถทำให้สารเคมีที่ยังอยู่รอบๆ ของหนังหมูสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในหลอดลมสุกรได้อีกครั้ง โดยการอัดคลายแรงดันแบบช่วงจะกำหนดแรงดันที่ใช้ในการอัดคลายและจำนวนรอบที่ใช้ในการอัดคลายแรงดันเป็นรอบต่อชั่วโมง ยกตัวอย่างเช่น แรงดันที่ใช้ในการอัดคลายแรงดันที่ 4 บาร์ ใช้การอัดคลายแรงดันที่จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง (1 รอบต่อ 10 นาที) โดยเมื่อให้แรงดันแก่ระบบ แรงดันจะเข้าสู่ภายในระบบจนถึง 4 บาร์ จึงจะหยุดแรงดันให้คงที่อยู่ที่ 4 บาร์ เป็นเวลา 10 นาที หรือนับ 1 รอบ จากนั้นจะทำการปล่อยแรงดันออกจากระบบอย่างรวดเร็ว แล้วทำการเพิ่มแรงดันเข้าสู่ระบบที่ 4 บาร์ อีกครั้งจนกว่าจะครบ 6 รอบ หรือจำนวนรอบที่ต้องการ โดยสามารถดูภาพประกอบได้ดังรูปที่ 2.7

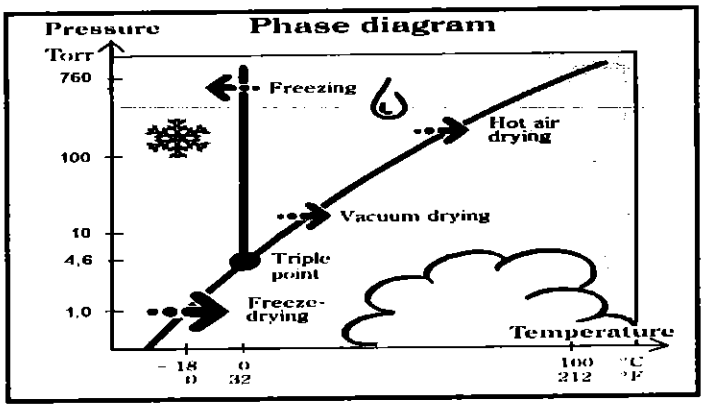


รูปที่ 2.7 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันที่ 4 บาร์ ที่จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง

2.7 เทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง [13]

เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) เป็นเทคนิคการทำสารให้เข้มข้นและทำให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายในลักษณะแห้ง โดยอาศัยหลักการแช่แข็ง (Freezing) เพื่อเปลี่ยนสถานะของตัวอย่างจากสถานะของเหลวมาเป็นของแข็ง จากนั้นจึงกระตุ้นให้เกิดการระเหิดของน้ำกลายเป็นไอโดยตรงโดยอาศัยหลักการปรับความดันไอของน้ำให้มีค่าลดต่ำลงกว่าจุด Triple Point ของน้ำทำให้สามารถลดปริมาณน้ำในตัวอย่างลงได้จนกระทั่งอยู่ในระดับที่สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ได้นานโดยที่มีการเสื่อมคุณภาพน้อยที่สุด โดยทั่วไปสารที่นิยมใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งนิยมใช้กับสารที่มีการสลายตัวด้วยความร้อนได้ง่ายทำให้ไม่สามารถใช้การอบแห้งหรือการทำแห้งโดยวิธีการนำหรือพาความร้อนได้โดยตรง เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ และฮอร์โมนต่างๆ เป็นต้น

การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dehydration) หมายถึง การทำแห้ง (Dehydration) ด้วยการเยือกแข็ง (Freezing) ให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (Sublimation) เป็นไอด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0 องศาเซลเซียส น้ำแข็งระเหิดที่ความดันเท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แผนภาพ Phase Diagram

ที่มา: อาจารย์ปณณธร ภัทรสถาพร (2547)

2.7.1 ขั้นตอนการทำแห้งเยือกแข็ง

ขั้นตอนเบื้องต้นสำหรับวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง คือ เริ่มต้นจากการเตรียมวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการหลักซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

2.7.1.1 การแช่เยือกแข็ง (Freezing) โดยเป็นการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freezing Point) เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice Crystal Formation) อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (Freezing Rate) ควรเป็นการแช่แข็งแบบเร็ว เพื่อให้เกิดผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็งแบบเร็วที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นเป่า (Air Blast Freezing) การแช่-เยือกแข็งแบบไครโอเจน (Cryogenic Freezing) และการแช่เยือกแข็งชนิดแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด (Immersion Freezing) เป็นต้น

2.7.1.2 การระเหิด (Sublimation หรือ Primary Drying) หลังจากทำการแช่แข็งจนกระทั่งได้ลักษณะตัวอย่างเป็นผลึกน้ำแข็งแล้ว ในสถานะของแข็งนี้ พบว่าค่าความดันไอของน้ำมีค่าลดลงจนกระทั่งต่ำกว่าจุดสมดุลสถานะ (Triple Point) ทำให้ลักษณะการเปลี่ยนแปลงบนเส้นสมดุลสถานะเกิดขึ้นได้เพียงสองสถานะ คือ จากสถานะของแข็งสามารถเปลี่ยนสถานะเป็นไอน้ำได้โดยตรงโดยไม่ต้องเกิดการหลอมตัวเป็นของเหลวก่อน เรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่าการระเหิด ซึ่งต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกสูงถึง 2800 กิโลจูลต่อกิโลกรัมของน้ำ โดยพลังงานดังกล่าวนั้นเป็นตัวกลางพา (Convection) ความร้อนเข้าสู่ชั้นของสารแช่แข็ง เพื่อระเหิดน้ำในรูปอิสระออกมาจากโครงผลึกสารตัวอย่าง แหล่งพลังงานข้างต้นสามารถกระทำได้โดยการใช้ปั๊มสุญญากาศเป็นตัวกำเนิดพลังงาน โดยอาศัยผลต่างของความดันภายในสารตัวอย่างกับภายในเครื่องมือเป็นตัวพาไอน้ำออกมา ความแตกต่างของความดันดังกล่าวต้องสูงกว่า 10^{-2} มิลลิบาร์ หรืออาจกล่าวได้ว่าเมื่อทำการปรับ

สภาพความดันไอของน้ำให้ต่ำกว่า 6 มิลลิบาร์ (4.6 มิลลิเมตรปรอท) ทำให้น้ำเข้าสู่จุดสมดุลสถานะ (Triple Point)

2.7.1.3 การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying) เมื่อการทำแห้งในขั้นแรกเสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นหลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา

ตารางที่ 2.1 แสดงอุณหภูมิจุดสมดุลสถานะ (Triple Point)

Substance	T [K]	P [kPa]
Butane	134.6	7×10^{-4}
Chloroform	175.43	0.870
Iodine	386.65	12.07
Nitric oxide	109.50	21.92
Oxygen	54.3584	0.152
Sulfur dioxide	197.64	1.67
Titanium	1941	5.3×10^{-3}
Water	273.16	0.61

ที่มา: อาจารย์ปณณธร ภัทรสถาพรกุล (2547)

2.7.2 การประยุกต์การทำแห้งเยือกแข็ง

2.7.2.1 ผลิตภัณฑ์อาหาร การผลิตอาหารสำหรับนักบินอวกาศเป็นจุดเริ่มของการทำแห้งอาหารแบบเยือกแข็งด้วยคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักเบา มีการคืนตัว (Rehydration) ที่รวดเร็ว สามารถรักษารูปร่าง กลิ่น รส และสารอาหารได้ ใกล้เคียงกับของสดมาก ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารแทบทุกชนิด ผัก ผลไม้ สมุนไพร เมล็ดพืช เนื้อสัตว์ อาหารทะเล ฯลฯ ถูกนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็งในหลากหลายรูปแบบ ทั้งรูปแบบอาหารสด (Fresh Food) อาหารปรุงสำเร็จพร้อมบริโภค (Cooked Food) และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (Health Product)

2.7.2.2 ผลิตภัณฑ์ด้านเภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์ด้านเภสัชกรรม (Pharmaceutical) และผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ (Medical Products) ส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างระดับโมเลกุล ซึ่ง

จำเป็นต้องรักษาองค์ประกอบและการเกิดปฏิกิริยาของสาร ซึ่งค่อนข้างไวต่อการเสื่อมสลายเนื่องจากความร้อน ดังนั้นการทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงถูกนำมาใช้กับการเตรียมตัวอย่าง ผลิตตัวยาทางเภสัชกรรมและการแพทย์ จำพวกโปรตีน ฮอร์โมน เอนไซม์ วัคซีน แบคทีเรีย ยีสต์ สารปฏิชีวนะ รวมไปถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น

2.7.2.3 **ผลิตภัณฑ์ด้านทางชีวภาพ** ผลิตภัณฑ์ที่ถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาทางชีวภาพ (Biological Specimen) มีอยู่หลายประเภทด้วยกันทั้งขนาดใหญ่ อาทิเช่น ร่างกาย อวัยวะ ทางกายวิภาค หรือขนาดเล็กระดับเซลล์โมเลกุล เป็นต้น

2.7.2.4 **ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง** ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Cosmetic) นิยมใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ ดังนั้นการทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงถูกนำมาใช้เพื่อเป็นการช่วยรักษาคุณค่าของสารชีวภาพจากธรรมชาติ ซึ่งนอกจากการระเหิดน้ำแล้ว ยังสามารถที่จะระเหิดสารทำละลายอินทรีย์ (Solvent) ในกรณีของการสกัดสารได้เช่นกัน

2.7.3 ข้อดีการทำแห้งเยือกแข็ง

การทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นการทำแห้งขณะที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงลดการสูญเสียเนื่องจากความร้อนลดการทำลายเนื้อเยื่อและโครงสร้าง จึงทำให้แห้งและมีการคืนตัว (Rehydration) ที่ดีทำให้สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้นและยังคงรักษาคุณสมบัติตามธรรมชาติได้ดี

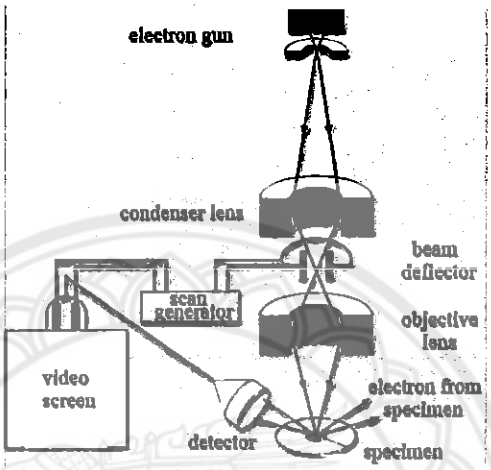
2.8 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) [14]

ใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของโลหะ และวัสดุ เป็นต้น

2.8.1 หลักการทำงาน

หลักการทำงานของเครื่อง SEM ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน แสดงดังรูปที่ 2.9 ซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (Condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ หากต้องการภาพที่มีความคมชัดจะต้องปรับให้ลำอิเล็กตรอนมีขนาดเล็ก หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนจะถูกปรับระยะโฟกัสโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective Lens) ลงไปบนผิวชิ้นงานที่ต้องการ

ศึกษา หลังจากลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนชิ้นงานจะทำให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (Secondary Electron) ขึ้นซึ่งสัญญาณจากอิเล็กตรอนทุติยภูมินี้จะถูกบันทึกแล้วถูกแปลงไปเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์จากนั้นจะถูกนำไปสร้างเป็นภาพบนจอโทรทัศน์ต่อไปและสามารถบันทึกภาพจากหน้าจอโทรทัศน์ได้เลย



รูปที่ 2.9 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง SEM [14]

ที่มา: รศ.แม้น อมรสิทธิ์ (2534)

2.8.1 การแบ่งระบบการทำงาน

2.8.1.1 ระบบการทำงานที่มีความเป็นสุญญากาศสูง (High Vacuum Mode : HV SEM) ระบบการทำงานที่มีความเป็นสุญญากาศสูงใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของหน้าตัดของโลหะและวัสดุต่างๆ เป็นต้น เหมาะสำหรับตัวอย่างทางด้านจุลชีววิทยา ชิ้นส่วนอะไหล่อิเล็กทรอนิกส์ไฟฟ้า ชิ้นส่วนอะไหล่อุตสาหกรรมรถยนต์ โลหะ และงานประเภทการวิเคราะห์ความเสียหายต่างๆ ตัวอย่างจะต้องไม่มีความชื้นและหากตัวอย่างไม่นำไฟฟ้าก่อนที่จะนำไปส่องดูจะต้องทำการฉาบเคลือบทองร้อยละ 99.99 หรือคาร์บอนก็ได้ เพื่อทำให้ตัวอย่างนั้นนำไฟฟ้า การสังเกตผลจะทำให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

2.8.1.2 ระบบการทำงานที่มีความเป็นสุญญากาศต่ำ (Low Vacuum Mode : HV SEM) ระบบการทำงานที่มีความเป็นสุญญากาศต่ำใช้ในการศึกษากรณีเดียวกับระบบการทำงานที่มีความเป็นสุญญากาศสูง แต่มีความแตกต่างกันตรงที่การเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะนำไปส่องดูด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด คือ ไม่ต้องนำตัวอย่างไปฉาบเคลือบทอง ทำให้ไม่เป็นการทำลายตัวอย่างที่เรานั้นได้ทำการทดลองมา

2.9 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) [15]

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์วัสดุที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เทคนิคนี้เป็นวิธีการทาง Spectroscopy ชนิดหนึ่งที่ศึกษาการดูดกลืนแสงของสสารในช่วงย่านความถี่ของแสง โดยการวิเคราะห์โครงสร้างสารจะอาศัยการดูดกลืนที่แตกต่างกันของแต่ละโมเลกุล ซึ่งโมเลกุลแต่ละชนิดจะมีการดูดกลืนช่วงคลื่นอินฟราเรดที่แตกต่างกันไป ประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับด้านวัสดุศาสตร์ เช่น พอลิเมอร์ช่วยในการจำแนกชนิดของพอลิเมอร์และในด้านอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

2.9.1 หลักการทำงาน

เครื่องมือถูกออกแบบมาอย่างง่ายๆ รังสีอินฟราเรดมาจากแหล่งกำเนิดจะถูกฉายไปยัง Interferometer ซึ่งตัวที่นิยมใช้ คือ Michelson Interferometer ซึ่งประกอบด้วยกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ กระจกที่ตรึงอยู่กับที่ โดยทั้งสองตั้งฉากซึ่งกันและกัน และตัวแยกแสงซึ่งเป็นอุปกรณ์กึ่งสะท้อนแสง โดยส่วนใหญ่ทำมาจากการนำฟิล์มบางของเจอร์มาเนียมวางลงบนโพแทสเซียมโบรไมด์

ที่ตัวแยกแสง ลำรังสีครึ่งหนึ่งจะทะลุผ่านไปยังกระจกที่ตรึงอยู่กับที่และอีกครึ่งหนึ่งจะสะท้อนไปยังกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ หลังจากนั้นลำรังสีก็จะสะท้อนจากกระจกกลับมารวมกันที่ตัวแยกแสงเกิดการแทรกสอดขึ้น หลังจากนั้นลำรังสีก็จะผ่านไปยังตัวอย่างและในที่สุดก็จะตกลงบนเครื่องตรวจวัด

Path Difference ระหว่างลำรังสีที่ถูกแยกออกเกิดขึ้นจากระยะทางสัมพัทธ์ระหว่างกระจกทั้งสอง ถ้าแขนยึดกระจกทั้งสองข้างของ Interferometer ความยาวเท่ากัน ลำรังสีทั้งสองก็จะเดินทางด้วยระยะทางที่เท่ากัน มีเฟสตรงกัน ทำให้สัญญาณที่ไปถึงเครื่องตรวจวัดมีค่ามากที่สุด เมื่อกระจกเคลื่อนที่เป็นระยะทาง $\lambda/4$ ระยะทางเดินของรังสีจะเปลี่ยนเป็น $\lambda/2$ รังสีทั้งสองมีเฟสต่างกัน 180 องศา การแทรกสอดจะอยู่ในตำแหน่งหักล้าง เมื่อเคลื่อนกระจกไปเป็นระยะทางอีก $\lambda/4$ ระยะทางเดินของรังสีจะเปลี่ยนเป็น λ รังสีทั้งสองลำจะกลับมามีเฟสตรงกัน

เมื่อกระจกเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ความเข้มของสัญญาณที่เครื่องตรวจวัดวัดได้จะมีลักษณะของ Interferogram เป็นรูปของคลื่น Sine โดยกราฟนั้นจะพล็อตระหว่างการตอบสนองที่เครื่องตรวจวัดบันทึกได้และเวลาที่กระจกมีการเคลื่อนที่ ถ้าตัวอย่างเกิดการดูดกลืนรังสีที่ค่าความถี่นี้

ขนาดของแอมพลิจูดจะลดลงโดยสัมพันธ์กับปริมาณของตัวอย่าง หลังจากนั้นใช้ Fourier Transform ซึ่งเป็นฟังก์ชันทางคณิตศาสตร์ในการแปลงผลที่ได้ (ขึ้นกับเวลา) ให้กลายเป็นค่าความเข้มกับความถี่

2.9.2 การวิเคราะห์ IR สเปคตรัม [16]

IR สเปคตรัมมีประโยชน์ในการหาหมู่ฟังก์ชั่นของโมเลกุล แต่เนื่องจากมีพีคจำนวนมากใน IR สเปคตรัม เราคงไม่สามารถที่จะคาดหวังว่าจะรู้ทุกพีคใน IR สเปคตรัม ขั้นตอนต่อไปนี้อาจเป็นแนวทางเริ่มต้นในการแปรข้อมูลจาก IR สเปคตรัมได้ ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ซม$^{-1}$	หมู่ฟังค์ชัน	รายละเอียด
3600-3400	O–H stetching	3650-3590 cm^{-1} (sh, w) แอลกอฮอล์อิสระ 3400-3200 cm^{-1} (b) แอลกอฮอล์ที่เกิดพันธะ-ไฮโดรเจน 3400-2400 cm^{-1} (vs, vb) กรดคาร์บอก-ซิลิก
3500-3200	N–H stretching	3200-3400 cm^{-1} (m) 1° เอมีนและเอมีดมี 2 แถบ 3200-3400 cm^{-1} (w) 2° เอมีนและเอมีดมี 1 แถบ
3300 (vs)	=C–H stretching	3300 cm^{-1} อัลไคน์ที่มี =C–H ที่ปลายโซ่
3100-3000 (w, sh)	=C–H stretching	อัลคีนและเบนซีน (อาจมีหลายพีค)
3000-2800	C–H stretching	หมู่ CH_3, CH_2 และ CH ของอัลเคน
2850-2780	C–H stretching	แอลดีไฮด์
2250-2225	C=N stretching	ไนทริล (m)
2260-2100	C=C stretching	อัลไคน์ (w) โมเลกุลสมมาตรจะไม่มีแถบนี้
1820-1760 (s)	C=O stretching	แอนไฮไดรด์ (s) มี 2 แถบ

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ซม$^{-1}$	หมู่ฟังค์ชัน	รายละเอียด
1800 (s)	C=O stretching	กรดคลอไรด์
1770 (s)	C=O stretching	แกมม่า-แลกโตน
1735 (s)	C=O stretching	เอสเทอร์
1725 (s)	C=O stretching	แอลดีไฮด์
1715 (s)	C=O stretching	คีโตน
1710 (s)	C=O stretching	กรดคาร์บอกซิลิก
1690-1650 (s)	C=O stretching	เอไมด์
1650-1600 (w)	C=C stretching	อัลคีน
1650-1590 (s-m)	N–H bending	1° เอมีน
1650-1550 (w)	N–H bending	2° เอมีน
1620-1590 (s)	N–H bending	1° เอมีด
1550-1510 (s)	N–H bending	2° เอมีด
1600 1580 1500 และ 1450	C=C stretching	เบนซินและเบนซินที่มีหมู่แทนที่ความเข้ม ไม่แน่นอน อาจมี 2 3 หรือมีทั้ง 4 แถบ
1520 (s) และ 1350 (s)	NO_2bending	สารประกอบไนโตร
1465-1450	C–H bending	หมู่ CH_2
1450-1375	C–H bending	หมู่ CH_3
1400-1000	C–F stretching	สารประกอบฟลูออไรด์
1300-1150	CH_3–X	สารประกอบฮาโลเจน
1300-1000	C–O stretching	อีเธอร์และเอสเทอร์
1220	C–O stretching	ฟีนอล
1150	C–O stretching	3° แอลกอฮอล์
1100	C–O stretching	2° แอลกอฮอล์
1050	C–O stretching	1° แอลกอฮอล์

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ซม$^{-1}$	หมู่ฟังค์ชัน	รายละเอียด
990 และ 910	C–H (OOP bending)	อัลคีน (หมู่แทนที่ 1 หมู่ : RCH = CH_2)
970	C–H (OOP bending)	อัลคีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่ : Trans)
890	C–H (OOP bending)	อัลคีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่ : R_2C = CH_2)
815	C–H (OOP bending)	อัลคีน (หมู่แทนที่ 3 หมู่ : R_2C = RCH)
700-690	C–H (OOP bending)	อัลคีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่ Cis)
750 และ 690	C–H (OOP bending)	เบนซีน (หมู่แทนที่ 1 หมู่)
750	C–H (OOP bending)	เบนซีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่แบบ ออโท)
780 และ 700	C–H (OOP bending)	เบนซีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่ แบบ เมตา)
825-800	C–H (OOP bending)	เบนซีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่ แบบ พารา)
800-600	C–Cl	สารประกอบคลอไรด์
600-500	C–Br	สารประกอบโบรไมด์
~ 500	C–I	สารประกอบไอโอไดด์

ที่มา: มหาวิทยาลัยรามคำแหง (2556)

2.10 เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปคโตรสโคปี (Fluorescence Spectroscopy) [17]

เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสารโดยการอาศัยการดูดกลืนรังสียูวีที่ส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้นและมีการสั่นภายในโมเลกุลจากระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น (Ground state) เข้าไปสู่ระดับชั้นพลังงานที่สูงขึ้น (Excited State) เรียกว่าการดูดพลังงาน (Excite Energy) โมเลกุลที่มีการเคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับของชั้นพลังงานที่สูงจะไม่มีความเสถียร จึงมีการปลดปล่อยพลังงานและตกลงมาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่า พลังงานที่โมเลกุลปลดปล่อยจากระดับชั้นพลังงานกระตุ้นชั้นที่หนึ่งสู่ระดับชั้นพลังงานสถานะพื้นจะทำให้เกิดการคายโฟตอน (Emission of Photon) ทำให้เกิดสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนต์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด ในการประยุกต์การใช้งาน เช่น การศึกษาทางพิษวิทยา การศึกษาทางการแพทย์ การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น พลาสติก สารอินทรีย์ เป็นต้น สำหรับเครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปคโตรสโคปี (Fluorescence Spectroscopy) ในงานนี้ใช้สำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อประเมินร้อยละความสามารถในการกำจัดเซลล์ [6] โดยร้อยละในการกำจัดเซลล์คำนวณได้จาก

$$\text{ร้อยละในการกำจัดเซลล์} = [(S_1 - S_2)/S_1]\times 100 \qquad (2.1)$$

เมื่อ S_1 = ปริมาณเซลล์ของหลอดลมสุกรที่ไม่ผ่านการกำจัดเซลล์

S_2 = ปริมาณเซลล์ของหลอดลมหมูที่ผ่านการกำจัดเซลล์

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2006 H. Guillin และคณะ [18] ทำการเตรียมหลอดลมปราศจากเซลล์จากหนูและกระต่าย จากนั้นทำการตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ หลอดลมหนูและกระต่ายถูกกำจัดเซลล์โดยการใช้สารซักฟอกร่วมกันเอนไซม์ อีกทั้งได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพบริเวณด้านในพื้นผิวหลอดลมและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยได้ตรวจสอบสัณฐานวิทยาและการปลูกถ่ายในร่างกายตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าเมทริกซ์หลอดลมปราศจากเซลล์ที่ได้ถูกนำไปปลูกถ่ายนั้นเป็นเนื้อเยื่อ Allogeneic มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยไม่ส่งผลในการตอบสนองการอักเสบของเนื้อเยื่อผู้รับ และไม่ยับยั้งการเจริญเติบโต รวมไปถึงไม่ส่งผลต่อการหลั่งเอนไซม์อะไมเลสของต่อมน้ำลาย

ในปี ค.ศ. 2007 I. Prasertsung และคณะ [6] ได้นำเสนอวิธีการใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงในการผลิตผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังสุกรสด จากการศึกษาพบว่า

การใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดัน ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ โดยการเพิ่มแรงดันสามารถช่วยให้เอนไซม์แทรกซึมเข้าสู่หนังสุกรได้ดีขึ้น ส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น จากการศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์พบว่าการอัดคลายแรงดันร่วมกับเอนไซม์ Dispase II สามารถกำจัดเซลล์ได้ดีกว่าเอนไซม์ชนิด Tripsin จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันร่วมกับเอนไซม์มีศักยภาพสูงในการใช้เตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังสุกรเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง (Skin Tissue Engineering)

ในปี ค.ศ. 2008 P. Macchiarini และคณะ [19] ทำการศึกษาการปลูกถ่ายหลอดลมทดแทนที่ผ่านกระบวนการผลิตทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อให้กับผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจระยะสุดท้าย โดยนำหลอดลมจากผู้บริจาคมากำจัดเซลล์และยีนส์แปลกปลอม (MHC Antigen) ด้วยสารซักฟอกร่วมกับเอนไซม์ จากนั้นป้อนเซลล์เยื่อบุ (Epithelial Cells) และมิเซนไคยมอลสเต็มเซลล์ (Mesenchymal Stem Cell) ของผู้ป่วย แล้วจึงปลูกถ่ายลงบนหลอดลมทางด้านซ้าย พบว่าหลอดลมที่ปลูกถ่ายเกิดการตอบสนองต่อระบบทางเดินหายใจได้ทันที ไม่ต่อต้านระบบภูมิคุ้มกันและระบบร่างกายของผู้ป่วย และผู้ป่วยยังคงสามารถใช้ชีวิตประจำวันได้อย่างปกติภายในระยะเวลา 4 เดือน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อหลอดลมที่ถูกผลิตขึ้นโดยวิธีทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีสมบัติเชิงกลที่ช่วยให้การทำงานของหลอดลมผู้ป่วยเป็นปรกติได้โดยไร้ความเสี่ยงจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ในปี ค.ศ. 2009 P.Baptista และคณะ [20] ได้ศึกษาการกำจัดเซลล์อวัยวะทุกส่วนในร่างกาย เนื่องจากอวัยวะที่ถูกกำจัดเซลล์นั้นโครงสร้างหลอดเลือดมักถูกทำลายไปด้วย จึงได้มีการศึกษาโดยนำอวัยวะและเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆของสัตว์ที่มีขนาดไม่เกิน 30 เซนติเมตร พร้อมด้วยสารละลายกำจัดเซลล์ เพื่อเลือกกำจัดเฉพาะองค์ประกอบของเซลล์ในส่วนของเนื้อเยื่อ แต่ยังคงสภาพโครงสร้างเซลล์และหลอดเลือดไว้ หลอดเลือดจะถูกกำจัดเซลล์โดยการป้อนสารละลายกำจัดเซลล์ผ่านหลอดเลือดเส้นใหญ่ซึ่งจะแยกออกเป็นเส้นเลือดฝอยจำนวนมาก สารละลายกำจัดเซลล์จะถูกปล่อยออกที่ทางหลอดเลือดเส้นใหญ่ จากการวิเคราะห์พบว่าสามารถกำจัดเซลล์ได้และยังคงสภาพโครงสร้างหลอดเลือดไว้อยู่

ในปี ค.ศ. 2010 J. Fitzpatick และคณะ [21] ได้ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารเคมีที่ถูกใช้ในการกำจัดเซลล์ภายในหลอดเลือดของสุกร ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการเตรียมเนื้อเยื่อหลอดเลือดเพื่อนำไปใช้งานในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยนำหลอดเลือดสุกรมากำจัดเซลล์ด้วยสารละลายกำจัดเซลล์ที่มีชนิดของสารเคมีและส่วนประกอบแตกต่างกัน 3 ชนิด ชนิดที่ 1 คือ สารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ถูกผสมกับ EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ใน PBS สารชนิดที่ 2 คือ

สารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 0.075 ใน PBS และชนิดที่ 3 คือ สารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ที่ถูกผสมกับ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ใน PBS จากการศึกษาพบว่า สารละลายชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ค่อนข้างทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติเชิงกลภายในหลอดเลือดและไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลล์ VSMCs ในเนื้อเยื่อหลอดเลือด สารละลายชนิดที่ 3 สามารถย่อยสลายเซลล์ VSMCs ได้ อีกทั้งเกิดการสูญเสียสมบัติเชิงกลของหลอดเลือดน้อยที่สุด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารละลายชนิดที่ 3 นั้นเป็นตัวเลือกที่มีความเหมาะสมที่สุดในการเตรียมเนื้อเยื่อหลอดเลือดชนิด Xenografts และ Allografts

ในปี ค.ศ. 2010 N. Remlinger และคณะ [22] ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของการเป็นวัสดุทดแทนของหลอดลมสุกรปราศจากเซลล์และน้ำ เมื่อถูกนำไปปลูกถ่ายลงบนสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยนำเนื้อเยื่อหลอดลมสุกรที่ถูกกำจัดเซลล์ออกแล้วปลูกถ่ายลงบนบริเวณกล้ามเนื้อหน้าท้องและบริเวณหลอดลมของสุนัข วิเคราะห์เนื้อเยื่อและสมบัติเชิงกลภายหลังทำการปลูกถ่ายตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 บริเวณที่ถูกปลูกถ่ายถูกตรวจสอบด้วยการส่องกล้องตรวจหลอดลมและการตรวจสอบโดยใช้ภาพถ่ายรังสี ชิ้นส่วนที่ปลูกถ่ายลงไปถูกนำออกมาตรวจสอบโดยเทคนิคการวิเคราะห์เนื้อเยื่อเพื่อตรวจวัดกระบวนสร้างเยื่อบุผิวและความแข็งแรงของกระดูกอ่อน พบว่าเนื้อเยื่อหลอดลมที่ปลูกถ่ายลงบนกล้ามเนื้อหน้าท้องของสุนัขยังคงรักษาสมบัติเชิงกลเดิมของหลอดลมไว้อยู่แม้เวลาจะผ่านไปถึง 8 สัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อที่ปลูกลงบนบริเวณหลอดลมของสุนัข พบว่ามีการพัฒนาของคอลัมนาร์ (Columnar) ซูโดสแตรทิฟายด์ (Pseudostratified) และซีเลียเอต (Ciliated) ภายในระบบทางเดินหายใจ แต่โครงสร้างกระดูกอ่อนถูกทำลายและถูกจำกัดการสร้างกระดูกอ่อนขึ้นใหม่ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์หลอดลมมีความเฉพาะเจาะจงในการรองรับเซลล์ที่เข้ามาและมีสมบัติเชิงกลที่มีความแข็งแรงเพียงพอในการทนต่อแรงกดดันทางสรีรวิทยาในระยะสั้น อย่างไรก็ตามสำหรับในระยะยาวควรมีการเพาะเลี้ยงเซลล์คอนโดรไซท์และหลอดเลือดก่อน

ในปี ค.ศ. 2010 S. Haygal และคณะ [23] ได้ทำการตรวจสอบภูมิคุ้มกันและความสมบูรณ์ของโครงสร้างหลอดลมสุกรปราศจากเซลล์ชนิดแอลโลกราฟท์ โดยมีการเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 วิธีการกำจัดเซลล์ วิธีการที่ 1 คือ การกำจัดเซลล์โดยใช้สาร Sodium Deoxycholate และ DNAse I วิธีการที่ 2 คือ กำจัดเซลล์โดยใช้ Triton X-100 Pronase และ CHAPS จากนั้นนำหลอดลมสดและหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ใส่ไว้ในอุปกรณ์ที่ปิดผลึกไว้อย่างดี แล้วเพิ่มความดันลบ ภาพหลอดลมจากการตรวจด้วยเครื่องซีทีสแกนที่ความดันลบต่างๆ ถูกนำมาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ Luminal กับความดัน เพื่อตรวจสอบความยืดหยุ่นของหลอดลม นำชิ้นส่วนหลอดลมไปฝังไว้ใน

พาราฟินและย้อมด้วย H&E DAPI MHCI และ MHCII เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของเนื้อเยื่อ ในระดับห้องปฏิบัติการจะมีการตรวจสอบการเจริญเติบโตของเม็ดเลือดขาวในเนื้อเยื่อปลูกถ่ายทั้งชนิด Syngeneic และ Allogeneic ด้วย ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าหลอดลมสดเกิดการเสียรูปที่ความดัน -30 มิลลิเมตรปรอท หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์ด้วยวิธีการที่ 1 จำนวน 5 รอบ จะเสียรูปที่ความดัน -12 มิลลิเมตรปรอท และหลอดลมได้ที่ผ่านการกำจัดเซลล์ด้วยวิธีการที่ 2 จำนวน 5 รอบ เสียรูปที่ความดันใกล้เคียงกับหลอดลมสด นอกจากนี้ยังพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ในปี ค.ศ. 2012 N. Hou และคณะ [24] ได้ศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์หลอดลมที่ได้ผ่านการกำจัดเซลล์โดยเทคนิคการฉีดสารเคมีเข้าสู่หลอดลมเพื่อเตรียมในการปลูกถ่าย โดยนำหลอดลมกระต่ายมาทำการกำจัดเซลล์ด้วยการฉีดสารกำจัดเซลล์โซเดียมโดเด็กซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate) เข้าสู่หลอดลมของกระต่ายผ่านเส้นเลือด หลอดลมส่วนหนึ่งถูกนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบเนื้อเยื่อ และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด อีกส่วนหนึ่งนำไปปลูกถ่ายลงบนม่านแขวนกระเพาะของกระต่าย ชิ้นส่วนหลอดลมของกระต่ายจะถูกเก็บมาตรวจสอบเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ โดยมีการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจสอบเนื้อเยื่อ และการตรวจสอบอิมมูโนพยาธิวิทยา พบว่าหลอดลมที่ได้ผ่านการกำจัดเซลล์ด้วยโซเดียมโดเด็กซิลซัลเฟตมีความโปร่งใสภายใน 2 ชั่วโมง การวิเคราะห์เนื้อเยื่อและการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่าวิธีการฉีดสารกำจัดเซลล์เพื่อกำจัดเซลล์ให้ผลลัพธ์ที่ดี แทบจะไม่พบเซลล์เดิมและนิวเคลียส ในขณะที่รูพรุนมากขึ้นและรักษาเส้นใยคอลลาเจนไว้ได้ในโครงสร้าง กระบวนการสร้างหลอดเลือดสามารถเห็นได้อย่างชัดเจนในสัปดาห์ที่ 4 และเกิดการเจริญเติบโตของกระดูกอ่อนขึ้นในสัปดาห์ที่ 8 จากการวิเคราะห์เนื้อเยื่อแสดงให้เห็นเซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocytes) และหลอดเลือดได้อย่างชัดเจน ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าโครงเลี้ยงเซลล์หลอดลมปราศจากเซลล์มีความสามารถใช้งานกับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อฟื้นฟูหลอดลมได้

ในปี ค.ศ. 2012 M. Zang และคณะ [25] ได้ศึกษาผลกระทบของเทคนิคการใช้สารซักฟอกร่วมกับเอนไซม์ในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์หลอดลมปราศจากเซลล์ที่ส่งผลต่อสารองค์ประกอบนอกเซลล์ของหลอดลมและศึกษาลักษณะสิ่งแวดล้อมในเมทริกซ์ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายเซลล์ โดยนำหลอดลมหนูไปกำจัดเซลล์ด้วยการใช้สารซักฟอกร่วมกับเอนไซม์ แล้วทำการตรวจสอบแอนติเจนและลักษณะของเซลล์ในระหว่างกระบวนการ ตรวจวัดสมบัติเชิงกล ทดสอบความเป็นพิษเพื่อประเมินความเข้ากันได้ของเมทริกซ์ มีการนำกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) มาใช้ในการ

ประเมินพื้นผิวในระดับจุลภาคของเมทริกซ์ รวมไปถึงใช้ในการประเมินปฏิสัมพันธ์ระหว่างหลอดลมปราศจากเซลล์กับเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดลม พบว่าการใช้สารซักฟอกร่วมกับเอนไซม์ในการกำจัดเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารองค์ประกอบนอกเซลล์ของหลอดลม แต่ยังคงสามารถรักษาโครงสร้างที่สำคัญและสมบัติเชิงกลไว้ได้

ในปี ค.ศ. 2012 N. M. Neves และคณะ [26] ทำการศึกษาความเหมาะสมในการเป็นวัสดุทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อของเอ็นม้าที่ถูกกำจัดเซลล์ด้วยสารซักฟอกและเอนไซม์ โดยได้ทำการผลิตวัสดุนี้ด้วยวัฏจักรการเยือกแข็งและการละลาย (Freeze-Thaw) บ่มใน SDS ด้วยความเข้มข้นที่ร้อยละ 2 ผ่านกระบวนการแยกเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ทรีตเมนต์ด้วย DNase-I และฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ในการประเมินผลจะทำการประเมินโปรตีนทั้งหมด คอลลาเจน ไกลโคซามีโนไกลแคน และกรดดีเอ็นเอด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์ มีการตรวจสอบทางชีวเคมีและการประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ด้วย ผลสรุป คือ โครงเลี้ยงเซลล์เอ็นปราศจากเซลล์เหล่านี้มีความเหมาะสมในการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ซับซ้อน เนื่องจากได้ถูกกำจัดเซลล์ออกมากพอ ทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ อีกทั้งยังรักษาโครงสร้างเดิมของเอ็นไว้ได้

ในปี ค.ศ. 2012 S. Baiguera และคณะ [27] ได้ทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพและการย่อยสลายของเมทริกซ์สารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหลอดลมมนุษย์ที่ผ่านการกำจัดเซลล์ โดยนำหลอดลมมนุษย์ที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์มาเก็บไว้ในน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี จากนั้นวิเคราะห์แอนติเจน โครงสร้าง สมบัติเชิงกล และคุณสมบัติในการสร้างหลอดเลือดใหม่ไปเลี้ยงเซลล์เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์มาใหม่ ผลการศึกษาพบว่าหลอดลมเกิดการสูญเสียสภาพแวดล้อมของสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติน พบว่าสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติในการสร้างหลอดเลือดใหม่เข้าไปเลี้ยงเซลล์ลดลงเช่นกัน จึงสรุปได้ว่าหลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์ไม่สามารถเก็บไว้ใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นเวลานานได้

ในปี ค.ศ. 2013 L. Partington และคณะ [28] ได้ศึกษาผลกระทบของกระบวนกำจัดเซลล์ด้วยสารซักฟอกร่วมกับเอนไซม์ต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีของหลอดลม ซึ่งมีความสำคัญต่อการรับเซลล์ใหม่เข้ามาในโครงเลี้ยงเซลล์ กระบวนการสร้างหลอดเลือด สภาวะสมดุลของกระดูกอ่อน รวมไปถึงสถานะทางชีวกลศาสตร์ หลอดลมบริจาคของมนุษย์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการการกำจัดเซลล์ถูกใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง กำจัดเซลล์หลอดลมมนุษย์ด้วยการนำหลอดลมมนุษย์ที่ถูกเก็บอยู่ในสารละลาย PBS มากำจัดเซลล์โดยใช้สารซักฟอกร่วมกับเอนไซม์ กระบวนการกำจัดเซลล์สามารถกำจัดเซลล์ส่วนใหญ่

ออกไปได้ แต่ Chondrocytes และดีเอ็นเอยังคงอยู่ในหลอดลมภายหลังทำการกำจัดเซลล์ 25 รอบ Fibronectin ยังถูกพบอยู่ใน Lamina Propria และ Laminin ภายใต้เยื่อหุ้มเบสเมนต์ พบการสะสม DNA อยู่ในองค์ประกอบภายนอกเซลล์ ปริมาณคอลลาเจนบนเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ลดลง GAG ในกระดูกอ่อนเริ่มลดลงที่กระบวนการกำจัดเซลล์รอบที่ 20 เป็นต้นไป ความต้านทานแรงดึงลดลงตลอดระยะเวลาในการดำเนินกระบวนการ แต่ความต้านทานแรงดึงจะคงที่ ณ เวลาหนึ่ง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ GAG อาจนำไปสู่การสูญเสียความสมบูรณ์เชิงกลของหลอดลม

บทที่ 3

วิธีการดำเนินโครงงาน

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 หลอดลมสุกร จากสุกรอายุ 3-4 เดือน

3.1.2 Triton X-100

3.1.3 Ammonium Hydroxide

3.1.4 Hoechst Dye 33258

3.1.5 เครื่องอัดคลายแรงดัน

3.1.6 เครื่องปั่นกวนสาร รุ่น RW 20 Digital ยี่ห้อ IKA

3.1.7 เครื่อง Fluorescence Spectrophotometer

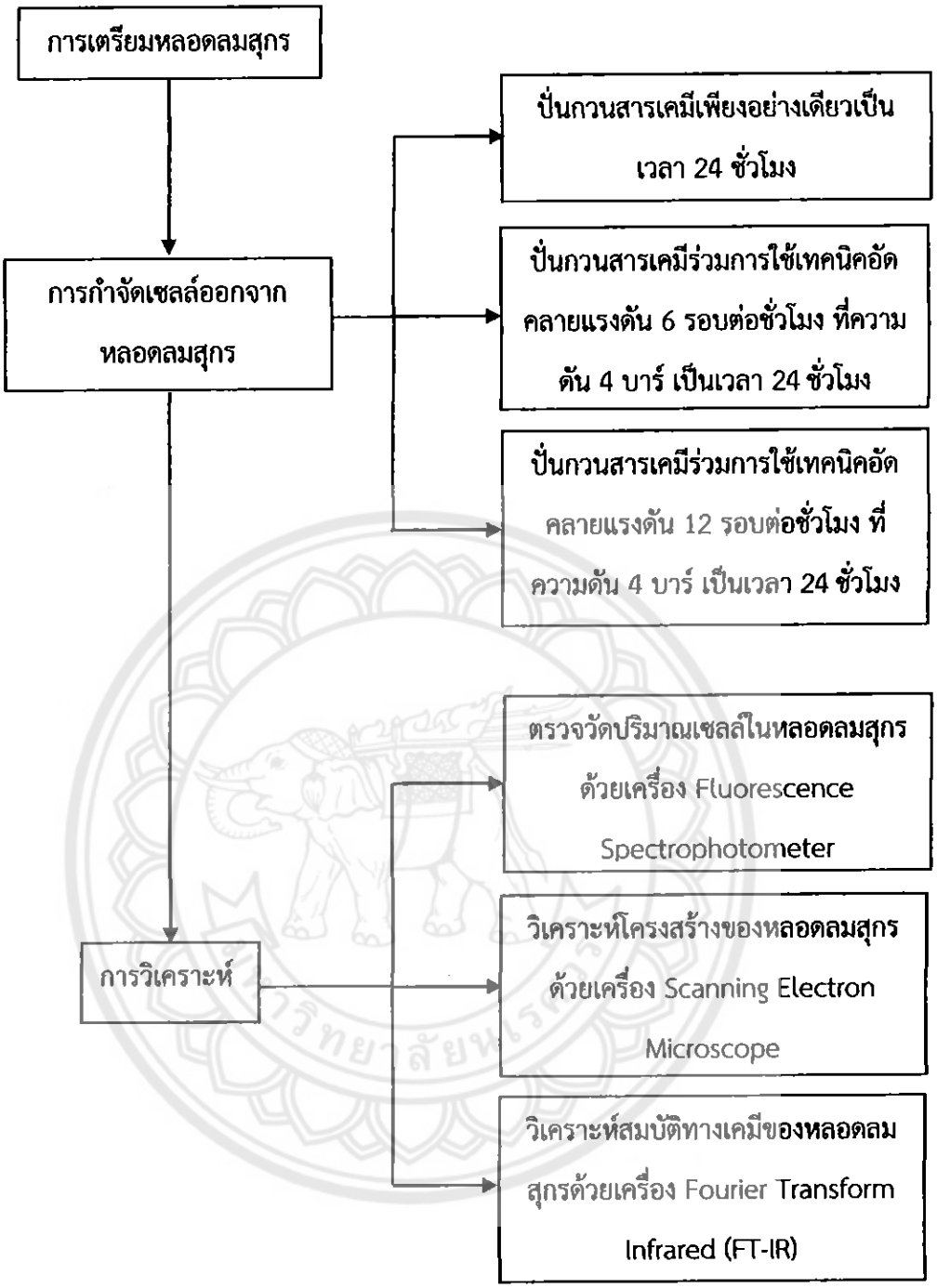
3.1.8 เครื่อง Scanning Electron Microscope

3.1.9 เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dryer) รุ่น FreeZone® 2.5 Liter Freeze Dry System จากบริษัท Labconco จำกัด

3.1.10 เครื่อง Fourier Transform Infrared (FT-IR)

3.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษาการพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกรด้วยกระบวนการปั่นกวนด้วยสารเคมีและกระบวนการอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้สารเคมี ดำเนินการโดยนำหลอดลมสุกรสด จากสุกรที่มีอายุอยู่ประมาณ 3-4 เดือน นำมาผ่านกระบวนการการกำจัดเซลล์ ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการ แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนภาพขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 การเตรียมหลอดลมสุกร

3.2.1.1 การทำความสะอาดหลอดลมสุกร โดยจะใช้หลอดลมสุกรที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร จากสุกรที่มีอายุระหว่าง 3–4 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 3.2 เนื่องจากเป็นสุกรที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดลมสุกรนั้นใกล้เคียงกับหลอดลมมนุษย์มากที่สุด มาทำการล้างด้วยน้ำสะอาด

รูปที่ 3.2 หลอดลมสุกรอายุ 3-4 เดือน

3.2.1.2 การกำจัดพังผืดออกจากหลอดลมสุกร โดยนำหลอดลมสุกรที่ได้มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปกำจัดพังผืดที่ติดหลอดลมอยู่ออกโดยการเฉือนด้วยมีดสะอาด จากนั้นนำไปตัดให้มีขนาดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.3

ก) ข)

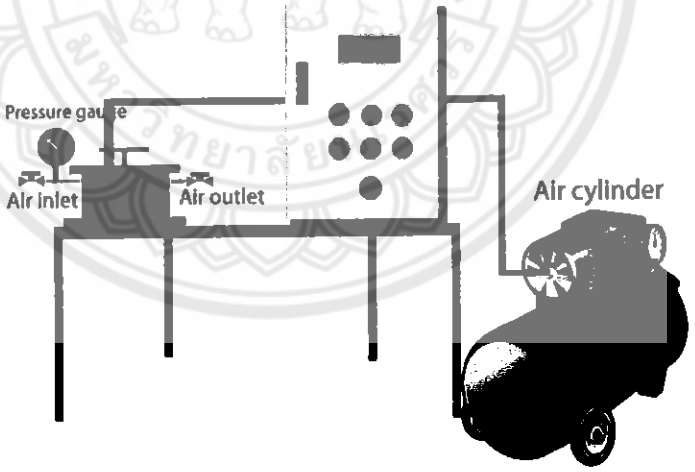
รูปที่ 3.3 ก) ขั้นตอนการกำจัดพังผืดออกจากหลอดลมสุกร ข) หลอดลมสุกรที่ผ่านการกำจัดพังผืด

3.2.2 การกำจัดเซลล์ในหลอดลมสุกร

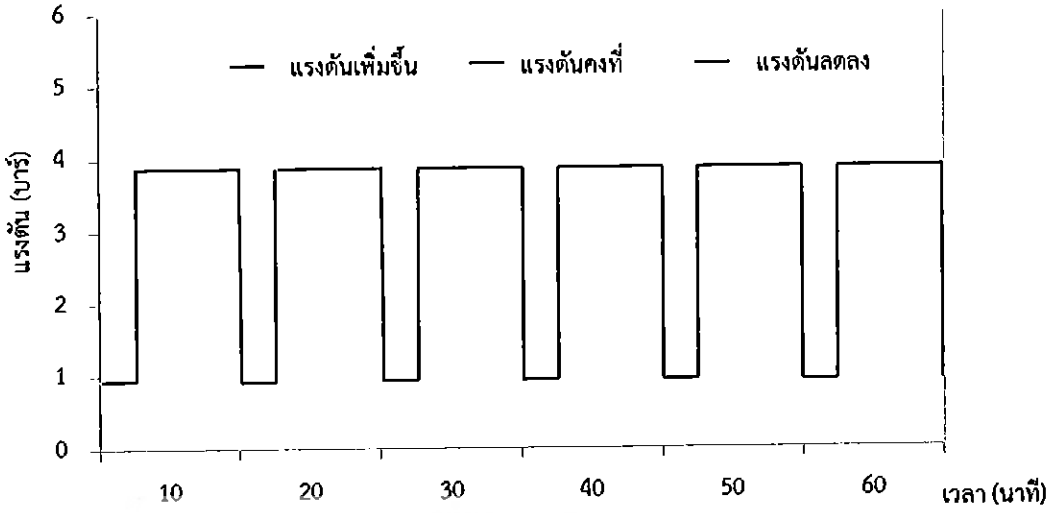
การกำจัดเซลล์ในหลอดลมสุกรโดยจะนำหลอดลมสุกรที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วมาทำการกำจัดเซลล์โดยมีการแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

3.2.2.1 การกำจัดเซลล์โดยนำหลอดลมสุกรด้วยการปั่นกวน โดยนำหลอดลมสุกรที่เตรียมได้ปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยจะมีทำการเปลี่ยนสารละลายใหม่ในทุกๆ 1 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิที่ 5-15 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 การกำจัดเซลล์โดยประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันร่วมกับสารเคมี โดยนำหลอดลมสุกรมาปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในปริมาตร 300 มิลลิลิตร จะมีการเปลี่ยนสารละลายใหม่ในทุกๆ 1 ชั่วโมง และใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน 6 และ 12 รอบต่อชั่วโมง ที่ความดัน 4 บาร์ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 5-15 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วงแสดงในรูปที่ 3.4 ทั้งนี้จะทำการยกตัวอย่างการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่สภาวะของการอัดคลายแรงดันที่จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง (1 รอบต่อ 10 นาที) ที่ความดัน 4 บาร์ ดังแสดงรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.4 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง



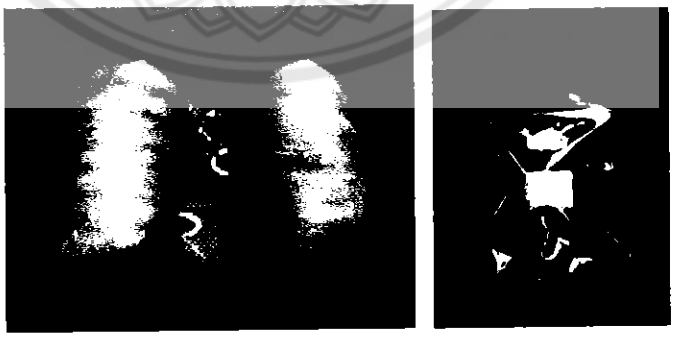
รูปที่ 3.5 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ 4 บาร์ จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานของหลอดลมสุกร

การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างสัณฐานของหลอดลมสุกรทำได้โดยนำหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์แล้วไปนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เพื่อดูลักษณะโครงสร้างสัณฐานของหลอดลมสุกร โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังต่อไปนี้

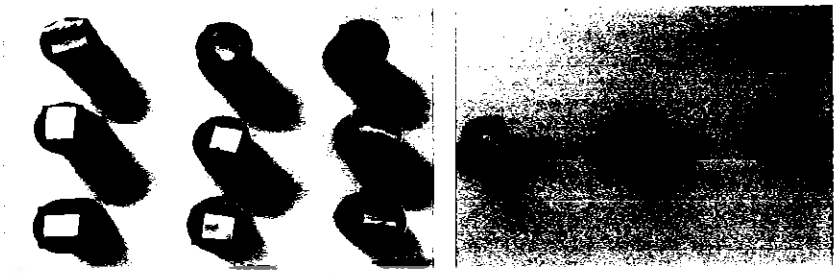
3.3.1.1 ขั้นตอนการทำแห้ง โดยนำหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์มาทำให้แห้งโดยการใช้เทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Drying) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.5



ก) ข)

รูปที่ 3.6 ก) หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ข) หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง

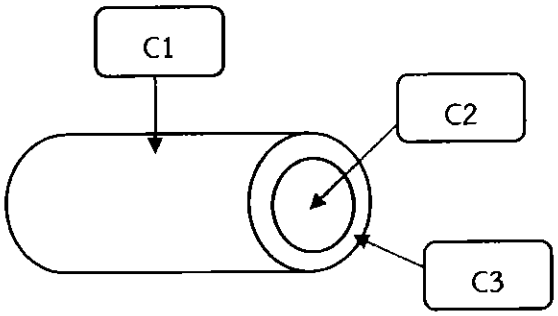
3.3.1.2 ขั้นตอนการฉาบเคลือบทอง โดยนำหลอดลมสุกรที่ผ่านการทำแห้งแล้วตัดให้มีขนาดที่พอดีกับสตับ จากนั้นจึงนำไปฉาบเคลือบทองร้อยละ 99.99 บนผิวตัวอย่างเพื่อให้นำไฟฟ้าก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด



ก) ข)

รูปที่ 3.7 ก) หลอดลมสุกรที่ผ่านการทำแห้งแล้ว ตัดให้มีขนาดพอดีกับสตับ
ข) นำไปฉาบเคลือบทองร้อยละ 99.99

3.3.1.3 ขั้นตอนการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) เมื่อผ่านการฉาบเคลือบทองแล้วนำเข้าเครื่อง จากนั้นใช้โหมดที่มีความเป็นสุญญากาศสูง (High Vacuum Mode, HV SEM) ในการวิเคราะห์ผล ที่ความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์ WD Working Distance 15 มิลลิเมตร Spot Size 1 Aperture 40 ไมโครเมตร กำหนดกำลังขยายที่ 50 และ 200 เท่า บริเวณที่จะทำการส่องมีทั้งหมด 3 ด้าน คือ พื้นผิวด้านนอกหลอดลมสุกร (C1) พื้นผิวด้านในของหลอดลมสุกร (C2) และพื้นผิวหน้าตัดของหลอดลมสุกร (C3) ดังแสดงในรูปที่ 3.7 จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบระหว่างหลอดลมสุกรที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์และหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์



รูปที่ 3.8 แสดงบริเวณที่ทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

3.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของหลอดลมสุกร

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของหลอดลมสุกรเพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีต่างๆ ที่อยู่ภายในหลอดลมสุกรโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FT-IR) โดยจะทำการศึกษาสมบัติทางเคมีของคอลลาเจนที่อยู่ภายในหลอดลมสุกร การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการนำหลอดลมสุกรที่ผ่านการทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Drying) จากนั้นจึงนำไปวัดด้วยเครื่อง FT-IR และตรวจวัดด้วย Attenuated Total Reflectance (ATR) Accessories ที่ Resolution 8 ซ.ม.$^{-1}$

3.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในหลอดลมสุกร

วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในหลอดลมสุกรด้วยการบดให้ละเอียดและวิธีวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ [6] เพื่อประเมินร้อยละความสามารถในการกำจัดเซลล์ หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการจะถูกบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง (Mortar) ภายใต้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำชิ้นส่วนหลอดลมสุกรที่ถูกฝังไว้นี้ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟูกอล (Microcentrifugal Tube) 100 มิลลิกรัม และพร้อมกับการเติมสารละลาย SDS ใน Saline–Sodium Citrate (SSC) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสารผสมที่บ่มไว้นี้ใส่ลงบน Black 96-Well Plates และย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 และนำไปตรวจสอบความเข้มของการเรืองแสงด้วยเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer ที่การกระตุ้นในช่วงความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร และการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง โดยใช้หลอดลมสุกรที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์เป็นตัวอย่างอ้างอิงและใช้กราฟมาตรฐานของค่าการเรืองแสงกับค่าปริมาณเซลล์ Fibroblast ของหนูในการเทียบปริมาณเซลล์ของหลอดลมสุกรสำหรับร้อยละการกำจัดเซลล์คำนวณได้จากสมการที่ 2.1

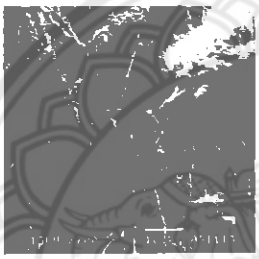
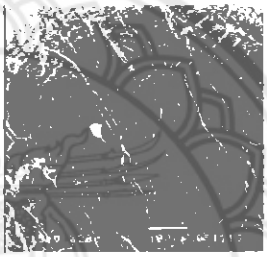
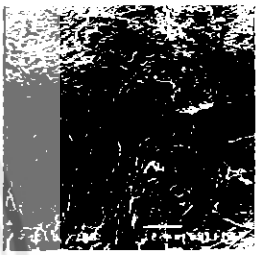
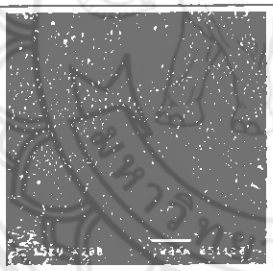
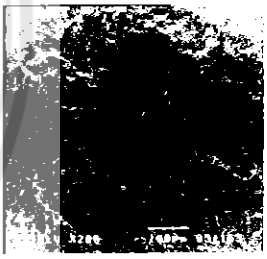
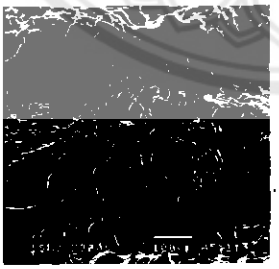
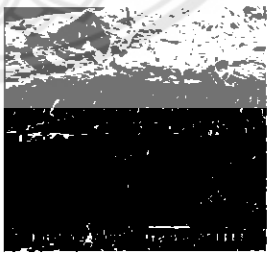
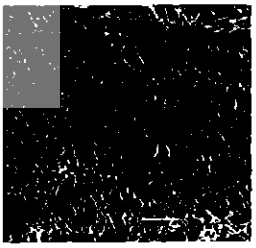
บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิเคราะห์

การทดลองในครั้งนี้ได้พัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกร กระบวนการกำจัดเซลล์เริ่มต้นจากขั้นตอนการเตรียมหลอดลมสุกร จากจึงนั้นนำไปกำจัดเซลล์โดยทำการแบ่งกลุ่มตัวอย่างในการทดลองเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน กลุ่มตัวอย่างที่ 1 จะทำการทดลองโดยปั่นกวนในสารเคมีเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ 2 จะทำการทดลองโดยใช้การปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงแบบช่วงด้วยจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน 6 รอบต่อชั่วโมง และกลุ่มที่ 3 จะทำการทดลองโดยใช้การปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงแบบช่วง ด้วยจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน 12 รอบต่อชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการการกำจัดเซลล์และนำหลอดลมสุกรทั้งหมดไปทำความสะอาดแล้วหลอดลมสุกรจะถูกนำไปวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานของหลอดลมสุกรด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันภายในโครงสร้างของหลอดลมสุกรด้วย FT-IR และวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในหลอดลมสุกรด้วยวิธีวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอ ผลการทดลองได้ถูกประเมินและวิเคราะห์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

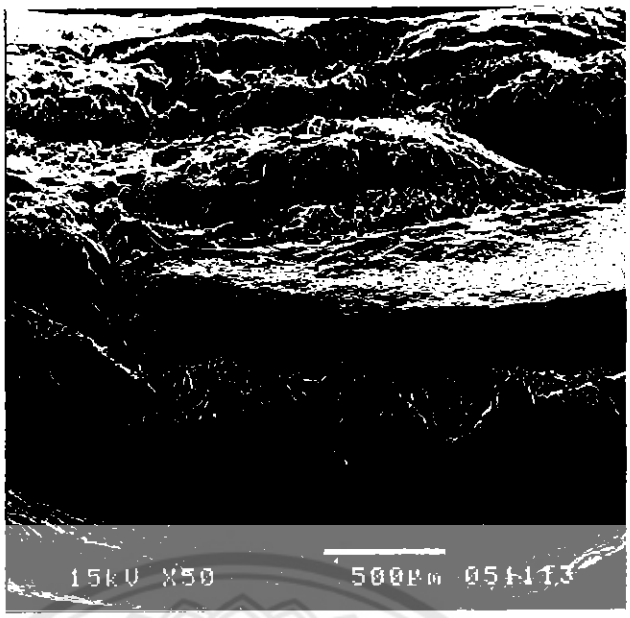
4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานภายในหลอดลมสุกร

จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 บริเวณพื้นผิวด้านนอกของหลอดลมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ (C1-A) พบว่าพื้นผิวโดยส่วนใหญ่มีลักษณะเรียบและมีชั้นเยื่อหุ้มปกคลุมอยู่ ภายใต้พื้นผิวที่ถูกเยื้อหุ้มปกคลุมอยู่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติน บางส่วนมีลักษณะขรุขระเป็นชิ้นส่วนเนื้อเยื่อยื่นออกมาจากพื้นผิวของหลอดลม สันนิษฐานได้ว่าเป็นเนื้อเยื่อพังพืดที่ถูกกำจัดออกในขั้นตอนการเตรียมหลอดลมไม่หมด บริเวณพื้นผิวด้านในของหลอดลมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ (C2-A) มีลักษณะพื้นผิวที่เรียบคล้ายมีเยื่อหุ้มอยู่ชั้นหนึ่งและมีเซลล์กระจายอยู่ทั่วบริเวณพื้นผิว ภายใต้เยื่อหุ้มประกอบไปด้วยเส้นใยอีลาสตินจำนวนมาก ในบริเวณพื้นผิวหน้าตัดของเนื้อเยื่อหลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ (C3-A) แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบภายในหลอดลมประกอบไปด้วยชั้นต่างๆ ในแต่ละชั้นของเนื้อเยื่อมีเส้นใยที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเชื่อมต่อแต่ละชั้นของหลอดลมเข้าไว้ด้วยกัน รวมไปถึงมีองค์ประกอบจุลภาคอีกมากมายอยู่ภายในเนื้อเยื่อหลอดลม จากภาพถ่ายในส่วนบริเวณพื้นผิวหน้าตัดของเนื้อเยื่อหลอดลมที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 50 เท่า ดังแสดงในรูปที่

4.2 แสดงให้เห็นส่วนแกนกลางของหลอดลมไปจนถึงขอบด้านนอกของพื้นผิวหลอดลม พบว่าในแต่ละชั้นของเนื้อเยื่อหลอดลมมีรูปร่างสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ในส่วนแกนกลางของหลอดลมประกอบไปด้วยกระดูกอ่อนที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน มีโครงสร้างที่เกาะตัวกันอย่างหนาแน่น บริเวณพื้นผิวหน้าตัดเป็นเนื้อเยื่อที่มีความหนาแน่นน้อยกว่า ขอบนอกสุดของด้านข้างยังพบว่ามีเยื่อหุ้มผิวของหลอดลม ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

กำลังขยาย 200 เท่า	หลอดลมสุกรที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ (A)	หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวน (B)	หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการอัดคลายแรงดัน (C)
พื้นผิวด้านนอก (C1)			
พื้นผิวด้านใน (C2)			
พื้นผิวหน้าตัด (C3)			

รูปที่ 4.1 แสดงภาพถ่ายบริเวณด้านข้างของเนื้อเยื่อหลอดลมสุกรจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 200 เท่า



รูปที่ 4.2 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 50 เท่า

พิจารณาผลจากการวิเคราะห์ SEM ของหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่าบริเวณพื้นผิวด้านนอกหลอดลม ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (C1-B) มีพื้นผิวค่อนข้างเรียบประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินจำนวนมากยึดเกาะกันอยู่อย่างหนาแน่น บริเวณพื้นผิวด้านในหลอดลม (C2-B) พบว่าพื้นผิวนั้นเรียบ ซึ่งประกอบไปด้วยโครงสร้างที่เป็นเส้นใยจำนวนมากและพบเซลล์ขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ในบางบริเวณ บริเวณพื้นผิวหน้าตัดของหลอดลม (C3-B) พบว่าเนื้อเยื่อหลอดลมนั้นประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้น แต่ละชั้นเชื่อมต่อกันด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเส้นใยจำพวกเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยอีลาสติน บริเวณแกนกลางของด้านข้างหลอดลมซึ่งเป็นส่วนของกระดูกอ่อนมีโครงสร้างที่มีการเกาะตัวกันของเนื้อเยื่อและเซลล์อย่างหลวมๆ ในส่วนบริเวณขอบด้านนอกของหลอดลมพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อีกทั้งเริ่มแสดงลักษณะการเกิดรูพรุนภายในโครงสร้าง

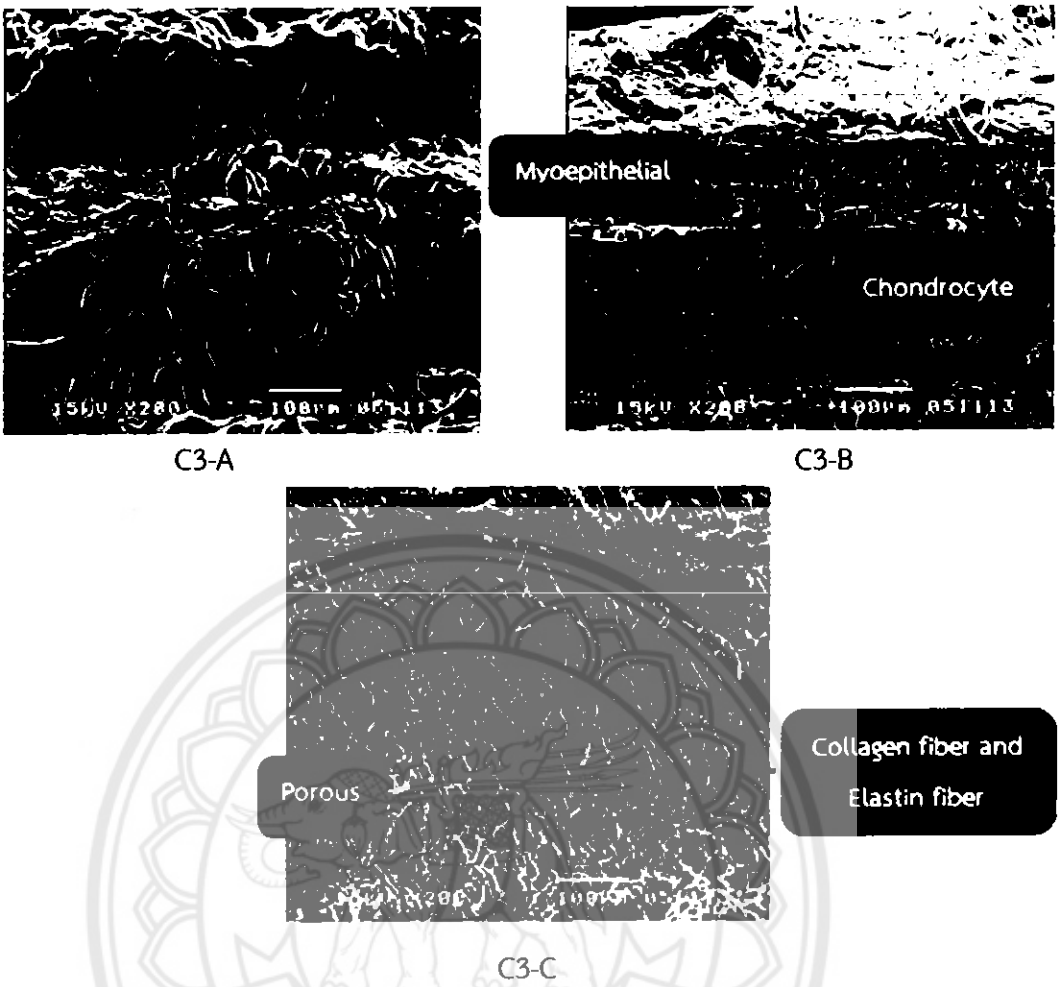
พิจารณาโครงสร้างของหลอดลมที่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าบริเวณพื้นผิวด้านนอก (C1-C) มีองค์ประกอบเป็นเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินจำนวนมาก อีกทั้งสามารถสังเกตพบเห็นได้ว่าโครงสร้างไม่ถูกทำลายและมีการเชื่อมต่อกันระหว่างเนื้อเยื่อ นอกจากนั้นยังพบว่ามีรูพรุนขนาดไมครอนบนบริเวณพื้นผิวด้านนอกของหลอดลม บริเวณพื้นผิวด้าน

ในของหลอดลม (C2-C) พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณนี้มีความเรียบประกอบไปด้วยเส้นใยที่ยึดตัวรวมกันอยู่จำนวนมาก ซึ่งเส้นใยที่พบส่วนมากจะเป็นเส้นใยอีลาสตินและบางส่วนเป็นเส้นใยคอลลาเจน สำหรับพื้นผิวหน้าตัดของหลอดลม (C3-C) ที่แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างภายในหลอดลมที่เป็นเส้นใยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยเส้นใยอีลาสตินที่ยึดเนื้อเยื่อในแต่ละชั้นของหลอดลมเข้าเอาไว้ด้วยกัน นอกจากนี้จากภาพยังแสดงให้เห็นถึงรูพรุนภายในหลอดลมซึ่งเป็นรูพรุนแบบ Interporous ที่แสดงถึงสมบัติในการเป็นวัสดุทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ดี

เมื่อเปรียบเทียบพื้นผิวหน้าตัดของตัวอย่าง ดังแสดงรูปที่ 4.3 พบว่าหลอดลมที่ได้ผ่านการกำจัดเซลล์ด้วยกระบวนการปั่นกวนและการอัดคลายแรงดันสามารถรักษาลักษณะโครงสร้างธรรมชาติของหลอดลมไว้ได้อย่างดี เนื่องจากตรวจพบเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินจำนวนมาก แสดงให้เห็นถึงสมบัติทางด้านกายภาพที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังกระบวนการกำจัดเซลล์ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงสมบัติความเป็นรูพรุนของตัวอย่างหลอดลม พบว่าไม่สามารถตรวจพบรูพรุนในเนื้อเยื่อชั้นใน อย่างเช่น กระดูกอ่อนของตัวอย่างหลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวน เนื่องจากสารละลายไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อที่มีความหนาแน่นสูงได้ ซึ่งแตกต่างจากหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยกระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วง ซึ่งจะสามารถตรวจพบรูพรุนจำนวนมากและเป็นรูพรุนชนิด Interporous ซึ่งแสดงถึงสมบัติในการเป็นวัสดุทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ดี นอกจากนั้นหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยกระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วงยังคงสามารถรักษาเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินไว้ได้เช่นเดียวกัน

4.2 การวิเคราะห์ลักษณะเซลล์ที่พบภายในหลอดลม

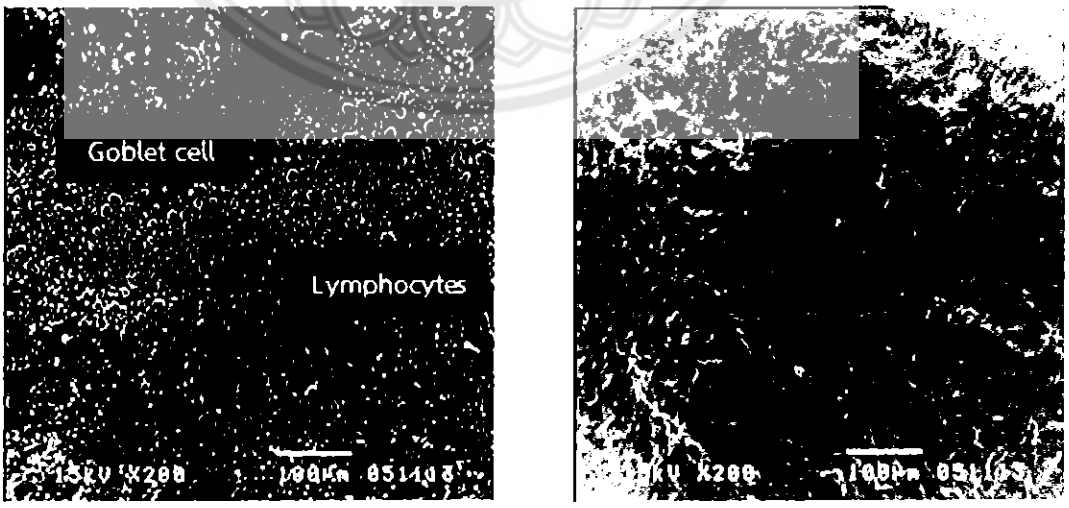
การวิเคราะห์บริเวณพื้นผิวด้านนอกของหลอดลมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (C1-A) พบว่าภายใต้พื้นผิวที่ถูกเยื่อหุ้มปกคลุมอยู่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติน เนื่องจากเส้นใยทั้งสองชนิดเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างของผนังหลอดลมชั้น Adventitia ซึ่งอยู่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของหลอดลมทำหน้าที่ในการสร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่นให้ชั้นเนื้อเยื่อ บริเวณพื้นผิวด้านในของหลอดลม (C2-A) พบเซลล์จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วบริเวณพื้นผิวที่ปกคลุมไปด้วยเส้นใยอีลาสตินอยู่อย่างหนาแน่น กลุ่มเซลล์ที่ถูกพบเป็น Goblet Cell เนื่องจากมีรูปร่างคล้ายแก้วไวน์ ซึ่งมีความยาวอยู่ประมาณ 50 ไมครอน และความกว้างประมาณ 10 ไมครอน [8] และพบเซลล์ขนาดเล็กทั่วบริเวณ



C3-A C3-B

C3-C

รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบภาพ C3-A C3-B และ C3-C



C2-A C2-C

รูปที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบภาพ C2-A กับ C2-C

พื้นผิว คือ Lymphocyte และ Epithelial Cell ที่มีขนาดโดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 6-7 ไมครอน [8] ดังแสดงในรูปที่ 4.4 เซลล์เหล่านี้ถูกพบโดยทั่วไปอยู่ในชั้น Mucosa ที่ตั้งอยู่บริเวณพื้นผิวด้านในของหลอดลม ในส่วนพื้นผิวหน้าตัดของเนื้อเยื่อหลอดลม (C3-A) พบเซลล์จำนวนมากเกาะตัวกันซึ่งไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากมีการเกาะตัวกันอย่างหนาแน่น

เมื่อพิจารณาหลอดลมสุกรที่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนอยู่ในสารละลาย ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าในบริเวณผิวด้านนอกของหลอดลม (C1-B) ไม่พบเซลล์อื่นๆ มีลักษณะกลมเหลี่ยมหรือรูปร่างอื่นๆ พบเพียงเส้นใยที่เกาะกันอย่างหนาแน่นเท่านั้น เส้นใยที่พบเหล่านั่น คือ เส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติน บริเวณพื้นผิวด้านในหลอดลม (C2-B) พบเซลล์ขนาดเล็กที่อยู่ในบางบริเวณ โดยส่วนมากมีลักษณะเป็นทรงกลม อีกทั้งมีนิวเคลียสขนาดใหญ่แทบเต็มเซลล์ ขนาดอยู่ที่ประมาณไม่เกิน 10 ไมครอน จากภาพนี้จึงสันนิษฐานได้ว่าเซลล์ที่พบเป็นเซลล์ Lymphocyte ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบมากในบริเวณเนื้อเยื่อชั้น Mucosa ซึ่งอยู่ในบริเวณด้านในสุดของเนื้อเยื่อหลอดลม พื้นผิวประกอบไปด้วยเส้นใยอีลาสตินจำนวนมาก บริเวณพื้นผิวหน้าตัดของหลอดลม (C3-B) พบว่าเนื้อเยื่อหลอดลมประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้น แต่ละชั้นจะมีเซลล์ในลักษณะที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.3 บริเวณแกนกลางของด้านข้างหลอดลมซึ่งเป็นส่วนของกระดูกอ่อนพบเซลล์กระดูกอ่อนหรือ Chondrocyte เนื่องจากบริเวณกลางกระดูกอ่อนจะพบเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นทรงกลม ส่วนบริเวณขอบของกระดูกอ่อนมีเซลล์ที่มีลักษณะเป็นรูปวงรี เซลล์ที่พบทั้งหมดมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 20 ไมครอน บริเวณที่ติดกับขอบของกระดูกอ่อนพบเป็นเซลล์ที่มีขนาดต่างกันบางเซลล์มีขนาดประมาณ 5-7 ไมครอน ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเซลล์เยื่อบุผิวหรือ Myoepithelial เนื่องจากว่าเนื้อเยื่อในชั้นนี้เป็นเนื้อเยื่อหลอดลมชั้นของกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ชนิดที่กล่าวข้างต้น ในส่วนบริเวณขอบด้านนอกของหลอดลมพบว่าไม่มีเซลล์ปรากฏ พบเป็นเส้นใยและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เกาะกันแน่น

สำหรับหลอดลมที่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการอัดคลายแรงดันแบบช่วง จากผลการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในรูปที่ 4.1 พบว่าในบริเวณผิวด้านนอกของหลอดลม (C1-C) มีองค์ประกอบเป็นเส้นใยจำนวนมาก ไม่พบเซลล์ชนิดอื่น บริเวณพื้นผิวด้านในของหลอดลม (C2-C) พบเส้นใยจำนวนมาก เส้นใยที่พบส่วนมากจะเป็นเส้นใยอีลาสติน และส่วนหนึ่งจะเป็นเส้นใยคอลลาเจน เนื่องจากเนื้อเยื่อในเนื้อเยื่อหลอดลมด้านในนี้เป็นเนื้อเยื่อชั้น Mucosa ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลล์ Goblet เซลล์ Lymphocyte และเส้นใยอีลาสติน แต่แทบไม่พบเซลล์ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชนิดอื่นๆ อยู่บริเวณพื้นผิว ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ Goblet หรือเซลล์ Lymphocyte อาจมีเซลล์ขนาดเล็กที่พบบ้างในบางจุด ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเซลล์ Lysosome ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 ไมครอน สำหรับในส่วนพื้นผิวหน้าตัดของหลอดลม (C3-C) พบว่ามีโครงสร้างลักษณะเป็นเส้นใยที่

เชื่อมกันไปทั่วเนื้อเยื่อหลอดลม ในภาพเป็นภาพของบริเวณส่วนแกนกลางของเนื้อเยื่อหลอดลม คือ ส่วนของกระดูกอ่อน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะประกอบไปด้วยเซลล์กระดูกอ่อนหรือ Chondrocyte และเส้นใยคอลลาเจน แต่ตรวจพบเพียงเส้นใยคอลลาเจนซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่รักษาโครงสร้างของหลอดลมไว้เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.3

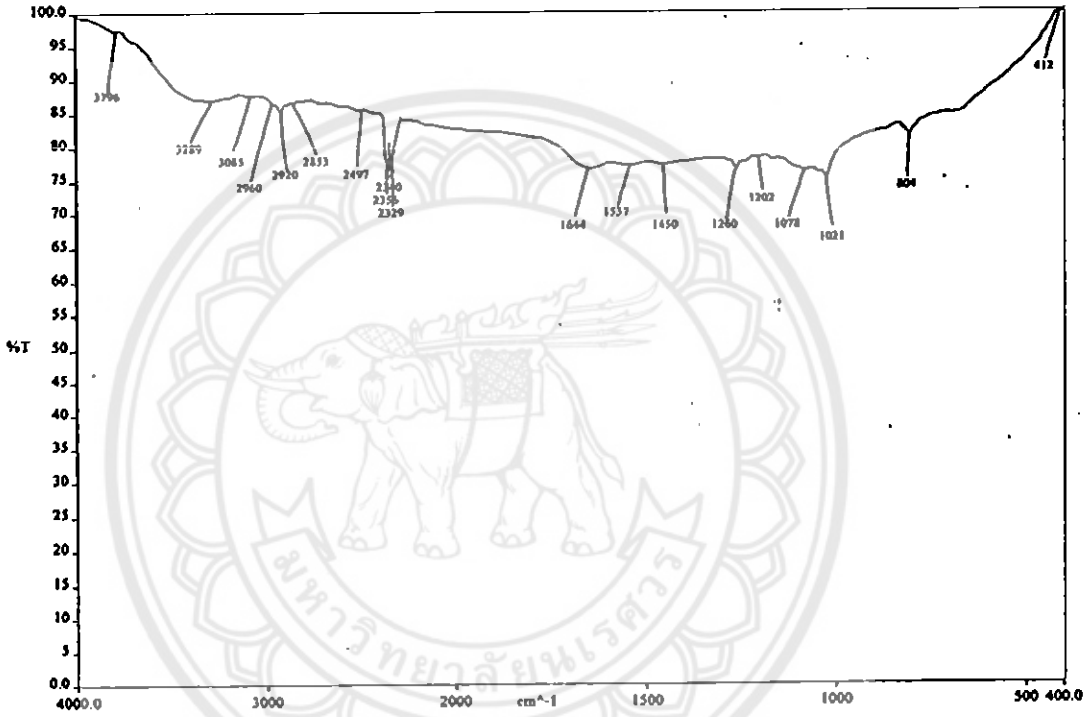
จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่าสำหรับการกำจัดเซลล์ด้วยกระบวนการปั่นกวนในสารละลายเพียงอย่างเดียวไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ในหลอดลมสุกรได้ทั้งหมด ถึงแม้ว่า Triton X-100 จะมีสมบัติในการทำลายผนังเซลล์และกำจัดเซลล์บางส่วนออก ส่วน Ammonium Hydroxide สามารถเข้าไปทำลายและชะล้างเซลล์ที่ตกค้างอยู่ได้ เนื่องจากการปั่นกวนในสารละลายเพียงอย่างเดียวนั้นมีแรงเหวี่ยงที่ส่งผลต่อพื้นผิวด้านในน้อย เกิดการหมุนเวียนสารเข้าไปสัมผัสกับพื้นผิวบริเวณด้านในได้น้อย จึงทำให้ไม่สามารถกำจัดเซลล์ได้ทั้งหมด อีกทั้งยังไม่สามารถช่วยให้สารละลายแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างหลอดลมเพื่อกำจัดเซลล์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อหลอดลมได้ ซึ่งส่งผลเพียงทำให้เซลล์ต่างๆที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อยึดตัวกันหลวมลงเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.3 หลอดลมที่ได้ผ่านกระบวนการปั่นกวนเพียงอย่างเดียวพบเซลล์ปรากฏอยู่บนเนื้อเยื่อ เมื่อพิจารณาการกำจัดเซลล์ด้วยกระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วงให้ผลของการกำจัดเซลล์ที่ดีกว่า พบว่าเซลล์บริเวณพื้นผิวด้านในหลอดลมถูกกำจัดออกไปจนหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.4 รวมไปถึงเซลล์บริเวณด้านข้างหรือภายในเนื้อเยื่อด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.3 เป็นผลให้เนื้อเยื่อหลอดลมเกิดรูพรุนแบบ Interporous ขึ้น ซึ่งจะเอื้อประโยชน์ทางด้านสัณฐานวิทยาอีกด้วย ทั้งนี้เพราะแรงดันจะเป็นตัวช่วยผลักสารละลายเข้าไปสู่ภายในเนื้อเยื่อ ทำให้สารละลายเข้าไปสัมผัสและทำปฏิกิริยากำจัดเซลล์ได้ อีกทั้งยังช่วยหมุนเวียนสารในการกำจัดเซลล์ด้วย

4.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของหลอดลมสุกรโดยการตรวจสอบสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน

4.3.1 ลักษณะ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน (Type I Collagen)

ในการวิเคราะห์ความแข็งแรงของโครงสร้างโดยการตรวจสอบสมบัติทางเคมีของคอลลาเจนที่ถูกพบอยู่ภายในหลอดลมสุกรนั้นสามารถวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) โดยอ้างอิงข้อมูล FT-IR ของคอลลาเจนมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.1 ลักษณะของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3298 ซม$^{-1}$ แสดงให้เห็นการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch คู่กับ Hydrogen Bond การดูดกลืน

คลื่นที่ตำแหน่ง 2920 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch การดูดกลืนคลื่นที่ตำแหน่ง 1644 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน การดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1450 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Bend และการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1078 ซม$^{-1}$ แสดงให้เห็นถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C–O Stretch



รูปที่ 4.5 แสดง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน (Type I Collagen)

ที่มา: S. Vairamani และคณะ (2012)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน

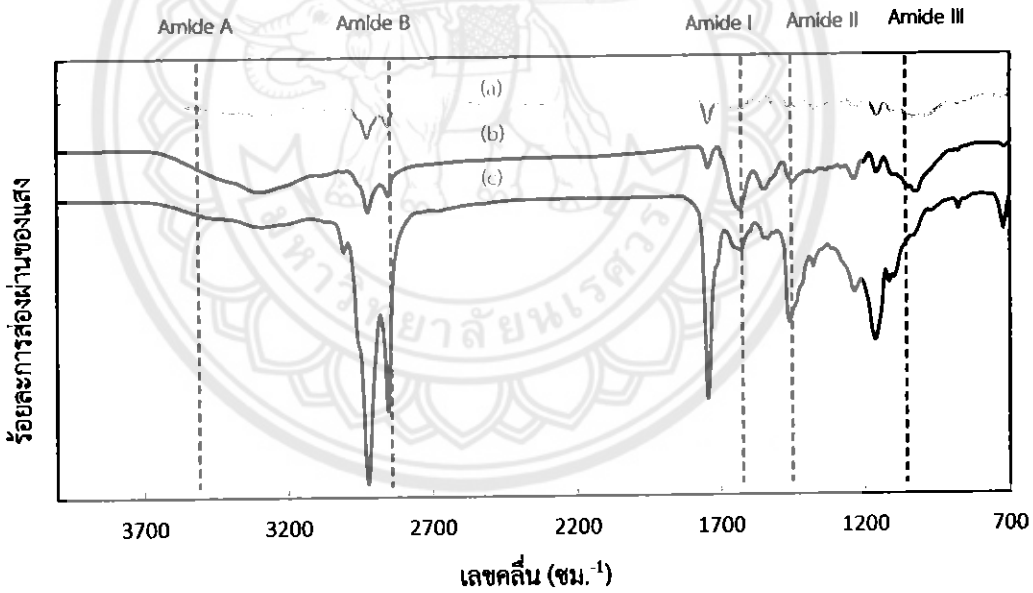
Region	Standard	Assignment
Amide A	3289	NH Stretch Coupled with Hydrogen Bond.
Amide B	2920	CH_2 Asymmetrical Stretch.
	2853	CH_2 Asymmetrical Stretch.
Amide I	1644	C=O Stretch/Hydrogen Bond Coupled with CN Stretch.

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน

Region	Standard	Assignment
Amide II	1537	NH Bend Coupled with CN Stretch.
	1450	CH2 Bend.
	-	COO–Symmetrical Stretch.
	-	CH2 Wagging of Proline.
Amide III	1260	NH Bend Coupled with CN Stretch.
	1078	C–O Stretch.
	1021	C–O Stretch.
	804	Skeletal Stretch.

ที่มา: S. Vairamani และคณะ (2012)

4.3.2 ลักษณะ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่พบอยู่ภายในหลอดลมสุกร



รูปที่ 4.6 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่พบอยู่ในหลอดลมสุกร a) หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วง b) หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในสารเคมี c) หลอดลมที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดเซลล์

จากรูปที่ 4.6 แสดงถึง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่ถูกพบอยู่ภายในหลอดลมสุกร ประกอบด้วยหลอดลมที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดเซลล์ หลอดลมที่ได้ผ่านกระบวนการปั่นกวนในสารเคมี หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

พบว่าคอลลาเจนที่พบในหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 12 รอบต่อชั่วโมง a) พบว่าจะแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3294 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch คู่กับ Hydrogen Bond เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 2924 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide B ซึ่งจะแสดงหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1640 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1459 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Bend และเกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1030 ซม$^{-1}$ ซึ่งแสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C–O Stretch

สำหรับคอลลาเจนที่พบในหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 b) พบว่าแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3289 ซม$^{-1}$ ซึ่งจะแสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch คู่กับ Hydrogen Bond เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 2923 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1635 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของสารโปรตีน เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1551 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN stretch และเกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1020 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C–O Stretch

สำหรับคอลลาเจนที่พบในหลอดลมสุกรที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ c) แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3289 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch คู่กับ Hydrogen Bond ดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 2922 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch ดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1631 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน เกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1461 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2

Bend และเกิดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 1236 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลสารประกอบ Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch

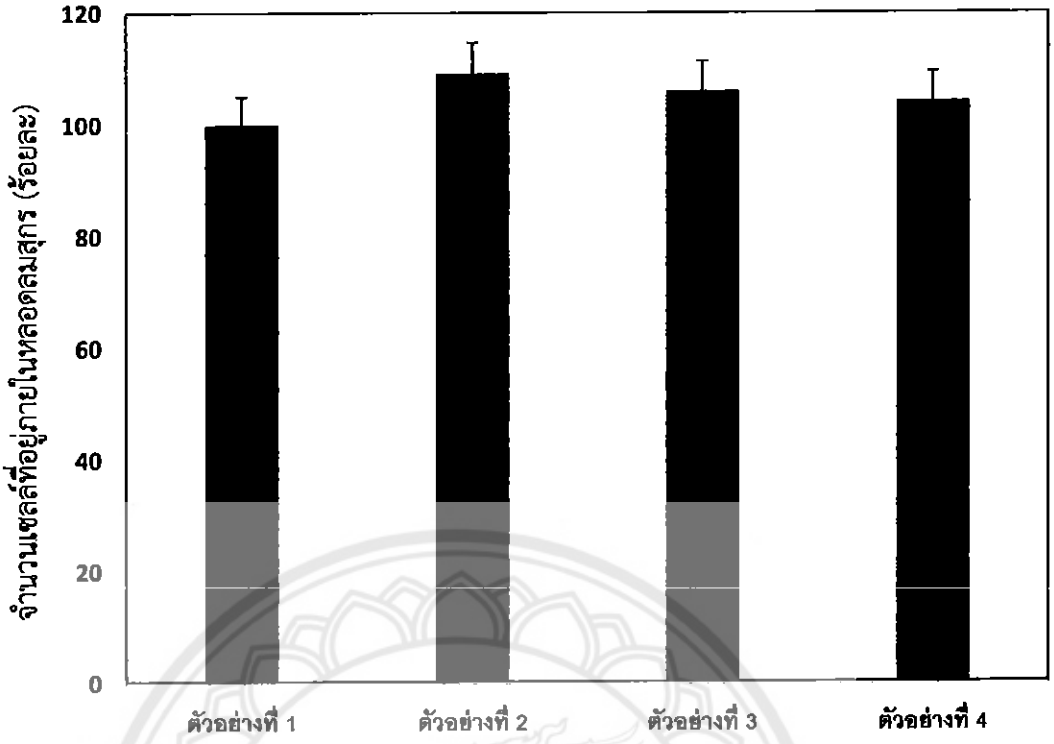
จากผลการวิเคราะห์พบว่าลักษณะของการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่พบในเนื้อเยื่อหลอดลมสุกรทั้ง 3 ตัวอย่าง แสดงตำแหน่งที่สอดคล้องกับลักษณะการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนมาตรฐาน ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากระบวนการกำจัดเซลล์หลอดลมสุกรด้วยการปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน ผลการวิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางเคมีของหลอดลมสุกรไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างกระบวนการกำจัดเซลล์

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ของหลอดลมสุกร

ตารางที่ 4.2 แสดงสภาวะในการทดลอง

ตัวอย่างที่ 1	หลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์
ตัวอย่างที่ 2	หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
ตัวอย่างที่ 3	หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 6 รอบต่อชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 4	หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 12 รอบต่อชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ภายในหลอดลมสุกร จากรูปที่ 4.7 พบว่าหลอดลมสุกรที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ (ตัวอย่างที่ 1) มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุด คือ มีเซลล์จำนวน 1,200,000 หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เพียงอย่างเดียว (ตัวอย่างที่ 2) พบว่าจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 9 หลอดลมสุกรที่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 6 รอบต่อชั่วโมง (ตัวอย่างที่ 3) มีจำนวนเซลล์หลอดลมเพิ่มมากขึ้นประมาณร้อยละ 6 และหลอดลมสุกรที่ผ่าน



รูปที่ 4.7 แสดงแผนภูมิเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่พบในหลอดลมสุกรเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ 1

กระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารละลาย Triton X-100 ด้วยความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Ammonium Hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 12 รอบต่อชั่วโมง (ตัวอย่างที่ 4) มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 4 ซึ่งผลการวิเคราะห์ข้างต้นไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่พบว่าเซลล์ถูกกำจัดออกไปได้จำนวนมากหลังผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ทั้งกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในสารเคมีเพียงอย่างเดียวและกระบวนการปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วง นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ที่พบยังไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าการปั่นกวนในสารเคมีสามารถกำจัดเซลล์ได้ [5, 27, 28] และการใช้การอัดคลายแรงดันร่วมกับการปั่นกวนสารเคมีสามารถช่วยให้การกำจัดเซลล์ภายในเนื้อเยื่อที่มีความหนาและความหนาแน่นมากมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น [5] เนื่องจากในโครงสร้างของหลอดลมประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก คือ ส่วนกระดูกอ่อนและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งกระดูกอ่อนในหลอดลมประกอบไปด้วยกระดูกอ่อน 2 ใน 3 หรือประมาณร้อยละ 70 เซลล์ที่อยู่ภายในกระดูกอ่อน คือ เซลล์ Chondrocyte ซึ่งสารเคมีจะแทรกซึมเข้าไปกำจัดเซลล์ชนิดนี้ได้ค่อนข้างยาก เพราะในกระดูกอ่อนมีโครงสร้างที่แข็งแรงจึงทำให้ผลการศึกษาที่ได้นั้นไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการในการกำจัดเซลล์ภายในหลอดลม

ของสุกร เพราะฉะนั้นแล้วในการวิเคราะห์ผลการศึกษาในเชิงปริมาณควรมีการแยกวิเคราะห์เป็นส่วน คือ ส่วนของเนื้อเยื่อและส่วนของกระดูกอ่อน เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของเซลล์ในส่วนต่างๆ ที่ถูกกำจัดออกไปและเกิดความแม่นยำในการตรวจวัดปริมาณเซลล์ในส่วนเนื้อเยื่อ

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกรโดยใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้สารเคมี จากผลการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าโครงสร้างภายในหลอดลมที่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการใช้สารเคมีร่วมกับการอัดคลายแรงดันไม่ถูกทำลายและจำนวนเซลล์ในเนื้อเยื่อหลอดลมถูกกำจัดออกไปจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดลมสุกรที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีด้วยการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) พบว่าในกระบวนการกำจัดเซลล์หลอดลมสุกรด้วยการปั่นกวนในสารเคมีร่วมกับการอัดคลายแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน แสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ชักนำให้เกิดการเสื่อมสภาพของคอลลาเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในหลอดลมสุกร โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้ คือ กระบวนการที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ เนื่องจากหลอดลมเป็นเนื้อเยื่อที่มีความหนาและหนาแน่นสูง ดังนั้นการประยุกต์ใช้แรงทางกลในรูปแบบของแรงดันจะช่วยให้สารเคมีแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นการหมุนเวียนสารในการกำจัดเซลล์อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้ หลอดลมที่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ถูกนำไปวิเคราะห์ในเชิงปริมาณเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยวิธีวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามจากผลที่ได้พบว่าปริมาณเซลล์ของหลอดลมสุกรก่อนและหลังกระบวนการกำจัดเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันทั้งนี้เนื่องจากในโครงสร้างของหลอดลมประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก คือ กระดูกอ่อนและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ดังนั้นในขั้นตอนการวัดปริมาณเซลล์ควรแยกวิเคราะห์แต่ละส่วน นอกจากนี้ในกรณีศึกษายังไม่มีการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่สามารถยืนยันได้ว่าหลอดลมปราศจากเซลล์ที่ผลิตสามารถนำไปใช้กับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้จริง ดังนั้นควรจะทำการทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity) โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 เพื่อทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้กับงานด้านการแพทย์และควรมีการเปรียบเทียบกระบวนการที่ใช้แรงดันที่แตกต่างกันเพื่อให้ทราบถึงผลของการกำจัดเซลล์ที่ขึ้นอยู่กับแรงดันที่ใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] สมศักดิ์ บุญสนอง. (10 กรกฎาคม 2552). **หลอดลม**. สืบค้นเมื่อ 15 พฤษภาคม 2556, จาก http://www.thaigoodview.com/library/sema/sukhothai/somsak_b/organ/organ4p1-4.html.

[2] ดร. วัชชัย วรพงศธร. (7 มกราคม 2554). **จำนวนและอัตราตายต่อประชากร 100,000 คน ตามลำดับของกลุ่มสาเหตุการตาย 10 กลุ่มแรก**. สืบค้นเมื่อ 15 พฤษภาคม 2556, จาก http://bps.ops.moph.go.th/Healthinformation/statistic54/statistic54.html.

[3] ศาสตราจารย์นายแพทย์ประพาฬ ยังใจยุทธ. (2551). **แนวปฏิบัติบริการสาธารณสุข:การดูแลผู้ป่วยโรคหืด**. กรุงเทพฯ: กระทรวงสาธรณสุข.

[4] วิโรจน์ จันทรัตน์. (2534). **กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เลี้ยง**. เชียงใหม่: พลอยการพิมพ์.

[5] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, Vol. 32, pp. 3233-3243.

[6] I. Prasertsung, S. Kanokpanont, T. Bunaprasert, V. Thanakit, S. Damrongsakkol. (2007). Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technigue. **Biomaterials**, Vol. 85, pp. 210-219.

[7] นพ.ธัชชัย ศรีเสน. (2556). Anatomical Review of Human Trachea. **วารสารนิติเวชศาสตร์**. 6(1), 91-104.

[8] A. Robert, Jr. Freitas. (1999) Cytometrics. **Nanomedicine**, Vol. 1, pp. 255-264.

[9] รศ. ดร.ศิริพร ดำรงศักดิ์กุล และ ผศ. ดร.โศรดา กนกพานนท์. (30 สิงหาคม 2554). **วิศวกรรมเนื้อเยื่อ**. สืบค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2556, จาก http://www.thaigoodview.com/library/sema/sukhothai/somsak_b/organ/organ4p1-4.html.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[10] ชูวงศ์ ฉายะจินต์. (10 กรกฎาคม 2556). ทีมสวีเดนปลูกถ่ายอวัยวะเทียมสำเร็จครั้งแรกของโลก. **หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ,** 6.

[11] ดร.สุภาพร เทพยสุวรรณ. (2 พฤษาคม 2556). ปาฏิหาริย์ แพทย์ปลูกถ่าย "อวัยวะเทียม" ให้หนูน้อย 2 ขวบลูกครึ่งเกาหลี-สุดอาภัพเกิดมาไร้ "หลอดลม". **หนังสือพิมพ์ผู้จัดการ,** 13.

[12] ดร.สมชาย แสงอำนาจเดช. (12 มีนาคม 2549). **ปลูกถ่ายหลอดลม ไม่ต้องทานยากดภูมิคุ้มกัน** อาศัยชีววิศวกรรมเนื้อเยื่อ. สืบค้นเมื่อ 25 มิถุนายน 2556, จาก http://www.gotoknow.org/posts/224213.

[13] อาจารย์ปณณธร ภัทรสถาพรกุล. (2547). **เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง. กรุงเทพฯ:** ดำรงค์ชัยการพิมพ์.

[14] รศ.แม้น อมรสิทธิ์. (2534). **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.**

[15] นูรฮายัร ศรีสวัสดิ์. (2549). TIR เครื่องมือวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

[16] อเนก อาจเอื้อ. (2552). **บทที่ 10 อินฟราเรด สเปคโตรสโคป (Infrared Spectroscopy).** สืบค้นเมื่อ 14 พฤศจิกายน 2556, จาก http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM328/CM328-10.pdf.

[17] **สิริฤกษ์ ทรงสิวิไล. (2550). Fluorescence Spectroscopy. สืบค้นเมื่อ** 14 พฤศจิกายน 2556, จาก http://www.nanotec.or.th/th/?page_id=565.

[18] H. Guilin, L. Longjiang, L. Xueying. (2006). Preparation and biocompatibility of acellular trachea matrix. **Journal of Practical Stomatology,** Vol. 3, pp. 1254-1269.

[19] P. Macchiarini, P. Jungebluth. (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **The lancet,** Vol. 372, pp. 2023-2030.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[20] P.M. Baptista, G. Orlando. (2009). Whole organ decellularization-a tool for bioscaffold fabrication and Organ Bioengineering. **Annual International conference of the IEEE engineering in medicine and biology society,** Vol. 31, pp. 6526-6529.

[21] J.C. Fitzpatrick, P.M. Clark, F.M. Capalttdil. (2010). Effect of decellularization protocol on the mechanical behavior of porcine descending aorta. **A thesis submitted to the faculty of Drexel University,** Vol. 1, pp. 1-49.

[22] N. Remlinger, C. Czajka, M. Juhas, D. Vorp, D. Stolz. (2010). Hydrated xenogrneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. **Biomaterials,** Vol. 31, pp. 3520-3526.

[23] S. Haykal, S. Hofer, T. K. Waddell. (2010). Determining the immunogenicity and structural integrity of decellularized tracheal allografts. **Plastic Surgery University of Toronto,** Vol. 12, pp. 184-193.

[24] N. Hou. (2010). Tissue-engineered trachea using perfusion-decellularized technique and mesenchymal stem cells in a rabbit model. **Journal of neutological surgery** Vol. 1, pp. 72-83.

[25] M. Zang, Q. Zhang, E. I. Chang, A. B. Mathur, P. Yu. (2012). Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering. **American Society of Plastic Surgeons,** Vol. 1, pp. 47-52.

[26] D. W. Youngstrom, J. G. Barrett , R. R. Jose, D. L. Kaplan. (2012). Functional characterization of detergent-decellularized equine tendon extracellular matrix for tissue engineering applications. **PLoS ONE,** Vol. 8, pp. 128-140.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[27] S. Baigueraa, C. D. Gaudiob, M. O. Jausc, L. Polizzia, A. Gonfiottic, C. E. Comind, A. Biancob, D. Ribattie, D. A. Taylorf, P. Macchiarini. (2012). Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. **Biomaterials,** Vol. 33, pp. 3662-3672.

[28] L. Partingtona, N. J. Mordanc, C. Masona, J. C. Knowlesc, W. Kimd, M. W. Lowdellb, M. A. Birchallf, I. B. Wall. (2013). Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. **Acta Biomaterialia,** Vol. 9, pp. 5251–5261.

[29] S. Vairamani, R. Pasiyappazham, S. Namasivayam, S. Sadhasivan, S. Palaniappan, M.Meivelu,et al. (2012). Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of Sepiellainermis(Orbigny, 1848), **African Journal of Biotechnology,** Vol. 11, pp. 14326-14337.